

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAROLINE MARÇAL GOMES DAVID

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO PARA GENES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA DE PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS DA RAÇA
MORADA NOVA.

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO – 2019

CAROLINE MARÇAL GOMES DAVID

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO PARA GENES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA DE PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS DA RAÇA
MORADA NOVA**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADORA: Celia Raquel Quirino

Co-orientador: Ricardo Lopes Dias da Costa

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro – 2019

CAROLINE MARÇAL GOMES DAVID

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO PARA GENES ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA DE PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS DA RAÇA
MORADA NOVA**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em

Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

À Eunice, Edmilta, Josefa, Ednalva, Elza (in memorian), Egnólia, Elenilda, Elisete, Eude, Edna e Nilza (in memorian). Foram minha inspiração diária, pela força, superação e dedicação que sempre demonstraram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à professora Celia Raquel Quirino, pela chance de realizar os estudos através da pesquisa da qual acredito. Obrigada pela oportunidade, pelas portas abertas, por todo apoio e pela confiança de depositar este trabalho sob minha responsabilidade e pela preocupação comigo e com meu trabalho.

Ricardo Lopes Dias da Costa, por todo ensinamento e incentivo e principalmente por acreditar em mim quando eu não fui capaz de acreditar. Aos professores que fizeram parte da minha formação durante estes anos, e compartilham de mais um momento como membros da banca examinadora, Renato Travassos Beltrame, Aparecida de Fatima Madella-Oliveira, Fábio Prudêncio de Campos.

Aos meus, inicialmente colegas de laboratório e hoje amigos para uma vida, André, Junior, Miguel, Ary, Ana, Thiago e Júlia, pela colaboração e disposição constante, ensinamentos e paciência. Mariana, Luciana e Maritza pela amizade e compreensão, pela calma e carinho. Ana Sophia por alegrar meus dias e meus domingos de vizinha. À Julia D'Angelo, por estes anos de dedicação e ajuda em meus trabalhos, assim como as demais bolsistas pela disposição e dedicação e alegria no laboratório, Vanessa, Bárbara, Ana Cláudia, Gabi, Vânia e Dryelle.

Aos meus avós, pais e irmãos por entenderem a minha ausência, por todo amor e confiança. Minhas tias e tios e primos amados por todo suporte. Vocês são a minha força.

Aos meus incontáveis amigos, por mensagens diárias, pelas palavras de conforto. Minhas irmãs de alma, Damares, Lupe, Ellen, Andressa, Camila e Pek, por suportarem todas as minhas lágrimas. Francino, pela companhia e dedicação a mim e aos meus trabalhos.

Agradeço ao Instituto de Zootecnia, pesquisadores e a todos que me ajudaram durante a execução de mais um experimento, Vivi, Maria, Maria Helena (Leninha), Joao, Maquina, Paulo e Regina (*in memoriam*), pelo carinho a mim dedicado desde o início.

À UENF pela oportunidade, a pós-graduação em especial a Jovana pelo trabalho impecável nos da todo suporte e tranquilidade. A todos os professores e funcionários que estiveram sempre à disposição engajados no crescimento e desenvolvimento da pesquisa. Ao governo brasileiro e seus órgãos de fomento CAPES e CNPq por fornecer o suporte financeiro durante meu doutorado.

EPÍGRAFE

“É preciso sempre desconfiar das coisas fáceis”

Chico Buarque

Resumo

Os objetivos deste estudo foram avaliar as características relacionadas à resistência parasitária e a diversidade genética de ovinos da raça Morada Nova. 61 animais naturalmente infectados foram rotineiramente avaliados. As características relacionadas à avaliação da resistência parasitária foram: pesagem, escore de condição corporal (ECC), contagem de ovos por grama de fezes (OPG), coprocultura, volume globular (VG), hemoglobina (Hb) contagem eritrócitos e leucócitos totais, diferencial de leucócitos. Foram realizadas análise de variância considerando medidas repetidas, a correlação de Pearson entre as características. Para a avaliação da diversidade genética foram estimados o número de alelos diferentes (N_a), número de alelos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de fixação (F), análise de conteúdo de informação polimórfica (PIC) utilizando o software GenAlEx, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi estimado através do teste exato de Fisher e a riqueza alélica populacional (AR) foi estimado usando o software HP-RARE 1.0. 45% dos animais eram resistentes a 43,3% resilientes e 11,7% suscetíveis. Através de características ligadas à infecção parasitária, observaram-se variações entre as categorias que ajudaram a identificar ovinos resistentes, resilientes e suscetíveis aos nematoides gastrintestinais. Observou-se diversidade genética moderada, sugerindo a implantação de programas de melhoramento visando a conservação da diversidade genética. Os resultados obtidos podem ser utilizados como base em programas de seleção através das características estudadas, além de ser um alerta sobre a pouca importância dada à diversidade das raças voltadas para produção animal.

Palavras chave: endogamia, nematoides, infecção parasitária recurso genético.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the characteristics related to parasite resistance and genetic diversity of Morada Nova sheep breed. 61 naturally infected animals were routinely evaluated. The characteristics related to the evaluation of parasitic resistance were: weighing, body condition score (BCS), feces egg counting (FEC), coproculture, packed cell volume (PCV), hemoglobin (Hb), erythrocytes and total leukocytes counts, the differential of leukocytes. We performed a variance analysis considering repeated measures and the Pearson correlation between the characteristics. For the genetic diversity evaluation, the number of different alleles (N_a), number of alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), fixation index (F), polymorphic information content analysis (PIC) using the GenAIEx software, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was estimated using Fisher's test and allelic richness (RA) was estimated using HP-RARE 1.0 software. 45% of the animals were resistant to 43.3% resilient and 11.7% susceptible. Through characteristics related to the parasitic infection, variations were observed among the categories that helped to identify resistant, resilient, and susceptible sheep to the gastrointestinal nematodes. It was observed a moderate genetic diversity, suggesting the implantation of breeding programs aiming the conservation of the genetic diversity. The results obtained can be used as a basis in selection programs through the characteristics studied, besides being an alert about the little importance given to the diversity of the animal production breed.

Key words: endogamy, nematodes, parasite infection, genetic resource.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1. Objetivos específicos	14
3. CAPITULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Infecção parasitária de ovinos	15
3.2 Resistência aos vermífugos e controle alternativo	18
3.3 Melhoramento genético de ovinos e característica de resistência	20
3.3.1 Características indicadoras resistência aos parasitas	23
gastrointestinais	
3.3.1.1 Contagem de ovos por grama de fezes	25
3.3.1.2 Volume globular, hemoglobina e eritrócitos	26
3.3.1.3 Leucócitos totais e diferencial de leucócitos	28
3.3.1.4 Peso e escore da condição corporal	29
3.4. A raça Morada Nova	30
3.5. Diversidade Genética	32
4. Referências	35
5. CAPÍTULO 2. Categorization phenotypical of indigenous ewes as a	41
resistant, resilient and susceptible to gastrointestinal nematodes	
6. CAPÍTULO 3. Diversity of indigenous sheep of an isolated	63
population	
7. CONCLUSÃO	72

1. INTRODUÇÃO

2 A ovinocultura é uma atividade explorada em todos os continentes, e está presente
3 em áreas que apresentam diversas características edafoclimáticas, no entanto, somente
4 em alguns países a atividade apresenta expressão econômica (VIDAL et al., 2006). O
5 Brasil, apesar de ser um dos maiores produtores e exportadores de proteína animal do
6 mundo, não mantém a ovinocultura como atividade estabelecida na agroindústria quanto
7 as produções de aves, suínos e bovinos, passando por constante reestruturação, emerge
8 como alternativa de exploração econômica para médios e pequenos produtores e a oferta
9 não chega a atender o mercado interno e boa parte da carne consumida é importada de
10 países vizinhos (VIANA; MORAES; DORNELES, 2015).

11 Com a crescente demanda pela carne de ovinos, sua criação passou a ser
12 estimulada e pequenos rebanhos começaram a ser explorados economicamente,
13 produtores investiram na introdução de raças especializadas (PANZIERA et al., 2018),
14 visando principalmente a melhoraria na carne de cordeiro, produto de maior interesse no
15 mercado. No entanto, o crescimento do setor enfrenta dificuldades que comprometem a
16 sua expansão e problemas como logística, baixa disponibilidade de frigoríficos para abate
17 e as questões relacionados à sanidade exercem importante influência na expansão da
18 atividade.

19 Entre outros, a infecção parasitária, ainda é considerada o principal problema
20 sanitário na criação de pequenos ruminantes, sendo os nematódeos gastrintestinais,
21 especialmente os da espécie *Haemonchus contortus*, os mais numerosos, amplamente
22 distribuídos e que resultam em prejuízos econômicos e sanitários mais severos (Ferreira
23 et al., 2017; Santos et al., 2012).

24 O controle parasitário foi e ainda é realizado primordialmente com a utilização de
25 anti-helmínticos, o fácil acesso, e a falta de orientação adequada para sua utilização,
26 contribuiu com a ineficácia de suas ações e os parasitas apresentaram resistência aos
27 diferentes princípios ativos disponíveis no mercado (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

28 Por este motivo, métodos não químicos têm sido estudados como alternativa de
29 controle parasitário e entre elas, a seleção de ovinos geneticamente resistentes. A
30 resistência aos parasitas gastrointestinais é a habilidade do animal de impedir o
31 estabelecimento e/ou subsequente desenvolvimento da infecção parasitária. Sendo a
32 resistência ou susceptibilidade aos parasitas uma característica herdável (KEANE *et al.*,
33 2006), a seleção de animais que apresentem resistência inerente combinada a outras
34 estratégias de controle, pode ser uma das abordagens mais promissoras a ser
35 empregada nas propriedades.

36 A resistência parasitaria não é uma característica absoluta nem é limitada a raças,
37 devido a variabilidade e diversidade entre e dentro de rebanhos (MACKINNON *et al.*,
38 2015). Apesar da resistência parasitária ser uma resposta individual e não ser limitada a
39 raças, é sabido que raças naturalmente adaptadas apresentam melhores respostas ao
40 desafio da infecção (Mackinnon *et al.*, 2015). Estas raças, geralmente, passaram por
41 seleção e reproduziram-se em um ambiente hostil ao qual se adaptaram para diversas
42 características incluindo a resistência aos parasitas gastrointestinais (Ojeda-Robertos *et*
43 *al.*, 2017; Amarante *et al.*, 2004).

44 Ovinos Morada Nova é uma das principais raças deslanadas do Brasil (MUNIZ *et*
45 *al.*, 2016), por anos a produção de ovinos localmente adaptados foi bastante
46 negligenciada por serem considerados pouco produtivos (AMARANTE *et al.*, 2004). No
47 entanto, em recentes estudos autores observaram e destacaram o potencial de ovinos

48 Morada Nova para uso na produção intensiva de carne (McManus et al., 2009) e sua
49 utilização como matriz em cruzamentos industriais com raças especializadas
50 (ISSAKOWICZ et al., 2016).

51 Estas raças consideradas especializadas para a produção de carne passam por
52 seleção baseados em poucas características, apesar da elevada produtividade de
53 cordeiros nascidos de cruzamentos industriais, a introdução das raças exóticas põe em
54 risco diversidade e variabilidade do rebanho podendo até comprometer existência das
55 raças naturalmente adaptadas (PAIVA et al., 2011).

56 Como alternativa, é proposto que os programas de seleção ampliem a gama de
57 características visando não somente a produção, mas também a qualidade do produto e
58 a resistência à doenças (MCMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010) em especial a resistência
59 aos parasitas gastrointestinais. É de interesse também, incluir programas de conservação
60 de recursos genéticos, mantendo a diversidade das raças localmente adaptadas e
61 garantir o acesso a seus genes e combinações genéticas únicas que podem ser úteis na
62 agricultura d futuro (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002).

63 A resistência do hospedeiro aos parasitas é mensurável através do seu
64 desempenho após os desafios de infecção. Estudos foram realizados com o objetivo de
65 verificar a influência das parasitoses gastrintestinais nas características produtivas de
66 ovinos, demonstrando que animais geneticamente resistentes são também animais mais
67 produtivos (BROWN; FOGARTY, 2017)

68 O peso, escore de condição corporal, análises hematológicas e a contagem de
69 ovos por gramas de fezes (OPG), são as principais características utilizadas para a
70 identificação de animais quanto a resistência ou susceptibilidade aos parasitas
71 (FERREIRA et al., 2017). Embora sejam simples e eficientes, as características

72 mensuradas em laboratório, demandam de mão de obra e são de custo elevado, não
73 sendo aplicáveis em grandes rebanhos. Como alternativa, sugere-se a utilização de mais
74 de uma variável concomitante para a identificação dos animais resistentes
75 (SOTOMAIOR; TANGLEICA; KAIBER, 2007) e por sua vez, adicionar as características
76 de fácil observação em programas de melhoramento de ovinos.

77 A identificação dos animais resistentes e susceptíveis necessita de metodologias
78 para diagnóstico preciso e precoce dos indivíduos e a partir disso, explorar a variabilidade
79 genética existente entre os animais de maior potencial genético para que avanços
80 significativos na ovinocultura brasileira sejam alcançados tornando a atividade mais
81 sustentável, competitiva e economicamente mais representativa para o país.

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94 **2. OBJETIVOS**

95 Os objetivos desse estudo foram avaliar as características relacionadas a resistência
96 parasitária e a diversidade genética de ovinos Morada Nova.

97 **2.1- Objetivos específicos**

98 Determinar características que sejam indicadoras da resistência do hospedeiro aos
99 parasitas gastrointestinais;

100 Estimar as correlações entre as características relacionadas à resistência aos
101 parasitas gastrointestinais;

102 Avaliar a diversidade genética de ovinos da raça Morada Nova.

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113 3. CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

114 3.1. Infecção parasitária de ovinos

115 São muitos os fatores citados por pesquisadores e produtores como principais
116 entraves na produção de ovinos, os problemas variam de acordo com a região, clima e
117 raças utilizadas, porém há unanimidade quando discutidos os problemas relacionados as
118 infecções parasitárias como sendo o principal problema na ovinocultura (URIARTE;
119 LLORENTE; VALDERRÁBANO, 2003).

120 As infecções parasitárias mais comuns são causadas pelos helmintos da classe
121 nematoda, destacam-se as infecções causadas pelos parasitas dos gêneros
122 *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Strongyloides* e *Haemonchus*,
123 seguidos das infecções causadas pelos cestódeos do gênero *Moniézia* e coccidioses
124 causada pelas eimérias (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014). Os animais podem ser
125 parasitados simultaneamente por várias espécies de nematódeos, causando quadros de
126 gastroenterite parasitária através de lesões e inflamações na mucosa intestinal ou
127 anemia por parasitas de hábito hematófago, em ambas, infecções os ovinos são
128 acometidos gravemente (RADOSTITS et al., 2002).

129 As condições ambientais, manejo e frequência de tratamento podem exercer
130 influência na diversidade das espécies de parasitas que acometem os rebanho, no
131 entanto, a espécie *Haemonchus contortus* é que apresenta maior prevalência, maior
132 patogenicidade além de causar os maiores prejuízos na produtividade dos animais e
133 maiores gastos com tratamentos (VLASSOFF; MCKENNA, 2010; WALLER;
134 CHANDRAWATHANI, 2005). As regiões tropicais e subtropicais em que as condições

135 climáticas se caracterizam quentes e úmidas com adequada pluviosidade favorecem a
136 infestação das pastagens pelo *H. contortus* (SANTOS; SILVA; AMARANTE, 2012).

137 Devido ao hábito hematófago do *H. contortus*, quadros de anemia hemorrágica
138 causada por uma vigorosa sucção de sangue comprometem o desempenho dos animais
139 gerando grandes perdas econômicas (MAVROT; HERTZBERG; TORGERSON, 2015;
140 (VLASSOFF; MCKENNA, 1994). Em quadros mais severos de anemia os animais podem
141 morrer subitamente em consequência de gastrite hemorrágica grave, este tipo de
142 infecção é caracterizado como Haemoncose aguda e as alterações fisiopatológicas são
143 dependentes da resposta imunológica de cada animal, que por sua vez, dependem do
144 nível de infecção, idade, genética, estado nutricional e fisiológico e também na habilidade
145 de compensar perdas dos constituintes do sanguíneos (AMARANTE; RAGOZO; SILVA,
146 2014; RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, 2002).

147 Outro tipo de infecção observada é a haemoncose crônica, caracterizada por
148 anemia progressiva redução drástica da ingestão de alimentos com efeito prejudicial
149 sobre o crescimento dos animais jovens e, nos animais adultos a redução do peso
150 corpóreo, morbidade, desidratação, edema submandibular que em quadros mais
151 severos, podem se estender ao longo do abdômen ventral (AMARANTE; RAGOZO;
152 SILVA, 2014). Este tipo de infecção pode ser observado em períodos de seca quando a
153 disponibilidade de forragem é restrita e durante o período do parto.

154 O parto é o período que constitui o terço final da gestação e o início da
155 lactação, onde a quantidade de ovos de parasitas gastrintestinais eliminado nas fezes
156 aumenta (ISSAKOWICZ et al., 2016; DAVID et al., 2015). Estudos sugerem que este
157 fenômeno seja provocado pela imunossupressão decorrente de variações hormonais
158 concomitantemente as exigências nutricionais devido à redução no consumo de matéria

159 seca, decorrente da compressão do rúmen pelo feto (RODRIGUES et al., 2007), esta
160 queda na imunidade permite o desenvolvimento das larvas em hipobiose, além do
161 estabelecimento de novas larvas ou maior fecundidade de adultos existentes, o que
162 resulta no aumento de ovos eliminado nas fezes (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA,
163 2011). Conseqüentemente ocorre um aumento da contaminação das pastagens pelos
164 estágios de vida livre dos nematódeos contribuindo com a reinfecção dos animais e maior
165 oportunidade de transmissão de um hospedeiro para outro.

166 Estudos relatam que a nutrição tem influência direta na eficiência da resposta
167 imunológica e na capacidade dos animais de suportar as infecções, no entanto a situação
168 de equilíbrio na relação entre parasita e hospedeiro pode ser alterada por diversos
169 fatores, que incluem o manejo e a condição nutricional, porém o rompimento desse
170 equilíbrio é, muitas vezes, produzido indevidamente pela ação do próprio ovinocultor
171 (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014).

172 As medidas de manejo empregadas em uma propriedade representam um dos
173 pontos mais importantes da ovinocultura e devem ser destinadas para suprir
174 adequadamente as necessidades de acordo com cada categoria, seja ela de idade ou
175 estado fisiológico considerando também a raça (AMARILHO-SILVEIRA et al., 2015). Os
176 métodos de controle parasitário evoluíram para além da utilização de produtos químicos
177 devido à baixa eficácia dos princípios ativos existentes no mercado (KAPLAN;
178 VIDYASHANKAR, 2012), por este motivo, diversas estratégias de controle estão sendo
179 exploradas, afim de dar possibilidades do produtor encontrar a que melhor se adeque ao
180 sistema de produção explorado de acordo com o ambiente e situação socioeconômica,
181 alcançado o sucesso na produção.

182

183 **3.2. Resistência aos vermífugos e controle alternativo**

184 As estratégias de controle de parasitas gastrointestinais, em todo o mundo
185 baseiam-se quase que inteiramente no uso frequente de anti-helmínticos. No entanto,
186 esta estratégia tem sido considerada ineficiente devido ao surgimento de múltiplos
187 parasitas resistentes aos agente químicos existentes (KAPLAN, 2004).

188 O uso intensivo de anti-helmínticos pertencentes aos grupos dos benzimidazóis,
189 dos imidazotiazóis (levamisole) e das lactonas macrocíclicas (avermectinas e
190 milbemicinas) demonstrou um impacto positivo inicialmente, mas atualmente constitui a
191 forma mais desastrosa de controle, resultando na seleção e propagação de parasitos
192 resistentes (FORTES; MOLENTO, 2013). Cada vez que um anti-helmíntico é
193 administrado, o animal elimina parasitas suscetíveis e seleciona parasitas resistentes,
194 que passam seus genes resistentes para a próxima geração de parasitas.

195 A ineficiência dos anti-helmínticos, infelizmente, está associada ao fácil acesso
196 aos medicamentos e à falta de diretrizes apropriadas para seu uso, resultando na
197 aplicação indiscriminada em grande escala (VERÍSSIMO et al., 2012), o curto intervalo
198 entre os tratamentos, tratamentos supressivos, alternância rápida de diferentes princípios
199 ativos, introdução de animais com parasitas resistentes no bando e o uso excessivo,
200 indiscriminado e continuado de drogas anti-helmínticas de longa duração como métodos
201 de controle favorecem o desenvolvimento de isolados de parasitas resistentes a drogas
202 anti-helmínticas.

203 Esse é um tema de preocupação mundial crescente, e representa uma ameaça
204 ao controle parasitário de médio e longo prazo, tendo em vista a precária melhoria na
205 condição dos animais, mesmo após o tratamento (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

206 A necessidade de métodos alternativos de controle é destacada pelo fato de que
207 poucas novas classes de drogas anti-helmínticas foram lançadas nos últimos anos
208 (MCMANUS et al., 2014). Segundo MALLMANN et al. (2018) esperar pelo
209 desenvolvimento de novos medicamentos para controlar parasitas pode ser um risco,
210 considerando que o desenvolvimento de novos agentes químicos pode ser lento, além
211 de estar sujeito à ineficácia devido à má utilização assim como os princípios ativos
212 anteriormente citados. O Monepantel, foi o primeiros medicamentos de um grupo químico
213 totalmente novo a aparecer no mercado após mais de 25 anos, entretanto apesar do seu
214 recente desenvolvimento, registros de ineficácia já foram relatadas (MALLMANN et al.,
215 2018; ALBUQUERQUE et al., 2017; SCOTT et al., 2013).

216 O tratamento com anti-helmínticos é considerado um dos maiores custos de
217 produção em diferentes países (BROWN; FOGARTY, 2017). No Brasil, segundo
218 BARBOSA, (2017), a maior demanda por produtos veterinários ocorre para as espécies
219 produtoras de alimento e, as classes de produtos com maior participação no mercado
220 são antiparasitários e biológicos. Este fator correlacionado aos enormes prejuízos
221 causados pelas infecção parasitárias, foram predisponentes para a investigação de
222 métodos alternativos de controle.

223 Os controles alternativos são medidas estratégicas que propõem diminuir a
224 utilização de medicamentos, reduzir a contaminação dos animais e da pastagem,
225 utilizando de métodos menos convencionais (SAYERS; SWEENEY, 2005), tais como;
226 utilização forragens variadas (COSTA et al., 2007), utilização de diferentes fontes de
227 alimentação (DAVID et al., 2015; AFONSO et al., 2010), compostos naturais com ação
228 anti-helmíntica (NORDI et al., 2014; KATIKI et al., 2013), utilização de vacinas
229 (BASSETTO; AMARANTE, 2015), pastejo alternado entre espécies (BRITO et al., 2013)

230 e entre outros a seleção de animais geneticamente resistentes (WILKIE et al., 2017;
231 BERTON et al., 2017; BENAVIDES; SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016; RIGGIO et
232 al., 2013).

233 Os métodos de controle genético envolvem a seleção de indivíduos resistente aos
234 parasitas gastrointestinais (ZVINOROVA et al., 2016). Inúmeros estudos foram e ainda
235 estão sendo conduzidos em busca de genes associados à resistência parasitária de
236 ovinos (BENAVIDES; SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016; SALLÉ et al., 2012).

237 Embora o melhoramento genético voltado para a resistência à infecção parasitária
238 seja uma técnica atraente, há dificuldades de implementação da estratégia nas
239 propriedades, a falta de informação dos produtores, falta de registros de dados e o
240 diagnóstico preciso de animais resistentes são os principais elementos a serem
241 trabalhados para a inicialização do melhoramento genético de ovinos tendo como
242 principal característica observada a resistência aos parasitas gastrointestinais
243 (ZVINOROVA et al., 2016).

244

245 **3.3 Melhoramento genético de ovinos e característica de resistência**

246 Programas de melhoramento de ovinos no Brasil ainda são raros devido a
247 desorganização da cadeia produtiva e desinteresse por parte dos criadores. No Brasil as
248 primeiras avaliações genéticas em ovinos tinham como objetivo a qualidade da lã
249 (OJEDA, 1999), no entanto, o programa de melhoramento obteve somente um alcance
250 regional e foram limitados ao Sul do Brasil.

251 Com a crise internacional do mercado de lã, ocorreu a ascensão da ovinocultura
252 de corte e uma maior visibilidade das raças de ovinos deslanados, dando início ao

253 primeiro trabalho com ovinos de raças localmente adaptadas do Brasil. Entretanto, por
254 falta de adesão de criadores e associações, o projeto foi encerrado cinco anos após seu
255 início (MORAIS, 2000).

256 É importante salientar que antecipadamente à implantação de um programa de
257 melhoramento genético é fundamental definir os objetivos de seleção que resultem em
258 retornos econômicos. Para isso é necessário identificar as características tidas como
259 critério de seleção, que exerçam influência significativa no resultado final. As
260 características normalmente escolhidas para serem utilizadas como critério de seleção
261 são; peso ao nascimento, peso ao desmame, habilidade materna expressa em kg de
262 crias desmamadas, habilidade materna, idade ao primeiro parto, perímetro escrotal, peso
263 e idade ao abate dentre outras (LÔBO; LÔBO, 2007).

264 Trabalhos relacionados à seleção de ovinos baseados no mérito genético dos
265 indivíduos ainda são escassos na literatura (LÔBO; LÔBO, 2007), por este motivo, as
266 tentativas de implantação de programas de melhoramento genético de ovinos são
267 baseadas em programas de melhoramento de outras espécies, onde a característica de
268 resistência aos parasitos gastrointestinais não é incluída para ser utilizada como critério
269 de seleção.

270 Os aspectos genéticos relacionados ao controle de parasitas são interações entre
271 raça, ambiente, herdabilidade e correlações com outras características de interesse, a
272 implementação de programas de melhoramento genético se torna um dos fatores mais
273 importantes a serem levados em consideração o avanço da ovinocultura, já que a
274 interação parasita-hospedeiro ocorre em vários níveis. Os esquemas de seleção podem
275 conferir resistência ou tolerância à infecção (MCMANUS et al., 2014).

276 As vantagens de usar a seleção genética para aumentar a resistência aos
277 parasitas gastrointestinais são positivas uma vez que a mudança genética é permanente,
278 e a expressão do fenótipo é observável durante toda a vida do animal agregando valor
279 potencial ao plantel (BISHOP, 2012). A resistência aos parasitas gastrintestinais é
280 considerada uma característica herdável com estimativas de coeficientes de
281 herdabilidade consistentes (AMARANTE, 2004).

282 Em trabalho realizado por SILVA et al. (2011), os coeficientes de herdabilidade
283 relacionados a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de parasitas variaram entre
284 0,15 a 0,19 e para volume globular de 0,12 a 0,14. No Brasil, um estudo realizado com
285 ovinos da raça Santa Inês, amplamente utilizados em cruzamentos industriais para
286 produção de carne, a estimativa de herdabilidade para OPG foi de $0,19 \pm 0,03$ (OLIVEIRA,
287 2016). Em geral, os estudos realizados em diferentes regiões e países, o valor médio da
288 herdabilidade da resistência avaliada por contagens de OPG, foram estimados em 0,2 –
289 0,3 (BROWN; FOGARTY, 2017; ASSENZA et al., 2014; MCMANUS et al., 2009),
290 sugerindo que a resistência de ovinos pode ser melhorada de forma relativamente rápida
291 por seleção para baixo OPG, não interferindo em outras características de produção
292 importantes (BROWN; FOGARTY, 2017; AMARANTE, 2004).

293 Os mecanismos responsáveis pela manifestação da resistência de ovinos ainda
294 não foram completamente elucidados (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014), no entanto,
295 sabe-se que a característica é de origem complexa e que agrega várias regiões
296 genômicas que atuam por diversos mecanismos de ação determinada por vários genes
297 com efeitos variados, e não por um número limitado de genes com um único papel
298 importante na expressão (BENAVIDES; SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016).

299 A resistência à infecção essencialmente descreve a capacidade do hospedeiro de
300 interagir e controlar o ciclo de vida do parasita, isso pode incluir as probabilidades de
301 estabelecimento de larvas ingeridas, o desenvolvimento do parasita dentro do
302 hospedeiro, mortalidade parasitária e fecundidade do parasita que são mensurados
303 através da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) (BISHOP, 2012).

304 No entanto, dentro de uma população além de animais resistentes e susceptíveis,
305 existem também os animais resilientes ou tolerantes. A tolerância à infecção parasitária
306 é capacidade de um hospedeiro de suportar os efeitos patogênicos da infecção
307 conseguindo manter o desempenho diante de um desafio de doença. Essa categoria
308 geralmente é potencialmente produtiva, no entanto, apresentam contagens de ovos
309 positivo, sendo elas baixas ou altas, este fator pode ser estabelecido por condições
310 ambientais, como por exemplo a nutrição, que apresentam grande influência nas
311 consequências do parasitismo (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014).

312 A identificação de animais resilientes é realizado através de técnicas paralelas ao
313 OPG, peso, condição corporal e análises hematológicas. Segundo BISHOP (2012), a
314 capacidade de criar animais para melhorar a resistência a nematoides é dependente da
315 existência de variação genética entre animais em sua resistência ou tolerância a tais
316 infecções, neste sentido, é fundamental que o criador possa identificar e reproduzir seus
317 animais a partir dos indivíduos mais resistentes.

318

319 **3.3.1 Características indicadoras de resistência aos parasitas**
320 **gastrointestinais**

321 Como mencionado anteriormente, a infecção parasitária é responsável por
322 grandes perdas de produtividade dos animais, podendo até mesmo causar alta
323 mortalidade dentro do rebanho. Em uma população, animais resistentes, resilientes e
324 susceptíveis apresentam respostas fisiológicas diferentes, sendo estas mediadas pela
325 resposta imunológica que por sua vez é regulada por diferentes genes (BENAVIDES;
326 SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016).

327 Para um controle estratégico eficiente ou seleção dos animais resistentes, o
328 diagnóstico correto dos indivíduos é o passo inicial mais importante a ser realizado.
329 Embora existam vários métodos voltados para este objetivo, a baixa precisão ou
330 dificuldades da realização de exames laboratoriais, limita a identificação dos animais que
331 sejam resistentes ao desafio da infecção parasitária.

332 A utilização concomitante de mais de uma variável durante a avaliação dos
333 animais pode fornecer uma identificação mais efetiva dos animais resistentes, resilientes
334 e susceptíveis (BISHOP, 2012; STEAR et al., 2002; SOTOMAIOR, 1997).

335 O OPG, é a característica mais amplamente utilizada como sendo o único
336 indicador de resistência aos parasitas, no entanto, existem várias características
337 indicadoras que podem ser consideradas. No caso de infecção por *Haemonchus*
338 *contortus* a anemia pode ser facilmente identificada usando o volume globular, além
339 disso, os escores de anemia são negativamente correlacionados OPG e positivamente
340 correlacionados com o peso vivo, isto é, diminuindo o OPG é observável o aumentando
341 o volume globular e o ganho de peso vivo do animal (BISHOP, 2012).

342 As características utilizadas como variáveis para seleção possuem
343 particularidades e podem ser influenciadas por fatores ambientais exigindo do avaliador
344 conhecimento durante as avaliações, as correlações entre estas variáveis é essencial

345 para realização do agrupamento dos animais de acordo com a categoria ao qual
346 pertencem.

347 *3.3.1.1 Contagem de ovos por grama de fezes*

348 A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) é o exame laboratorial que
349 quantifica a carga parasitária, é considerada a forma mais direta de avaliação da
350 intensidade da infecção e é utilizada amplamente em avaliações dos animais além de ser
351 extremamente eficiente no diagnóstico de parasitoses gastrintestinais (ATLIJA et al.,
352 2016).

353 O método aplicado para diagnóstico de enfermidades, também é utilizado como
354 ferramenta para a distinção dos animais em resistentes ou susceptíveis às parasitoses
355 gastrintestinais. Os animais resistentes são capazes de, praticamente, eliminar o
356 estabelecimento de infecções parasitárias (possuem quantidade de ovos nas fezes nula
357 ou bem próxima a zero) enquanto os animais susceptíveis apresentam na maioria das
358 vezes grandes presenças de ovos nas fezes (MOLENTO, 2009).

359 O OPG, no entanto, é considerado um método falho na identificação de indivíduos
360 resilientes, animais pertencentes a esta categoria apresentam ovos nas fezes, sejam
361 estas altas contagens ou não, porém tem a capacidade de manter uma boa saúde e
362 produtividade (MOLENTO, 2009). Nestes casos, a identificação de animais resilientes
363 dependem de variáveis concomitantes, que indique o estado fisiológico e produtividade
364 mesmo estando parasitados.

365 Apesar do resultado de OPG ser quantitativo, não há limites nas contagens de
366 ovos que indiquem a necessidade de tratamento. A idade dos animais, estado fisiológico
367 e nutrição são fatores importantes a serem considerados na avaliação do OPG. Durante

368 o período do parto, as contagens de OPG são mais altas (ISSAKOWICZ et al., 2016),
369 assim como observado em animais jovens durante suas primeiras exposições ao parasita
370 (BISHOP, 2012). Todavia, segundo MOLENTO et al. (2004), apesar da significativa
371 margem de variação da quantificação do OPG, essa metodologia ainda é um importante
372 indicativo da presença do parasita. Em programas de seleção para a resistência, o
373 exame de OPG deve ser utilizado com outros métodos de diagnósticos obtendo um
374 resultado mais assertivo (BISHOP, 2012)

375

376 3.3.1.2 Volume globular, hemoglobina e eritrócitos

377 A ação dos nematoides gastrointestinais pode causar processos de anemia e
378 hipoproteinemia, esse fato pode ocorrer devido aos danos principais causados
379 localmente nas regiões parasitadas, a atrofia das vilosidades, espessamento da mucosa
380 e erosão do epitélio são alterações que podem comprometer a digestão e a absorção de
381 nutrientes que resultam em danos nos tecidos intestinais, perda de líquidos tissulares,
382 comprometendo até o consumo de alimento (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014).

383 No entanto, os maiores processos de anemia são causados pelo parasita
384 *Haemonchus contortus*, que devido seu hábito hematófago desencadeia patogenicidade de
385 anemia com quadros hemorrágicos. A anemia pode ser definida pela diminuição do
386 número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do volume globular, suas
387 causas principais são a perda por extravasamento sanguíneo, a destruição eritrocitária
388 ou diminuição da eritropoiese (KERR, 2003).

389 As medidas destes parâmetros sanguíneos são altamente correlacionadas com a
390 resistência a verminose quando o parasito predominante é o *Haemonchus contortus*,

391 dessa forma, a condição de parasitismo reflete diretamente nestes parâmetros. Segundo
392 BIRGEL (2013), as manifestações sintomáticas da anemia são variáveis e dependentes
393 da etiologia e patogênese do processo, do grau e intensidade da anemia e das exigências
394 ou manejo a que os animais afetados estão sujeitos.

395 Os processos homeostáticos tem sido estudados por serem considerados como um
396 possível mecanismo de defesa contribuindo à com a resistência parasitária de ovinos
397 (BENAVIDES; SONSTEGARD; VAN TASSELL, 2016). As adaptações eritropoiéticas,
398 são reconhecidas como mecanismo compensatório, aumentando a produção de
399 eritrócitos que é altamente correlacionado com a hemoglobina e também com volume
400 globular. A função primária dos eritrócitos é o transporte de hemoglobina enquanto o
401 volume globular apresenta a concentração de eritrócitos em determinado volume de
402 sangue.

403 O sexo e idade dos animais exercem influência na produção de células
404 sanguíneas, fator importante a ser considerado durante a seleção de animais que
405 apresentem resistência, resiliência ou susceptibilidade. Em estudo realizado por VENG-
406 PEDERSEN et al. (2002), foi observado que animais jovens tem uma produção mais
407 rápida de eritropoietina. Os machos geralmente apresentam valores de volume globular,
408 hemoglobina e eritrócitos mais altos, uma vez que os hormônios relacionados à
409 reprodução (estrógenos) diminuem a produção de eritropoietina que é responsável pela
410 regulação da eritropoiese (KERR, 2003).

411 Estes parâmetros são de grande importância nos diagnósticos de infecção
412 parasitária, sendo essenciais, principalmente para a identificação de animais resilientes.
413 Em exames de OPG realizados com indivíduos que apresentem a característica de
414 resiliência, a presença de ovos nas fezes é notada, no entanto os parâmetros sanguíneos

415 podem não sofrer alterações, estando dentro do padrão de normalidade da espécie e/ou
416 da raça.

417

418 3.3.1.3 *Leucócitos totais e diferencial de leucócitos*

419 Os mecanismos de imunidade e interações entre o hospedeiro e o parasita durante
420 a infecção é estabelecido pela interação dinâmica entre o sistema imune inato e o
421 adquirido (KARROW et al., 2014).

422 Em ruminantes, a imunidade contra os nematódeos adultos pode se manifestar
423 pela expulsão da população adulta dos vermes, por alterações na morfologia dos
424 parasitas e pela redução na fecundidade das fêmeas. Já a resistência contra as larvas
425 dos nematódeos manifesta-se pela eliminação das larvas infectantes ou pela inibição do
426 desenvolvimento destes parasitas imaturos, fenômeno conhecido como hipobiose
427 (BALIC; VERNON; MEEUSEN, 2000)

428 Esta resposta contra os parasitas, inicia-se a partir do reconhecimento de
429 moléculas produzidas pelos parasitas (antígenos) pelo organismo do hospedeiro, após o
430 reconhecimento o sistema imunológico é ativado, com a participação de células
431 especializadas na defesa que produzem várias substâncias, tais como citocinas e
432 imunoglobulinas (anticorpo) (AMARANTE; RAGOZO; SILVA, 2014).

433 Esse reconhecimento inicial é um dos principais fatores da resistência contra os
434 nematódeos, resultando na elaboração de uma resposta imunológica protetora eficiente.
435 O aparecimento de leucócitos nos locais da infecção tais como eosinófilos, foram
436 consistentemente observados durante o desenvolvimento de imunidade aos nematoides
437 gastrintestinais em ruminantes (AMARANTE et al., 2005; BALIC; VERNON; MEEUSEN,
438 2000) a ação das células leucocitárias são amplamente estudadas, apresentam maioria

439 dos coeficientes de correlação entre os eosinófilos OPG negativo, indicando papel dos
440 eosinófilos na resistência parasitária, ainda que de magnitudes variadas (DAVID et al.,
441 2015; AFONSO et al., 2010; AMARANTE et al., 2005).

442 A atuação dos leucócitos durante a infecção parasitária é representativa na
443 resistência. Entretanto, a habilidade dos animais de suportar a os desafios da infecção é
444 também influenciada por fatores ambientais, destaca-se o estado nutricional e fisiológico
445 do animal que pode interferir na eficiência da reposta imunológica contra quaisquer
446 patógenos.

447

448 *3.3.1.4 Peso e escore da condição corporal*

449 O peso corporal é o principal critério empregado em qualquer sistema de produção
450 por ser considerado uma medida consistente para avaliação da eficiência produtiva dos
451 animais. Na ovinocultura, essa medida é amplamente utilizada e por caracterizar a
452 produtividade dos animais (FERREIRA et al., 2017).

453 No entanto, para a seleção de ovinos resistentes a utilização do peso corporal
454 como única medida de desempenho dos animais, pode incluir erro se não forem tomados
455 os cuidados de observação do estado fisiológico (prenhe ou não prenhe), idade (animais
456 jovens são mais leves), sexo (fêmeas podem ser mais leves que machos) e também as
457 raças utilizadas (lanados ou deslanados). Como solução para os problemas relacionados
458 à utilização do peso dos animais como característica única, adotou-se o escore da
459 condição corporal (ECC), pois representa melhor as diferenças no desempenho animal
460 em comparação ao peso (SANUDO, C., SIERRA, 1986).

461 O ECC é uma medida subjetiva baseada na classificação dos animais em função
462 da massa muscular e da cobertura de gordura realizado por meio de avaliação visual
463 e/ou tátil dos processos espinhosos e transversos presentes na região lombar e que
464 reflete as reservas energéticas dos animais (MACHADO, 2008).

465 As variações do ECC ocorrem devido ao desbalanceamento entre as
466 necessidades nutricionais exigidas e consumidas dos animais. Isto é, quando o consumo
467 de energia é maior do que os requerimentos, o balanço energético é positivo e a ECC
468 mais alto. Logo, em uma situação oposta, onde o consumo é menor do que a demanda
469 energética, o balanço é negativo e o ECC é mais baixo (MACHADO et al., 2008).

470 Estas variações no ECC são observáveis nos ovinos infectados por parasitas
471 gastrointestinais devido à redução drástica da ingestão e/ou absorção de alimentos.
472 Normalmente, escores utilizados nas avaliações da ECC em ovinos variam de 0 a 5 e
473 podem ser utilizados valores intermediários (0,5) quando o ECC do animal para um
474 determinado escore não está muito claro (PUGH, 2004).

475 A utilização do meio ponto é comumente utilizado na avaliação do ECC em animais
476 deslanados (FERREIRA et al., 2017; ISSAKOWICZ et al., 2016). Os ovinos deslanados,
477 principalmente os localmente adaptados do Brasil, apresentam conformidade e
478 desempenho de carcaça inferiores aos animais de raças destinados à produção de carne
479 (FACÓ, et al., 2008), por este motivo é importante que as ferramentas desenvolvidas para
480 melhorar a produção sejam direcionadas considerando as particularidades das raças e
481 suas diversidades.

482

483 **3.4 – A raça Morada Nova**

484 Os ovinos da raça Morada Nova, são considerados como uma das raças
485 localmente adaptadas mais importantes do Brasil (FACÓ et al., 2008). Acredita-se que a
486 formação da raça teve origem a partir do processo de adaptação e seleção de ovinos
487 europeus e africanos trazidas para o Brasil durante o processo de colonização. Segundo
488 (PAIVA et al., 2005), apesar do ovinos Morada Nova serem considerados de origem
489 africana, indivíduos analisados em seu estudo apresentaram haplótipos europeus, no
490 entanto, concluíram que raças africanas são recentemente derivadas ou compartilham
491 haplótipos primitivos com linhagens mitocondriais europeias.

492 Os animais Morada Nova são de pequeno porte e bem adaptados as condições
493 climáticas do semiárido, sua distribuição geográfica concentra-se principalmente na
494 região nordeste do Brasil e sua produção é destacada pela qualidade da pele muito
495 apreciada no mercado internacional (FACÓ et al., 2008). Além disso, apresentam alta
496 capacidade de resistência aos sistemas de produção, boa habilidade materna e
497 resistência às doenças (MCMANUS et al., 2013).

498 Devido este potencial de produção observado inicialmente em estudos, animais
499 foram levados do nordeste com o objetivo de popularizar seu uso nas regiões Sudeste e
500 Centro-Oeste (BUENO et al., 2006), para serem utilizados como raça materna no
501 cruzamento industrial com raças especializadas para produção de carne (SOUZA
502 CARNEIRO et al., 2007).

503 Atualmente ovinos Morada Nova tem sido alvo de pesquisas e suas características
504 estão sendo amplamente exploradas com intuito de fixar sua utilização na ovinocultura
505 comercial. Uma das características de destaque observadas foi sua habilidade em
506 controlar a infecção parasitária. Estes recentes estudos observaram a capacidade dos
507 ovinos em expressarem seu potencial de produção durante os desafios parasitários que

508 incluíam situações críticas, como diferentes épocas do ano (seca ou chuvas) (FERREIRA
509 et al., 2017) e períodos como a prenhez e o parto (ISSAKOWICZ et al., 2016).

510 As raças localmente adaptadas são populares por apresentem maior resistência
511 contra as infecções parasitárias quando comparada à raças consideradas susceptíveis
512 (AMARANTE et al., 2004), por este motivo os cruzamentos com raças exóticas são
513 realizados não apenas para obter cordeiros com melhor carcaça, mas também para
514 melhorar a resposta imunológica contra os parasitas gastrointestinais de animais meio
515 sangue (AMARANTE et al., 1999).

516 Este procedimento, no entanto, é responsável pela perda da diversidade das raças
517 naturalizadas, assim como o acasalamento de indivíduos consanguíneos, aumentando a
518 endogamia dentro dos rebanhos. Atualmente a raça Morada Nova encontra-se em perigo
519 de extinção (MCMANUS et al., 2013) e os poucos centros onde há animais, buscam
520 ampliar a preservação dos recursos genéticos assim como aumentar sua variabilidade e
521 diversidade.

522

523 **3.5 – Diversidade Genética**

524 Ao longo dos anos, os sistemas de produção de produtos de origem animal
525 selecionaram os animais para diferentes características desejáveis, no caso dos ovinos
526 as características de principal interesse foram a lã, leite e carne (AL-MAMUN et al., 2015).

527 No entanto, a busca por melhor produtividade e para atender fatores
528 socioeconômicos, levaram ao uso de cruzamentos que utilizam de genética de animais
529 especializados para o tipo de produtividade desejada e de animais localmente adaptados.

530 As raças adaptadas são incluídas em cruzamentos com o intuito de explorar a

531 adaptabilidade aos sistemas de produção e a baixa exigência dos indivíduos, no entanto,
532 a realização constante e indiscriminada dos cruzamentos causaram uma rápida
533 substituição e erosão das raças locais (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002),
534 colocando em risco a sua sobrevivência (GEBREMICHAEL, 2008).

535 Outra maneira de exercer influência direta nas características e até existência de
536 uma determinada raça, é a realização de acasalamentos de indivíduos que possuam pelo
537 menos um ancestral comum, e como consequência gerando um rebanho endogâmico.
538 Com o aumento da endogamia aumenta-se também a homozigose na população,
539 resultando na depressão endogâmica que pode afetar diretamente o desempenho
540 fenotípico de algumas características, adaptação ambiental e também a resposta
541 imunológica aos diversos agentes patológicos.

542 A capacidade de responder de forma adaptativa aos diferentes desafios dentro
543 dos sistemas de produção, tão valorizado atualmente, dependem principalmente do nível
544 de variabilidade ou diversidade genética das populações utilizadas (MOUSAVIZADEH et
545 al., 2009). Segundo Hall e Ruane (1993) citado por GEBREMICHAEL (2008), doze por
546 cento das raças de ovinos conhecidas em todo o mundo já se extinguiram últimos 100
547 anos, alertando os órgãos responsáveis sobre a inserção de programas de conservação
548 (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002).

549 Os objetivos de conservação dos recursos genéticos dos animais de produção
550 são, evitar a extinção das raças, mantendo a diversidade genética para fornecer as
551 condições adequadas para sua evolução dentro de um sistema de produção em evolução
552 (GANDINI et al., 2004), assim como ampliar seu uso obtendo uma produção mais
553 sustentável, deve ser aplicado não somente para raças com risco de extinção como
554 também sobre aquelas que não estão sendo utilizadas eficientemente

555 (MOHAMMADABADI; ESFANDYARPOOR; MOUSAPOUR, 2017; GEBREMICHAEL,
556 2008).

557 O conhecimento da diversidade genética das populações é importante para o
558 desenvolvimento da produção de forma econômica e ambiental (AL-MAMUN et al., 2015),
559 assim como seu entendimento define e estima as prioridades a serem adotadas por
560 planos de conservação, regional, nacional e até mesmo global.

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575 **4. Referencias**

- 576 AFONSO, V. A. C. et al. Correlações entre padrões hematológicos, parasitológicos e
577 desempenho animal de ovelhas suplementadas com gordura protegida. **Boletim da**
578 **Industria Animal**, v. 67, p. 125–132, 2010.
- 579 AL-MAMUN, H. A. et al. Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five
580 populations of Australian domestic sheep. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 47,
581 n. 1, p. 90, 2015.
- 582 AMARANTE, A. F. T. et al. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal
583 mucosa and blood of Florida Native , Rambouillet and crossbreed lambs. v. 80, p. 311–
584 324, 1999.
- 585 AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Ines , Suffolk and Ile de France sheep to
586 naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120,
587 p. 91–106, 2004.
- 588 AMARANTE, A. F. T. Resistência Genética a Helmintos Gastrintestinais. **V Simpósio da**
589 **Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, p. 1–10, 2004.
- 590 AMARANTE, A. F. T. et al. Relationship of abomasal histology and parasite-specific
591 immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds
592 of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 99–107, 2005.
- 593 AMARANTE, A. F. T.; RAGOZO, A. M. A.; SILVA, B. **Os parasitas de ovinos**. São Paulo:
594 [s.n.].
- 595 AMARILHO-SILVEIRA, F. et al. Resistência ovina frente a nematoides gastrintestinais
596 Resistência ovina frente a nematoides gastrintestinais. **Archivos de Zootecnia** -, v. 64,
597 p. 1–12, 2015.
- 598 ASSENZA, F. et al. Genetic parameters for growth and faecal worm egg count following
599 *Haemonchus contortus* experimental infestations using pedigree and molecular
600 information. **Genetics, selection, evolution : GSE**, v. 46, p. 13, 2014.
- 601 ATLIJA, M. et al. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal
602 nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. **Genetics Selection Evolution**,
603 v. 48, n. 1, p. 4, 2016.
- 604 BALIC, A.; VERNON, B.; MEEUSEN, E. N. T. The Immunobiology of Gastrointestinal
605 Nematode Infections in Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 45, p. 180–241, 2000.
- 606 BARBOSA, C. C. **Perfil de Inovação Farmacêutica Veterinária no Brasil**. [s.l.]
607 Universidade de São Paulo, 2017.
- 608 BASSETTO, C. C.; AMARANTE, A. F. T. Vaccination of sheep and cattle against
609 haemonchosis. **Journal of Helminthology**, v. 89, n. 05, 2015.
- 610 BENAVIDES, M. V.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. Genomic Regions
611 Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. **Trends in**
612 **Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 470–480, 2016a.

- 613 BENAVIDES, M. V.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. Genomic Regions
614 Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. **Trends in**
615 **Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 470–480, 2016b.
- 616 BERTON, M. P. et al. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal
617 parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. p. 1–16, 2017.
- 618 BIRGEL, D. B. Estudo da anemia em ovinos decorrente à verminose gastrintestinal. p.
619 118, 2013.
- 620 BISHOP, S. C. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in
621 small ruminants in tropical production systems. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 741–747, 2012.
- 622 BRITO, D. L. et al. Effect of alternate and simultaneous grazing on endoparasite infection
623 in sheep and cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 485–
624 494, 2013.
- 625 BROWN, D. J.; FOGARTY, N. M. Genetic relationships between internal parasite
626 resistance and production traits in Merino sheep. **Animal Production Science**, v. 57, n.
627 2, p. 209–215, 2017.
- 628 BUENO, M. S.; CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E. **Morada Nova: uma raça com potencial**
629 **para produção de carne.**
- 630 COSTA, R. L. D. et al. Performance and nematode infection of ewe lambs on intensive
631 rotational grazing with two different cultivars of *Panicum maximum*. **Tropical Animal**
632 **Health and Production**, v. 39, n. 4, p. 255–263, 2007.
- 633 COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses
634 gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil.
635 **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2011.
- 636 DAVID, C. M. G. et al. Sugarcane and mulberry silage supplementation of sheep during
637 the peripartum period. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 4, p. 765–772,
638 2015.
- 639 DE ALBUQUERQUE, A. C. A. et al. Development of *Haemonchus contortus* resistance in
640 sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. **Veterinary**
641 **Parasitology**, v. 246, n. September, p. 112–117, 2017.
- 642 EGITO, A.; MARIANTE, A S.; ALBUQUERQUE, M. Programa Brasileiro de Conservação
643 de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 39–52, 2002.
- 644 FACÓ, O., PAIVA, S.R., ALVES, L.R.N., LÔBO, R.N.B., VILLELA, L. C. V. **Raça Morada**
645 **Nova : Origem, características e perspectiva.** Sobral, CE: [s.n.].
- 646 FERREIRA, J. B. et al. Performance, endoparasitary control and blood values of ewes
647 locally adapted in semiarid region. **Comparative Immunology, Microbiology and**
648 **Infectious Diseases**, v. 52, n. December 2016, p. 23–29, 2017.
- 649 FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides
650 gastrintestinais de pequenos ruminantes: Avanços e limitações para seu diagnóstico.
651 **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

- 652 GANDINI, G. C. et al. Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds
653 in Europe. v. 91, p. 173–182, 2004.
- 654 GEBREMICHAEL, S. G. **Sheep resources of Ethiopia: genetic diversity and breeding**
655 **strategy**. [s.l: s.n.].
- 656 ISSAKOWICZ, J. et al. Parasitic infection, reproductive and productive performance from
657 Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 96–103, 2016.
- 658 KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: A status report.
659 **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477–481, 2004.
- 660 KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and
661 anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1–2, p. 70–78, 2012.
- 662 KARROW, N. A et al. Review : Genetics of helminth resistance in sheep. **Canadian**
663 **Journal of Animal Science**, v. 1, p. 1–9, 2014.
- 664 KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and
665 hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity.
666 **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 218–227, 2013.
- 667 KEANE, O. M. et al. Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and
668 susceptible to gastrointestinal nematodes. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1–12, 2006.
- 669 KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. 2 edição ed. [s.l: s.n.].
- 670 LÔBO, R. N. .; LÔBO, A. M. B. . Melhoramento genético como ferramenta para o
671 crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.
672 31, n. 2, p. 247–253, 2007.
- 673 MACHADO, R. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de
674 ruminantes 57. p. 1–16, 2008.
- 675 MACKINNON, K. M. et al. Gene expression profiles of hair and wool sheep reveal
676 importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance to *Haemonchus*
677 *contortus*. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 2074–2082, 2015.
- 678 MALLMANN, P. M. et al. Resistance to monepantel in multiresistant gastrointestinal
679 nematodes in sheep flocks in Rio Grande do Sul. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 39, n. 5,
680 p. 2059–2070, 2018.
- 681 MAVROT, F.; HERTZBERG, H.; TORGERSON, P. Effect of gastro-intestinal nematode
682 infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. **Parasites &**
683 **Vectors**, v. 8, n. 1, p. 557, 2015.
- 684 MCMANUS, C., LOUVANDINI, H., PAIVA, S.R., DE OLIVEIRA, A.A., AZEVEDO, H.C.,
685 DE MELO, C. B. Genetic factors of sheep affecting gastrointestinal parasite infections in
686 the Distrito Federal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 308–313, 2009.
- 687 MCMANUS, C. et al. Genetic factors of sheep affecting gastrointestinal parasite infections
688 in the Distrito Federal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 3–4, p. 308–313, 2009.

- 689 MCMANUS, C. et al. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their
690 relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation.
691 **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2013.
- 692 MCMANUS, C. et al. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in
693 livestock. **Parasite**, v. 21, n. 56, p. 1–15, 2014.
- 694 MCMANUS, C.; PAIVA, S. R.; ARAÚJO, R. O. DE. Genetics and breeding of sheep in
695 Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236–246, 2010.
- 696 MOHAMMADABADI, M.; ESFANDYARPOOR, E.; MOUSAPOUR, A. Using Inter Simple
697 Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep.
698 **Journal of Reseach and Development**, v. 5, n. 2, p. 1–4, 2017.
- 699 MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção
700 por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1139–
701 1145, 2004.
- 702 MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural
703 practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 3, p. 229–234, 2009.
- 704 MORAIS, O. . **O MELHORAMENTO GENÉTICO DOS OVINOS NO BRASIL: SITUAÇÃO**
705 **ATUAL E PERSPECTIVAS PARA O FUTURO**. (Anais In: SIMPÓSIO NACIONAL DE
706 MELHORAMENTO ANIMAL, Ed.)III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal.
707 **Anais...**Belo Horizonte, MG: 2000
- 708 MOUSAVIZADEH, A. et al. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian
709 Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-
710 SSCP). **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 51–53, 2009.
- 711 MUNIZ, M. et al. Application of genomic data to assist a community-based breeding
712 program: A preliminary study of coat color genetics in Morada Nova sheep. **Livestock**
713 **Science**, v. 190, p. 89–93, 2016.
- 714 NORDI, E. C. P. et al. Supplementation of moist and dehydrated citrus pulp in the diets of
715 sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the
716 parasitological parameters and performance. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p.
717 532–539, 2014.
- 718 OJEDA-ROBERTOS, N. F. et al. Phenotypic expression of parasite susceptibility to
719 *Haemonchus contortus* in Pelibuey sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 239, n. October
720 2016, p. 57–61, 2017.
- 721 OJEDA, D. . Participação do melhoramento genético na produção ovina. **Revista**
722 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 2, p. 146–149, 1999.
- 723 OLIVEIRA, E. J. **Crêterios de seleção para característias de importãncia econômica**
724 **em ovinos da raça Santa Inês**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.
- 725 PAIVA, S. R. et al. Origin of the Main Locally Adapted Sheep Breeds of Brazil : a Rflp-Pcr
726 Molecular Analysis. **Archivos de Zootecnia**, v. 54, p. 395–399, 2005.
- 727 PAIVA, S. R. et al. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal

- 728 genetic resources: The case of Brazilian Somali hair sheep. **Tropical Animal Health and**
729 **Production**, v. 43, n. 7, p. 1449–1457, 2011.
- 730 PANZIERA, W. et al. Caracterização das lesões parasitárias de ovinos observadas na
731 linha de abate. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1491–1504, 2018.
- 732 PUGH, D. G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. Roca ed. São Paulo: [s.n.].
- 733 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária:**
734 **um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9^a ed ed.
735 Rio de Janeiro: [s.n.].
- 736 RIGGIO, V. et al. Genome-wide association and regional heritability mapping to identify
737 loci underlying variation in nematode resistance and body weight in Scottish Blackface
738 lambs. **Heredity**, v. 110, n. 5, 2013.
- 739 RODRIGUES, C. A. F. et al. Avaliação do consumo e de metabólitos plasmáticos de
740 cabras gestantes com duas condições corporais alimentadas com dietas formuladas com
741 diferentes níveis de energia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 945–952,
742 2007.
- 743 SALLÉ, G. et al. A genome scan for QTL affecting resistance to *haemonchus contortus* in
744 sheep. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 13, p. 4690–4705, 2012.
- 745 SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T. Veterinary Parasitology
746 Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary**
747 **Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 277–284, 2012.
- 748 SANUDO, C., SIERRA, I. Calidad de la carnal em la especie ovina. **Ovino**, v. 1, p. 127–
749 153, 1986.
- 750 SAYERS, G.; SWEENEY, T. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of
751 the alternatives to anthelmintics in parasite control. **Animal Health Research Reviews**,
752 v. 6, n. 02, p. 159–171, 2005.
- 753 SCOTT, I. et al. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and
754 *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 198, n. 1–2, p. 166–171,
755 2013.
- 756 SILVA, M. V. B. et al. Identification of quantitative trait loci affecting resistance to
757 gastrointestinal parasites in a double backcross population of Red Maasai and Dorper
758 sheep. 2011.
- 759 SOTOMAIOR, C. S. Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos
760 resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrintestinais. n. October 2004, 1997.
- 761 SOTOMAIOR, C. S.; TANGLEICA, L.; KAIBER, B. K. IDENTIFICAÇÃO DE OVINOS E
762 CAPRINOS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AOS Identification of Sheep and Goats
763 Resistant or Susceptible to Gastrointestinal Parasites. v. 5, p. 397–412, 2007.
- 764 SOUZA CARNEIRO, P. L. et al. Desenvolvimento ponderal e diversidade fenotípica entre
765 cruzamentos de ovinos Dorper com raças locais. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.
766 42, n. 7, p. 991–998, 2007.

- 767 STEAR, M. J. et al. Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta*
768 in Scottish Blackface lambs. **Parasitology**, v. 124, p. 553–560, 2002.
- 769 URIARTE, J.; LLORENTE, M. M.; VALDERRÁBANO, J. Seasonal changes of
770 gastrointestinal nematode burden in sheep under an intensive grazing system. **Veterinary**
771 **Parasitology**, v. 118, n. 1–2, p. 79–92, 2003.
- 772 VENG-PEDERSEN, P. et al. An integrated pharmacodynamic analysis of erythropoietin,
773 reticulocyte, and hemoglobin responses in acute anemia. **Pharmaceutical Research**, v.
774 19, n. 11, p. 1630, 2002.
- 775 VERÍSSIMO, C. J. et al. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São
776 Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 209–216, 2012.
- 777 VIANA, J. G. A.; MORAES, M. R. E.; DORNELES, J. P. Dinâmica das importações de
778 carne ovina no Brasil : análise dos componentes temporais Dynamics of imports of sheep
779 meat in Brazil : analysis of temporal components. **Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2223–
780 2233, 2015.
- 781 VIDAL, M. D. F. et al. Análise econômica da produção de ovinos em lotação rotativa em
782 pastagem de capim tanzânia (*Panicum maximum* (Jacq)). **Rev. Econ. Sociol. Rural**, v.
783 44, n. 4, p. 802–818, 2006.
- 784 VLASSOFF, A.; MCKENNA, P. B. Nematode parasites of economic importance in sheep
785 in New Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 21, p. 1–8, 1994.
- 786 WALLER, P. J.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus* : Parasite problem No .
787 1 from Tropics - Polar Circle . Problems and prospects for control. v. 22, n. 1, p. 131–137,
788 2005.
- 789 WILKIE, H. et al. A candidate gene approach to study nematode resistance traits in
790 naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. December 2016, p. 71–74,
791 2017.
- 792 ZVINOROVA, P. I. et al. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the
793 potential in low-input/output small ruminant production systems. **Veterinary**
794 **Parasitology**, v. 225, p. 19–28, 2016.
- 795
- 796
- 797
- 798
- 799
- 800
- 801
- 802

1 **5. CAPÍTULO 2.**

2

3

4 **Categorization phenotypical of indigenous ewes as a resistant, resilient and**
5 **susceptible to gastrointestinal nematodes**

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22 ABSTRACT

23 The controlling of gastrointestinal verminosis of small ruminants is a major challenge in
24 sanitary management and became a greater problem due to the resistance to
25 anthelmintics documented in worldwide. The economic losses caused by the parasite
26 infection generated demand for alternatives of non-chemical control, such as the selection
27 of animals genetically resistant. The objective of this study was to identify which
28 characteristics best describe the resistant, resilient and susceptible animals to the
29 gastrointestinal nematodes. 61 Morada Nova ewes were evaluated. The variables weight,
30 body condition score (BCS), packed cell volume (PCV), hemoglobin (HGB), white blood
31 cell (WBC), segmented neutrophils (Seg Neut), lymphocytes (Lymph), eosinophils
32 (Eosin), monocytes (Mono) and number of parasite eggs per gram of feces (FEC) were
33 measured individually every 14 days, making ten samples per ewe. The variables, which
34 did not meet the assumption of normality, were transformed (log-10), all variables,
35 analysis of variance was carried considering repeated measures. The network correlation
36 was constructed. Based on analyzes performed, 45% of the animals were resistant to
37 43.3% resilient and 11.7% susceptible. Through characteristics linked to parasitic infection
38 showed variations among the categories that helped to identify resistant, resilient and
39 susceptible sheep to gastrointestinal nematodes. Trichostrongylidae eggs, BCS, PCV and
40 eosinophil counts were found to be good indicators of naturally infected ewes and it was
41 possible to observe a significant difference between the categories and correlations
42 between the characteristics.

43

44

45

46

47

48

49 **Keywords:** nematodes, hematology, *Ovis aries*, network correlation.

50 INTRODUCTION

51 The management of sheep on pasture is common in the production of the
52 commercial type, because of it, the animals are constantly exposed to the challenge of
53 infection by gastrointestinal parasites, the main responsible for production losses and is a
54 serious problem in sheep production.

55 The most economically important gastrointestinal parasites of sheep in tropical and
56 subtropical regions are *Haemonchus contortus*, infection by this parasite can cause from
57 the decrease performance of the animals and even their death (MACKINNON et al.,
58 2015). Treatment with anthelmintics is the most popular control strategy among producers
59 and is considered one of the largest production costs in different countries (Vlassoff &
60 Mckenna, 2010).

61 In addition to the excessive spending on the anthelmintics purchase, the search for
62 the elimination of parasites, led the farmers to increase the number of deworming and
63 using different chemicals found in the market, this action has a negative impact on the
64 production system, contributing to the selection of drug-resistant parasite population
65 (Manikkavasagan *et al.*, 2015; Brom *et al.*, 2013). Due to this, studies began looking for
66 alternatives that could help reduce the use of anthelmintics and also reduce the losses
67 caused by parasitic infections (VALILOU et al., 2015).

68 The selection of animals that show inherent resistance, combined with other control
69 strategies may be one of the most promising approaches in parasitic control (Brown &
70 Fogarty, 2017). Resistance to gastrointestinal parasites is not an absolute characteristic
71 nor is it limited to breeds, due to the variability between and within herds. However, some
72 breeds may be more adaptable and have better responses to the infection challenge
73 (MACKINNON et al., 2015).

74 The Morada Nova is one of the main indigenous hair sheep breeds of northeast
75 Brazil (MUNIZ et al., 2016), although it is little known, McManus *et al.* (2009) highlighted
76 their potential for use in intensive meat production, taking into account the resistance of
77 the sheep to the worms and having a good reproductive performance, producing heavier
78 lambs at birth and at weaning in industrial crosses, as observed by Issakowicz *et al.*
79 (2016)

80 The host resistance is measurable through their performance after the infection
81 challenges. The performance of an animal can be evaluated through productive
82 characteristics, the clinical condition observed, immunological responses and
83 characteristics directly related to the parasite, as a stool eggs count (FERREIRA et al.,
84 2017).

85 Resolution of whether there are unfavorable relationships between fecal egg count
86 and productive traits, and under what conditions they may exist, is one of the most
87 important aspects facing sheep genetic research (VALILOU et al., 2015). Thorough
88 knowledge of the genetic and immunological mechanisms of the relationship could
89 suggest methods by which both production and parasite resistance might be improved
90 expeditiously.

91 Based on knowledge phenotypic markers used to identify physiological changes
92 due parasitic infection, this study aimed to evaluate the differences in phenotypic
93 characteristics that best described sheep in resistant, resilient and susceptible to a
94 gastrointestinal parasite.

95

96 **MATERIAL AND METHODS**

97 **Locale, animals, and management.**

98 This study was conducted at Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Zootecnia
99 Diversificada, at Instituto de Zootecnia, of Agência Paulista de Tecnologia dos
100 Agronegócios (APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, located in Nova
101 Odessa, São Paulo state (22°42' S and 47°18' W). This animal experimentation was
102 performed with the approval of the Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA-UENF)
103 according to the Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio
104 Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) with protocol n°317.

105 According to the Köppen classification, the climate in the Nova Odessa region is
106 Cwa, characterized as tropical with relatively rainy and hot summers and dry winters. The
107 average rainfall is 1,317 mm per year and the temperature is between 10° C and 35° C,
108 with an average of 26 ° C. The average annual relative humidity is approximately 75%.

109 A total of 61 adult ewes of Morada Nova breed with an average of 3 years old and
110 30kg average weight were used in this study. The animals were naturally infected and
111 handled under rotational grazing in pastures formed by *Panicum maximum* Jacq. Cv.
112 Aruana and cv Tanzania, with access to water and mineral mixture *ad libitum*.

113

114 **Collecting samples and evaluating animals**

115 Blood and stool samples were collected every 14 days, at which time the sheep
116 were also weighed and evaluated for body condition. The data were collected
117 continuously for six months including drought (June-August) and rainfall (September-
118 November) period.

119 The body condition score was determined by palpation of the lower back, giving
120 values in a scale from 1 to 5 (Sanudo & Sierra, 1986) also using half-point scoring
121 according to (PUGH, 2004). Parasitological and hematological analyses were performed
122 at the Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/APTA.

123 **Parasitological examinations**

124 Stool samples were collected directly from the rectum for counting fecal eggs
125 counts (FEC) according to the modified technique Gordon & Whitlock (1939), while
126 cultivation of infective larvae for later identification of the parasite genera was performed
127 by fecal culture (Roberts, & O'sullivan, 1950).

128 **Hematological analysis**

129 Blood samples were collected by venipuncture of the jugular vein from all animals
130 in Vacutainer tubes (5 ml) containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The
131 analysis of packed cell volume (PCV); hemoglobin (HGB); white blood cell (WBC); and
132 red blood cell (RBC), were measured with an electronic hematological analyzer (Sysmex
133 poch-100iV Diff, Europe). They were performed to identify blood and differential count of
134 segmented neutrophils (Seg Neut), lymphocytes (Lymph), eosinophils (Eosin), monocytes

135 (Mono), basophils (Baso) and rods (Bast) (Schalm and Carroll, 1986). There were no rods,
136 so this parameter was removed from the statistical analysis.

137 **Animals categories classification**

138 To obtain a better observation of the phenotypic differences related to responses
139 to gastrointestinal parasites, the animals were separated into groups based on the results
140 of the tests performed. For the classification of resistant, resilient and susceptible animals,
141 classification criteria were based on fecal egg count (FEC), considering
142 Trichostrongylidae, PCV and weight.

143 These characteristics were initially chosen to recognize the animals that could
144 remain free of infection through the FEC. PCV to check the physiological state of the
145 animal, since the most pathogenic parasite has a hematophagous habit and the weight
146 confers the production of the parasitized animal or not. The FEC and PCV values of each
147 category were determined according to the minimum and maximum values observed in
148 the herd and the repeatability of the animals in keeping themselves free of infection.

149 The following categories were 1-Resistant animals showed low FEC (0-500), PCV
150 values above 25%, and little or no weight variation; 2- Resilient animals had an FEC count
151 of 0 to 3000 eggs, constant or recurrent infection, high PCV values (above 25%), little or
152 no weight variation and 3- Susceptible animals presented constant infection with FEC
153 values between 100 and 8000, were constantly infected, presented low values of PCV
154 (below 25%) and weights oscillations.

155

156 **Statistical analysis.**

157 The assumption of normal distribution of all variables was verified. The variables,
158 white blood cells, segmented neutrophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes,
159 trichostrongylidae, Strongyloides spp, Moniezia spp and Eimeria spp, which did not meet
160 the assumption of normality, were transformed ($\log^{-10}+1$). The means presented are
161 original scale.

162 For all variables, analysis of variance was carried out the PROC UNIVARIATE,
163 SAS, considering repeated measures. The model considered the effect of weight as a

164 covariate in addition to the effects of categories, season and their interaction. The means
165 were compared by the Tukey test considering 5% probability. The Pearson correlation
166 coefficients were calculated for the characteristics of weight, body condition score, feces
167 eggs count, red blood cell, hemoglobin, packed cell volume, white blood cell, segmental
168 neutrophils, lymphocytes, eosinophils, and lymphocytes.

169 For the construction of the networks, we used Pearson correlations between the
170 phenotypic means of pairs of characteristics. Correlation networks offer another way to
171 investigate the pairwise correlations and consist of a set of nodes connected by a system
172 of edges. The thickness of edges was controlled by applying a cut-off value equal to 0.3,
173 meaning that only $|r_{ij}| \geq 0.3$ have their edges highlighted and the proximity between nodes
174 (characteristics) is proportional to the value of correlation between those nodes. Positive
175 correlations were colored in dark green, whereas the negative ones were depicted in red.
176 The analyses were performed using the software R version 3.1.2 (R Core Team, 2015).
177 The correlation network procedure was done using the package “qgraph” (EPSKAMP et
178 al., 2012).

179

180 RESULTS

181 In the parasitological evaluation, was found different types of eggs
182 (Trichostrongylidae, *Strongyloides* spp, *Moniezia* spp) and oocysts (*Eimeria* spp.).
183 According to the results of coproculture, the most prevalent larval genus found was
184 *Haemonchus* spp. (92.3%) followed by the genera *Trichostrongylus* spp. (3.4%), *Cooperia*
185 spp. (3.1%) and *Oesophagostomum* spp. (1.2%).

186 For the separation of the categories, only counts of Trichostrongylidae eggs were
187 considered, the evaluation of PCV and weight. Maximum values up to 8000 FEC were
188 observed, while some animals maintained very low or zero FEC during all evaluations.
189 From this, 45% of the animals were categorized as resistant, 43.3% resilient and 11.7%
190 susceptible.

191 There were no statistical differences ($p > 0.05$) for the FEC and VG characteristics
192 due to the season of the year, therefore, the analyzes were not separated in drought and

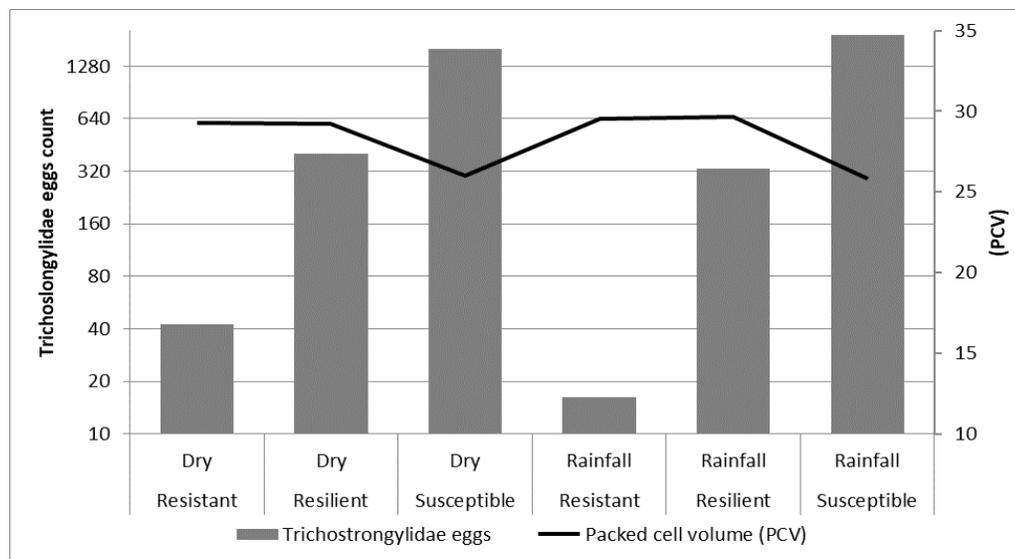
193 rainy period. Figure 1 shows the difference of infection degree by Trichostrongylidae
 194 among the categories during the dry and rainy season.

195 Averages for weight (table 1) were statistically similar ($p > 0.05$) between resistant
 196 (31.5 ± 3.6 kg) and resilient (31.5 ± 5.5 kg), however different of susceptible category
 197 ($p < 0.05$) with lower weight values (26.5 ± 2.7 kg). For BCS, variations were observed, and
 198 the categories were different among them 2.19 ± 0.6 , 1.9 ± 0.7 and 1.3 ± 0.5 ($p < 0.05$), for
 199 resistant, resilient and susceptible, respectively.

200 The overall mean FEC for Trichostrongylidae of the three categories were different
 201 statistically ($p < 0.05$) (table 1). There were differences ($p < 0.05$) between the average of
 202 different categories for *Strongyloides* spp.; the susceptible category showed higher
 203 averages while resistant and resilient showed similar averages with lower values, for
 204 *Strongyloides* spp.

205

206 **Figure 1** - Trichostrongylidae eggs counts and packed cell volume of Morada Nova ewes
 207 resistant, resilient and susceptible during dry and rainfall seasons.



208

209

210

211

212

213

214 **Table 1-** Means and standard error of weight, BCS and fecal egg counting (FEC) of
 215 Morada Nova sheep according to the category.

Category	Weight	BCS	FEC			
			Trichostrongylidae	<i>Strongyloides</i> spp.	<i>Moniezia</i> spp.	<i>Eimeria</i> spp.
Resistant	31.5±3.6 ^a	2.19±0.6 ^a	29.9±83.7 ^a	0.39±6.2 ^a	0.77±12.5 ^a	60.5±216.9 ^a
Resilient	31.5±5.5 ^a	1.9±0.7 ^b	369.1±561.3 ^b	5.74±50.2 ^a	0±0.0 ^a	171.3±956.7 ^a
Susceptible	26.5±2.7 ^b	1.3±0.5 ^c	1756.9±1954.6 ^c	56.9±336.3 ^b	3.1±14.6 ^a	121.5±24.8 ^a

216 Average followed by different superscript letters in the same column differ by the Tukey's
 217 test ($p < 0.05$). Body condition score = (BCS)

218

219 For the averages of *Moniezia* spp. and *Eimeria* spp. were not observed differences
 220 ($p > 0.05$) among the categories.

221 The hematological variables were different ($p < 0.05$) among the categories (table
 222 2).

223 The average of PCV, HGB, and RBC was similar for the resistant and resilient
 224 categories ($p > 0.05$). The susceptible category showed the lowest value for PCV, HGB,
 225 and RBC, and differed statistically from the other categories ($p < 0.05$).

226 There were no significant differences between the resistant and resilient categories
 227 for WBC, the susceptible category showed the lowest averages for WBC (4.68±1.0%).

228 The Seg. Neut. showed difference just for the resistant category with the lowest
 229 value (42.8±13.0%), the resilient and susceptible categories were similar ($p > 0.05$). There
 230 were no significant differences ($p > 0.05$) among categories for Lymph and Mono. Eosin
 231 showed statistical difference among categories ($p < 0.05$).

232

233

234

235

236

237

238

239

240 **Table 2-** Means and standard error of packed cell volume (PCV), hemoglobin (HGB), red
 241 blood cell (RBC), white blood cell (WBC), segmented neutrophils (Seg Neut),
 242 lymphocytes (Lymph), eosinophil (Eosin), and monocytes (Mono) of Morada Nova
 243 ewes of São Paulo states, Brazil according to the category.

Category	PCV (%)	HGB (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^3$)	Seg. Neut (%)	Lymph (%)	Eosin (%)	Mono (%)
Resistant	29.4 \pm 3.5 ^a	7.76 \pm 0.7 ^a	9.4 \pm 1.0 ^a	6.03 \pm 1.6 ^a	42.8 \pm 13.0 ^a	39.3 \pm 13.1 ^a	16.6 \pm 8.5 ^a	0.9 \pm 1.2 ^a
Resilient	29.3 \pm 2.9 ^a	7.65 \pm 0.8 ^a	9.4 \pm 0.9 ^a	5.71 \pm 1.7 ^a	47.4 \pm 12.4 ^b	37.9 \pm 11.9 ^a	13.7 \pm 7.2 ^b	0.9 \pm 1.2 ^a
Susceptible	25.1 \pm 3.6 ^b	6.81 \pm 0.8 ^b	8.4 \pm 1.1 ^b	4.68 \pm 1.0 ^b	51.8 \pm 13.0 ^b	38.2 \pm 13.7 ^a	9.0 \pm 6.4 ^c	1.0 \pm 1.1 ^a

244 Average followed by different superscript letters in the same column differ by the Tukey's
 245 test ($p < 0.05$)

246

247 The figures 2, 3 and 4 shows the constructed network with pairwise phenotypic
 248 correlations between characteristics of naturally infected animals by gastrointestinal
 249 parasite considering resistant, resilient and susceptible categories. Red lines represent
 250 negative correlations and green represent positive correlations, the width of the line is
 251 proportional to the strength of the correlation. Only the significant characteristics were
 252 demonstrated in the correlation network, the non-significant correlations were extracted
 253 from the network of correlations for a better observation.

254

255 **Resistant**

256 For the resistant category, the correlation between weight and BCS characteristics
 257 was positive and medium magnitude $r=0.46$ ($p < 0.01$).

258 The correlation between BCS and PCV, BCS and HGB were positive ($p < 0.01$) with
 259 a coefficient of medium magnitude ($r=0.24$; $r=0.25$ respectively), on the other hand, the
 260 correlation between weight and PCV was low and not significant ($p > 0.05$).

261 The correlation between PCV and HGB, of the three categories, were positive and
 262 the coefficients were as high as expected ($r=0.89$ resistant, $r=0.88$ resilient and $r=0.97$
 263 susceptible).

264 For resistant the correlation of PCV with Trichostrongylidae was low and not
 265 significative ($r=0.12$ $p > 0.05$), in the same way, it was observed for the correlation between

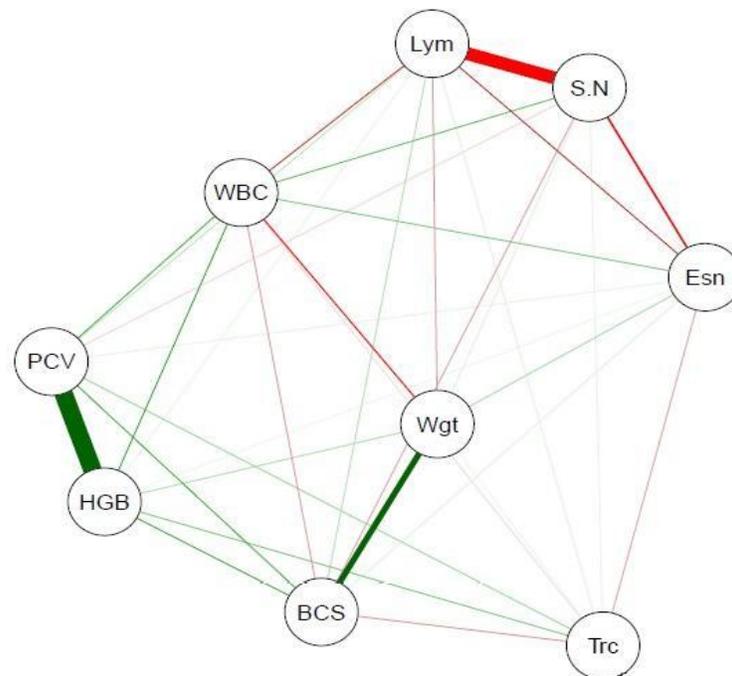
266 HGB and Trichostrongylidae, however, presented a negative correlation, highly significant
 267 with medium magnitude $r=-0.16$.

268 Only in the resistant category, we observed a negative correlation with a medium
 269 magnitude between weight and WBC ($r=-0.34$ $p<0.01$).

270 For WBC and Lymph, a negative correlation with medium magnitude was observed
 271 $r=-0.34$ ($p<0.01$). The correlations of blood characteristics showed a negative correlation
 272 with a high magnitude and highly significant between Seg. Neut and Lymph (-0.74
 273 $p<0.01$), and with Eosin, Lymph obtained a negative correlation with a medium magnitude
 274 and highly significant ($r=-0.30$ $p<0.01$) (figure 2).

275 The correlation of Eosin counts was negative with Trichostrongylidae characteristic
 276 ($r=-0.11$ $p>0.05$).

277



278

279 **Figure 2.** Correlation network of resistant category: Weight (Wgt), body condition score
 280 (BCS), packed cell volume (PCV), hemoglobin (HGB), white blood cell (WBC), segmented
 281 neutrophils (S.Ne), lymphocytes (Lym), eosinophil (Esn) and Trichostrongylidae eggs
 282 (Trc) of Morada Nova ewes of São Paulo states, Brazil.

283

284 Resilient

285 For resilient category we can see strength lines for weight and BCS characteristics,
286 the correlation was positive and high magnitude ($r=0.68$ $p<0.01$), such as the correlations
287 between BCS and PCV, BCS and HGB that shows positive with a high coefficient ($r=0.42$,
288 $r=0.56$ $p<0.01$) (Figure 3). The correlation between weight and PCV was positive and
289 medium magnitude ($r=0.35$ $p<0.01$) just for this category.

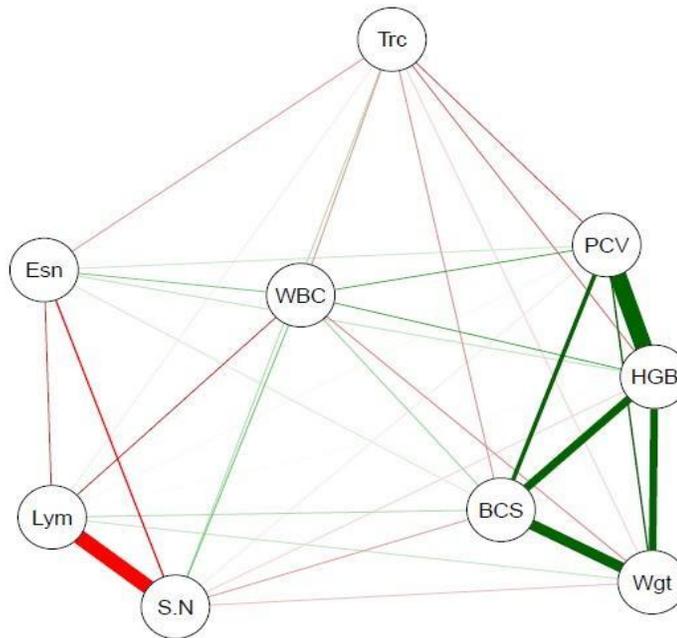
290 The correlation of PCV with Trichostrongylidae ($r=-0.24$ $p<0.01$) was negative,
291 medium magnitude and significant. The correlation between HGB and
292 Trichostrongylidae was negative highly significant with medium magnitude $r=-0.21$
293 ($p<0.01$).

294 Among blood variables the correlation shows, the Lymph characteristic obtained a
295 negative correlation with Eosin with a medium magnitude and highly significant ($r=-0.22$
296 $p<0.01$), and between Seg. Neut and Lymph the correlation was negative with a high
297 magnitude and highly significant between (-0.83 $p<0.01$).

298 The correlation of Seg. Neut and Trichostrongylidae were positive with (0.14
299 $p<0.05$) and Eosin counts was negative with Trichostrongylidae characteristic ($r=-0.17$
300 $p<0.01$).

301

302



303

304 **Figure 3.** Correlation network of the resilient category. Weight (Wgt), body condition score
 305 (BCS), packed cell volume (PCV), hemoglobin (HGB), white blood cell (WBC), segmented
 306 neutrophils (S.Ne), lymphocytes (Lym), eosinophil (Esn) and Trichostrongylidae eggs
 307 (Trc) of Morada Nova ewes of São Paulo states, Brazil.

308

309 **Susceptible**

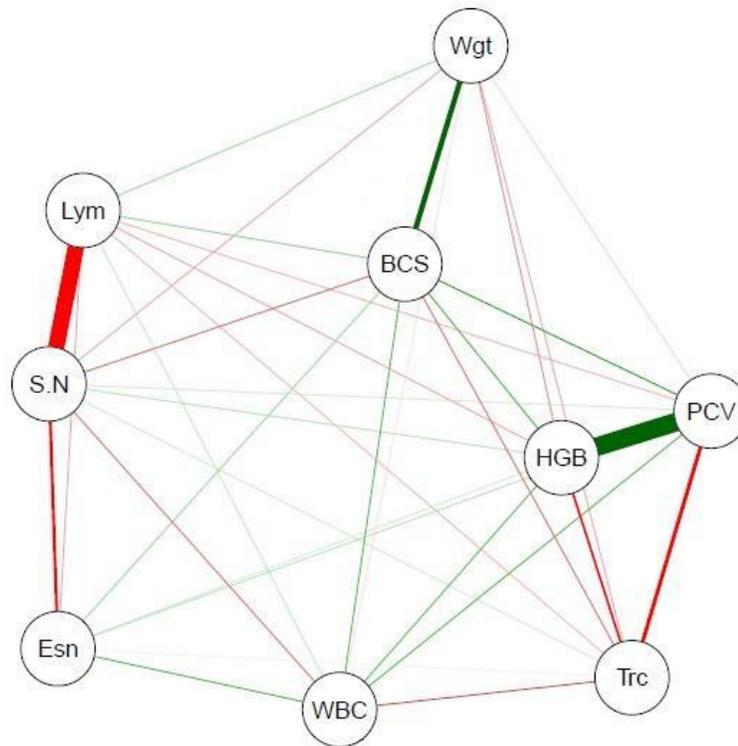
310 The susceptible category shows the most different correlations network. The
 311 weight and BCS correlations were positive and medium magnitude $r=0.47$ ($p<0.01$).

312 Between BCS and PCV was $r=0.45$, BCS and HGB was $r=0.35$, both correlations
 313 were positive, high magnitude coefficient and highly significant. The correlations of PCV
 314 with Trichostrongylidae and HGB with Trichostrongylidae were negative, high magnitude
 315 and highly significant ($r=-0.56$ $r=-0.51$ $p <0.01$)

316 Correlation between Lymph and Eosin was negative and with medium magnitude
 317 but did not show significance and correlation of Eosin counts was negative with
 318 Trichostrongylidae characteristic, the susceptible category had a correlation, close to
 319 zero, however not significant ($p>0.05$).

320

321



322

323 **Figure 4.** Correlation network of the susceptible category. Weight (Wgt), body condition
 324 score (BCS), packed cell volume (PCV), hemoglobin (HGB), white blood cell (WBC),
 325 segmented neutrophils (S.Ne), lymphocytes (Lym), eosinophil (Esn) and
 326 Trichostrongylidae eggs (Trc) of Morada Nova ewes of São Paulo states, Brazil.

327

328 DISCUSSION

329 The coproculture results showed no difference between the categories, with the
 330 predominance of *Haemonchus* spp. Innumerous studies have shown that more than 80%
 331 of the parasite load of small ruminants is composed of *H. contortus*. (David *et al.*, 2015;
 332 Nordi *et al.*, 2014; Bassetto & Amarante, 2015), main species that parasitize sheep in
 333 regions with tropical and subtropical climate.

334 The environmental factor generates great influence in the degree of infection, the
 335 rainy periods is considered the most critical of the year. However, even in the absence of
 336 rain, some larvae can move to the plants. In this case, the moisture from the dew may be
 337 sufficient to allow the migration (SANTOS; SILVA; AMARANTE, 2012), and in the dry

338 season, the low supply of forage may affect the immunological response against the
339 parasites, a factor that may influence in the infection. However, in this study, no statistical
340 differences were observed in the degree of infection when compared to the different
341 seasons.

342 It can be explained by the age of the sheep and the exposure to natural infection
343 for a long time, or due to their adaptability. These facts may have influenced the averages,
344 and then there were no statistic differences in different seasons. The susceptible category
345 showed a high infection in both seasons.

346 Throughout the evaluations, it was possible to observe that a small number of
347 animals were highly infected, while most of the animals maintained very low FEC or with
348 no one degree of infection. According to Sotomaior *et al.* (2007), this is due to a large
349 individual difference in the ability to withstand the parasitic challenge.

350 The performance of the animals varied according to the categories, as well as
351 parasitic loads. Usually, the performance of the animals that are responding to the
352 challenge by pathogens is inferior to that of animals free from infection (Mavrot *et al.*,
353 2015; Bishop & Stear, 2003). The weight was statistically similar between the resistant
354 and resilient categories and both were different to the susceptible category, however, in
355 this study was not representative to be adopted alone as a characteristic of selection of
356 parasitic resistance (table 1). The correlation coefficient between the weight
357 characteristics and Trichostrongylidae were low and nonsignificant.

358 On the other hand, among the characteristics of the animals, that can be analyzed
359 only in the field, BCS better represents differences in animal performance than weight and
360 is independent of the physiological condition and the averages among the categories were
361 statistically different (table 1). Although the correlation coefficient between BCS and
362 Trichostrongylidae has been low, BCS has obtained medium and high magnitude with
363 PCV and HGB for all categories, these blood parameters are considered clinical indicators
364 of parasitic infection. Oliveira (2014), in a parasitological evaluation study, emphasized
365 the importance of using the BCS parameter in the characterization of resistant and
366 susceptible animals, reporting correlations between BCS with FEC and with hematological
367 (PCV and HGB) parameters, likewise we have found in our results corroborating with the
368 study reported.

369 It is possible to observe the discrepant differences in the degrees of infection of
370 each category (figure1). The correlations between Trichostrongylidae with PCV and
371 Trichostrongylidae with HGB characteristics, in all categories, show that as
372 Trichostrongylidae increases, the greater is the degree of clinical anemia, caused mainly
373 by the high prevalence of the *H. contortus* parasite (92%). The higher correlation
374 coefficients can be observed for susceptible category ($r=-0,56$ PCV e $r=-0,51$ HGB). The
375 low and nonsignificant correlation between Trichostrongylidae with PCV and
376 Trichostrongylidae with HGB for resistant e resilient categories may have occurred due to
377 their physiological responses to parasite infection. According to Costa *et al.* (2011),
378 resistant animals have the capacity to prevent the infection of the parasites and even to
379 eliminate them after ingestion, while resilient animals are capable of suffering null or low
380 productive losses, and this can be reported by hematological exams.

381 Correlations observed by Afonso *et al.* (2010), between PCV and FEC, reported a
382 low correlation coefficient and considered the possibility of negative correlations being
383 attributed to sensitive animals, and our results corroborated with those found by them.

384 The RBC values followed the PCV and HGB variation among the categories, with
385 similar values for resistant and resilient ($9.4\pm 1.0 \times 10^6/\mu\text{l}$ and $9.4\pm 0.9 \times 10^6/\mu\text{l}$) respectively
386 and lower for susceptible ($8.4\pm 1.2 \times 10^6/\mu\text{l}$), with values slightly below the normality norm
387 for adult sheep ($9-15 \times 10^6/\mu\text{l}$) (Carlos, 2010). The lower values observed for susceptible
388 animals are naturally attributed to pathogenicity caused by *H. contortus* is due to their
389 feeding habit (hematophagous) causing significant reductions in hematological values due
390 to the pathophysiology of the disease.

391 Correlations with RBC were not performed because it is a blood component directly
392 associated with PCV and HGB, and these, in turn, better describe the clinical signs caused
393 by the parasitic infection by *H. contortus* (ISSAKOWICZ *et al.*, 2016), and also because
394 by the fact they suffer greater variations due to physiological factors, such as hormonal
395 actions (DAVID *et al.*, 2015).

396 The WBC averages were similar between resistant and resilient, and different from
397 susceptible with a lower average. The correlation between WBC and Trichostrongylidae
398 was no significative for all categories, however, for the resistant and resilient categories

399 the magnitude values were close to zero ($r=-0.04$ resistant and $r=0.03$ resilient) and for
400 susceptible the magnitude was $r=-0.18$.

401 The WBCs are the first defense mechanism of the animal against the different
402 agents of infection. The differentiation of WBC is linked to the type of the host response
403 to the etiologic agent. The correlation between WBC and Seg. Neut, significant only
404 observed in the resistant category, is possibly attributed to the immune response of the
405 host that is in a challenge situation because they are fully exposed to parasitic infection,
406 whereas resilient and susceptible animals are constantly infected.

407 In ruminants, lymph cells are the most common cells compared to other species.
408 Studies describe the importance of lymphocyte response, differentiation of B lymphocytes
409 into plasma cells and the production of some isotypes and classes of antibodies, such as
410 IgG1 and IgE (MCRAE et al., 2014) in action against parasitic infections, as well as the
411 action of eosinophils at the site of infection (AMARANTE et al., 2005). Currently,
412 lymphocytes are being the target of further studies seeking the immune system
413 mechanism against parasitic infections.

414 The negative correlation of low and highly significant coefficients between Lymph
415 and Eosin in the resistant and resilient categories suggests that there is an immunological
416 response with the possible participation of these two defense cells. In the category
417 susceptible there is low a negative correlation, but not significant among these
418 characteristics. It is not possible to affirm the action of these cells in the immunological
419 response of each category, the number of cells does not necessarily indicate functional
420 activity, it only confers phenotypic differences between the categories.

421 It is possible to observe a statistical difference in the means of Eosin between the
422 categories. The ewes of the resistant group presented a higher mean of eosinophils
423 followed by resilient and the susceptible category, which indicates the participation of
424 these cells in the defense of the animals against the parasites. During parasitic infection,
425 defense cells migrate to the site of infection and have their local action against the
426 parasite. Studies have related that were observed higher numbers of abomasal mucosal
427 eosinophils, mast cells and neutrophils in infected animals compared to non-infected
428 animals (SHAKYA et al., 2011).

429 These findings agree with the observations of Amarante *et al.* (2007), who verified
430 an inverse relationship between the number of inflammatory cells in the small intestine
431 (mast cells, eosinophils, and globular leukocytes) and FEC values. Similarly, Stear *et al.*
432 (2002) reported that the number of blood eosinophils circulating was higher in lambs with
433 lower FEC.

434 The correlation between Eosin and Trichostrongylidae was significant only in the
435 resilient category, ($r = -17$ $p < 0,01$). The resistant category presented a negative
436 correlation of low magnitude and nonsignificant ($r = -11$), while the susceptible category
437 presented a positive correlation close to zero and nonsignificant. This fact may be
438 associated with the migration of Eosin to the infected area, thereby decreasing the amount
439 of circulating Eosin.

440 Buddle *et al.* (1992) observed a significant negative correlation between blood
441 eosinophilia and FEC, which was related to the status of ovine resistance to parasites.
442 According to these authors, eosinophilia would be more associated with the expression of
443 resistance against nematodes, than as an indicator of infection presence, serving to
444 evaluate the immune response.

445 Therefore, eosinophil concentrations may be a useful indicator of resistance to
446 parasite infection in animals that have been continually exposed to infection.

447

448 **CONCLUSION**

449 Using characteristics associated to parasitic infection, it was possible to identify
450 resistant, resilient and susceptible sheep to gastrointestinal nematodes.
451 Trichostrongylidae eggs, BCS, PCV and eosinophil counts were found to be good
452 indicators of naturally infected ewes.

453 The experimental evidence of this study showed that the phenotypic characteristics
454 reported can be used to assess the resistance, resilience and susceptibility status for
455 naturally infected Brazilian indigenous sheep.

456

457 **Acknowledgments**

458 We are grateful for the financial support of the CNPq and Capes for the
459 scholarship.

460 **REFERENCES**

- 461 Afonso VAC, et al. Correlações entre padrões hematológicos, parasitológicos e
462 desempenho animal de ovelhas suplementadas com gordura protegida. **Boletim Da**
463 **Industria Animal**, 67, 125–132, 2010.
- 464 Amarante AFT, et al. Relationship of abomasal histology and parasite-specific
465 immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds
466 of sheep. **Veterinary Parasitology**, 128, 99–107, 2005.
467 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.021>.
- 468 Amarante AFT, Rocha RA, Bricarello PA. Relationship of intestinal histology with the
469 resistance to *T richostongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep **Pesquisa**
470 **Veterinária Brasileira** 1, 27(1), 43–48, 2007.
- 471 Bassetto CC & Amarante AFT. Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis.
472 **Journal of Helminthology**, 89(05), 2015 <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000279>
- 473 Bishop SC & Stear MJ. Modeling Responses to Selection for Resistance to Gastro-
474 Intestinal Parasites in Sheep. **Animal Science**, 64, 469–478, 2003.
- 475 Van den Brom R, et al. Short Communication Multiple anthelmintic resistance of
476 *Haemonchus* resistance, in a Dutch sheep flock. **Veterinary Record** 2013
477 <https://doi.org/10.1136/vr.101700>.
- 478 Brown DJ & Fogarty NM. Genetic relationships between internal parasite resistance and
479 production traits in Merino sheep. **Animal Production Science**, 57(2), 209–215, 2017.
480 <https://doi.org/10.1071/AN15469>
- 481 Carlos MML, 2010. *Bioquímica sérica e eritrograma em ovinos da raça morada nova:*
482 *influência da idade, do sexo e do escore corporal maria.*
- 483 Costa KMFM, et al. Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga
484 parasitária , no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos
485 infectados com nematódeos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 31(12), 1075–1082,
486 2011.

- 487 David CMG, et al. Sugarcane and mulberry silage supplementation of sheep during the
488 peripartum period. **Tropical Animal Health and Production**, 47(4), 765–772, 2015.
489 <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0791-x>
- 490 Epskamp S, et al. Network Visualizations of Relationships in Psychometric Data. **Journal**
491 **of Statistical Software**, 48(4), 2012. <https://doi.org/10.18637/jss.v048.i04>
- 492 Ferreira JB, et al. Performance, endoparasitary control and blood values of ewes locally
493 adapted in semiarid region. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**
494 **Diseases**, 52(December 2016), 23–29, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.05.004>
- 495 Amarante FTA, 2014. *Os parasitas de ovinos*. São Paulo: Editora UNESP, 264.
- 496 Gordon HMCL & Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep
497 faeces. **Council of Scientific & Industrial Research**, 12, 50–52, 1939.
- 498 Issakowicz J, et al. Parasitic infection, reproductive and productive performance from
499 Santa Inês and Morada Nova ewes. **Small Ruminant Research**, 136, 96–103, 2016.
500 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.015>
- 501 Mackinnon KM, Bowdridge SA, Zajac AM, Notter DR. Gene expression profiles of hair
502 and wool sheep reveal importance of Th2 immune mechanisms for increased resistance
503 to *Haemonchus contortus*. **Parasites e Vectors**, 2074–2082, 2015.
504 <https://doi.org/10.2527/jas2014-8652>
- 505 Muniz MMM, et al. Application of genomic data to assist a community-based breeding
506 program: A preliminary study of coat color genetics in Morada Nova sheep. **Livestock**
507 **Science**, 190, 89–93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.06.006>
- 508 Manikkavasagan I, Binosundar ST, Raman M, 2015. Survey on anthelmintic resistance to
509 gastrointestinal nematodes in unorganized goat farms of Tamil Nadu. **Journal of**
510 **Parasitic Diseases**, 39(June), 258–261. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0335-0>
- 511 Mavrot F, Hertzberg H, Torgerson P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on
512 sheep performance: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, 8(1),
513 557, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1164-z>

- 514 McManus C, et al. Genetic factors of sheep affecting gastrointestinal parasite infections
515 in the Distrito Federal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 166, 308–313, 2009.
- 516 McRae KM, McEwan JC, Dodds KG, Gemmell N J. Signatures of selection in sheep bred
517 for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. **BMC Genomics**, 15(1), 637,
518 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-637>
- 519 Nordi ECP, et al. Supplementation of moist and dehydrated citrus pulp in the diets of
520 sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the
521 parasitological parameters and performance. **Veterinary Parasitology**, 205(3–4), 532–
522 539, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.015>
- 523 Oliveira OS, 2014. *Estudo da diversidade genética e análise de associações de*
524 *polimorfismo de nucleotídeo (SNP) com resistência às parasitoses gastrintestinais e*
525 *prolificidade em ovinos da raça Santa Inês* (Doctoral dissertation, Universidade de São
526 Paulo).
- 527 Pugh, DG, 2004. *Clínica de Ovinos e Caprinos* (Roca). São Paulo. 528.
- 528 R Core Team. A language and environment for statistical computing. Retrieved May 10,
529 2018, from <https://www.r-project.org>
- 530 Roberts FHS & O'sullivan JP,. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles
531 infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural**
532 **Research**, 1, 99–102,1950.
- 533 Santos MC, Silva BF, Amarante AFT. Veterinary Parasitology Environmental factors
534 influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 188(3–
535 4), 277–284, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.056>
- 536 Sanudo C & Sierra, I. (1986). Calidad de la carnal em la especie ovina. *Ovino*, 1, 127–
537 153.
- 538 Shakya KP, Miller JE, Lomax LG, Burnett DD. Evaluation of immune response to artificial
539 infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs.
540 **Veterinary Parasitology**, 181(2–4), 239–247, 2011.
541 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.051>

- 542 Sotomaior CS, et al. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis aos
543 helmintos gastrintestinais. Revista **Acadêmica: Ciência Animal**, 5(4), 397-412, 2007.
- 544 Stear MJ, et al. Eosinophilia as a marker of resistance to *Teladorsagia circumcincta* in
545 Scottish Blackface lambs. **Parasitology**, 124, 553–560, 2002.
- 546 Valilou RH, Rafat SA, Notter DR, Shojda D. Fecal egg counts for gastrointestinal
547 nematodes are associated with a polymorphism in the MHC-DRB1 gene in the Iranian
548 Ghezel sheep breed, 6 (March), 1–11, 2011. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00105>
- 549 Vlassoff A & Mckenna PB. Nematode parasites of economic importance in sheep in New
550 Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, 21, 1–8, 2010.
551 <https://doi.org/10.1080/03014223.1994.9517971>
- 552

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Diversity of indigenous sheep of an isolated population

Caroline Marçal Gomes David^{1*}, Celia Raquel Quirino¹, Wilder Hernando Ortiz Vega¹, Aylton Bartholazzi Junior¹, Aparecida de Fátima Madella-Oliveira² and Ricardo Lopes Dias Costa³

Abstract

Background: Because of the influence of genetics on animal production and the risk of losing genetic diversity of naturally adapted breeds, this study evaluated the genetic diversity of sheep of the Morada Nova breed belonging to an animal science institute in Brazil. The herd in question is one of the country's most representative of the breed. Samples of DNA extracted from the plasma of 61 animals were used for later analysis of the genotypes using microsatellite molecular markers.

Results: The polymorphic information content was 0.66, the observed heterozygosity was 0.65 and the fixation index was 0.048. According to the results, there is moderate genetic diversity in the studied population, suggesting the implantation of breeding programs aimed at conservation of the observed genetic diversity.

Conclusion: The results obtained in this study will be of great importance to decisions on herd structure, besides contributing to other work to be carried out at the research center.

Keywords: Genetic improvement, Molecular biology, *Ovis aries*, Polymorphism

Background

Morada Nova is one of the main hair sheep breeds in Brazil. They are small animals that stand out among naturalized sheep breeds due to the good production of meat and hides. Because of traits such as high prolificacy [1], parasite resistance [2] and adaptability to edaphoclimatic conditions, this breed is considered useful for crossbreeding, in particular in industrial breeding programs with breeds having higher zootechnical performance. Morada Nova herds are mostly found in Brazil's northeastern semi-arid region, where they are one of the main sources of income of smallholders [3].

Currently, small herds of Morada Nova sheep can also be found in the Southeast and Midwest of Brazil, populations are distributed mainly in research centers, most frequently in São Paulo state. The Instituto de Zootecnia in the municipality of Nova Odessa has one of the main herds representative of the breed, assisting and monitoring producers them in addition to developing research

in areas like nutrition, health, reproduction and breeding, among others. Since genetics exerts an influence on production indexes, either positive or negative, so the best use of this potential depends on selection, which in turn requires a diversified number of alleles that can favor larger numbers of combinations.

In addition to support for genetic improvement programs, genetic diversity is a determining factor for the conservation of genetic resources and the evolutionary persistence of species. Naturally adapted breeds may be a source of genetic material able to improve resistance of other breeds to unfavorable conditions [4]. The ability of a population to respond adaptively to environmental changes depends on its level of variability or genetic diversity [5, 6].

Genetic diversity of indigenous breeds is a major concern considering the need to preserve what may be irreplaceable richness regarding new productive demands [7]. A species without enough genetic diversity is thought to be unable to cope with changing environments or evolving competitors and parasites [8]. Conservation should be based on thorough knowledge of the genetic resources of the specific breed [9]. Therefore, it is important to genetically characterize indigenous

* Correspondence: carolinedavid.mg@gmail.com

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, 2000, Alberto Lamego Ave, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro 28016-811, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

breeds [9], for which the application of molecular genetics has many important advantages [5].

The aim of obtaining higher animal production rates is impaired by loss of diversity and the introduction of exotic breeds in crosses carried out indiscriminately, modifying the population structure and compromising a breed's existence. Genetic depression due to inbreeding is also an extremely important factor, also impairing herd performance [10].

To maintain diversity, studies need to be conducted to learn the genetic structure of populations. Microsatellite markers are used to estimate parameters of genetic diversity and herd structure in genetic resource conservation programs due to their dominance and high sensitivity [11].

Considering this, the objective of this work was to evaluate the genetic diversity of sheep of the Morada Nova breed belonging to the Instituto de Zootecnia in Nova Odessa, São Paulo. The results obtained in this study will serve as an aid to future research and conservation of the breed.

Results

Of the 15 microsatellite markers tested, just INRA63 did not amplify loci and 14 were polymorphic, for a total of 100 detected alleles. We did not observe the presence of null alleles, that is, all samples amplified the 14 microsatellite loci tested. The mean number of alleles (N_a) was 7.14 and the mean number of effective alleles (N_e) was 3.68. The locus ILSTS08 presented the lowest polymorphism with two alleles and N_e of 1.44, while locus OARFCB304 was the most polymorphic, with N_a 11 and N_e of 7.728.

According to the polymorphic information content (PIC) test, all markers presented PIC above 0.5, considered highly informative, except for the OARAE129 marker, which presented a low PIC of 0.19.

Of the 14 microsatellites tested, seven were in Hardy Weinberg equilibrium with significant p -values: $p < 0.001$ (ETH152, INRA06, OARFCB304); $p < 0.01$ (MAF65, OARAE129); and $p < 0.05$ (CSRD24, ILSTS87). Another seven were not in equilibrium, with $p > 0.05$ (ILSTS08, INRA05, INRA172, MCM42, MCM527, OARCP49 and OARFCB20).

In the evaluation of allelic richness (number of different alleles for the same genome region), the mean value of all markers in this population was 4.51, showing the long-term potential of adaptation and persistence of the population. When observed individually by marker, the lowest values of allelic richness were for the loci ILSTS08 (1.95), OAR129 (2.168) and MCMX42 (3.49), the highest value was in the OAR304 locus (7.06), and the other markers obtained medium values ranging from 4.15 to 5.30.

The mean observed heterozygosity (H_o) in the population was 0.65 while the expected (H_e) was 0.66. The diversity estimates applied for each locus studied are presented in Table 1.

The fixation index (F) reflects the probability that two alleles within the same individual are identical in offspring. Six of the 14 markers tested had negative indices, that is, they were not fixed in the population. For the other markers, two presented moderate indices (ETH152, ILSTS08) and one a high index (OARAE129). The overall mean considering all the microsatellite markers was low ($F = 0.048$).

The 14 microsatellite loci analyzed showed 91 possible combinations, a total of 16 combinations of markers, the genotypes in one locus are not independent of the genotypes in the other locus. Of the 16 combinations in linkage disequilibrium, only one combination was syntenic (Table 2).

The statistical cluster analysis by ascending hierarchical ordering, grouped the 61 animals into two clusters (Fig. 1).

Based on the Evanno method for identification of the ideal K in the analysis of population structure (Fig. 2), the individuals were grouped into two populations ($K = 2$) from the 14 microsatellite markers used in the analysis performed with the Structure software, based on the delineation of clusters of individuals in relation to their genotypes (Fig. 3).

Table 1 Mean number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), observed (H_o) heterozygosity and expected (H_e), Fixation index (F), allele richness (AR)

Locus	N_a	N_e	H_o	H_e	F	AR
CSRD247	7	3.985	0.721	0.746	0.033	5.04
ETH152	6	4.309	0.656	0.768	0.146	5.19
ILSTS08	2	1.441	0.246	0.306	0.196	1.96
ILSTS87	8	4.731	0.820	0.789	-0.039	5.13
INRA05	10	4.678	0.787	0.786	-0.001	5.30
INRA06	7	4.064	0.705	0.754	0.065	5.04
INRA172	9	2.988	0.705	0.665	-0.060	4.96
MASF65	8	3.832	0.705	0.739	0.046	4.51
MCM42	7	2.612	0.672	0.617	-0.089	3.49
MCM527	7	2.967	0.672	0.663	-0.014	4.15
OARAE129	3	1.265	0.131	0.210	0.375	2.17
OARCP49	8	3.585	0.656	0.721	0.091	4.68
OARFCB20	7	3.510	0.787	0.715	-0.100	4.53
OARFCB304	11	7.728	0.852	0.871	0.021	7.06
Mean	7.14	3.68	0.65	0.66	0.048	4.51
SE	0.63	0.42	0.05	0.05	0.034	1.20

breeds [9], for which the application of molecular genetics has many important advantages [5].

The aim of obtaining higher animal production rates is impaired by loss of diversity and the introduction of exotic breeds in crosses carried out indiscriminately, modifying the population structure and compromising a breed's existence. Genetic depression due to inbreeding is also an extremely important factor, also impairing herd performance [10].

To maintain diversity, studies need to be conducted to learn the genetic structure of populations. Microsatellite markers are used to estimate parameters of genetic diversity and herd structure in genetic resource conservation programs due to their dominance and high sensitivity [11].

Considering this, the objective of this work was to evaluate the genetic diversity of sheep of the Morada Nova breed belonging to the Instituto de Zootecnia in Nova Odessa, São Paulo. The results obtained in this study will serve as an aid to future research and conservation of the breed.

Results

Of the 15 microsatellite markers tested, just INRA63 did not amplify loci and 14 were polymorphic, for a total of 100 detected alleles. We did not observe the presence of null alleles, that is, all samples amplified the 14 microsatellite loci tested. The mean number of alleles (Na) was 7.14 and the mean number of effective alleles (Ne) was 3.68. The locus ILSTS08 presented the lowest polymorphism with two alleles and Ne of 1.44, while locus OARFCB304 was the most polymorphic, with Na 11 and Ne of 7.728.

According to the polymorphic information content (PIC) test, all markers presented PIC above 0.5, considered highly informative, except for the OARAE129 marker, which presented a low PIC of 0.19.

Of the 14 microsatellites tested, seven were in Hardy Weinberg equilibrium with significant *p*-values: *p* < 0.001 (ETH152, INRA06, OARFCB304); *p* < 0.01 (MAF65, OARAE129); and *p* < 0.05 (CSRD24, ILSTS87). Another seven were not in equilibrium, with *p* > 0.05 (ILSTS08, INRA05, INRA172, MCM42, MCM527, OARCP49 and OARFCB20).

In the evaluation of allelic richness (number of different alleles for the same genome region), the mean value of all markers in this population was 4.51, showing the long-term potential of adaptation and persistence of the population. When observed individually by marker, the lowest values of allelic richness were for the loci ILST08 (1.95), OAR129 (2.168) and MCMX42 (3.49), the highest value was in the OAR304 locus (7.06), and the other markers obtained medium values ranging from 4.15 to 5.30.

The mean observed heterozygosity (Ho) in the population was 0.65 while the expected (He) was 0.66. The diversity estimates applied for each locus studied are presented in Table 1.

The fixation index (F) reflects the probability that two alleles within the same individual are identical in offspring. Six of the 14 markers tested had negative indices, that is, they were not fixed in the population. For the other markers, two presented moderate indices (ETH152, ILSTS08) and one a high index (OARAE129). The overall mean considering all the microsatellite markers was low (F = 0.048).

The 14 microsatellite loci analyzed showed 91 possible combinations, a total of 16 combinations of markers, the genotypes in one locus are not independent of the genotypes in the other locus. Of the 16 combinations in linkage disequilibrium, only one combination was syntenic (Table 2).

The statistical cluster analysis by ascending hierarchical ordering, grouped the 61 animals into two clusters (Fig. 1).

Based on the Evanno method for identification of the ideal K in the analysis of population structure (Fig. 2), the individuals were grouped into two populations (K = 2) from the 14 microsatellite markers used in the analysis performed with the Structure software, based on the delineation of clusters of individuals in relation to their genotypes (Fig. 3).

Table 1 Mean number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne), observed (Ho) heterozygosity and expected (He), Fixation index (F), allele richness (AR)

Locus	Na	Ne	Ho	He	F	AR
CSRD247	7	3.985	0.721	0.746	0.033	5.04
ETH152	6	4.309	0.656	0.768	0.146	5.19
ILSTS08	2	1.441	0.246	0.306	0.196	1.96
ILSTS87	8	4.731	0.820	0.789	-0.039	5.13
INRA05	10	4.678	0.787	0.786	-0.001	5.30
INRA06	7	4.064	0.705	0.754	0.065	5.04
INRA172	9	2.988	0.705	0.665	-0.060	4.96
MASF65	8	3.832	0.705	0.739	0.046	4.51
MCM42	7	2.612	0.672	0.617	-0.089	3.49
MCM527	7	2.967	0.672	0.663	-0.014	4.15
OARAE129	3	1.265	0.131	0.210	0.375	2.17
OARCP49	8	3.585	0.656	0.721	0.091	4.68
OARFCB20	7	3.510	0.787	0.715	-0.100	4.53
OARFCB304	11	7.728	0.852	0.871	0.021	7.06
Mean	7.14	3.68	0.65	0.66	0.048	4.51
SE	0.63	0.42	0.05	0.05	0.034	1.20

Table 2 The linkage disequilibrium between pairs of microsatellites markers

Locus#1	Locus#2	P-Value	SE	LD	Syteny
ETH152	MAF65	0.0000	0,0000	+	N
INRA06	MCM42	0.0000	0,0000	+	N
INRA172	MCM527	0.0028	0,0021	+	N
INRA172	MAF65	0.0029	0,0021	+	N
OARCP49	OARFCB20	0.0037	0,0025	+	N
MCM527	OARFCB20	0.0079	0,0045	+	N
MAF65	MCM527	0.0110	0,0054	+	N
INRA06	MAF65	0.0116	0,0059	+	N
INRA172	OARCP49	0.0131	0,0082	+	N
INRA05	MCM42	0.0162	0,0059	+	N
MCM42	OARFCB30	0.0167	0,0077	+	N
ETH152	OARAE129	0.0189	0,0059	+	S
INRA05	OARFCB30	0.0208	0,0104	+	N
ETH152	ILSTS87	0.0246	0,0097	+	N
CSRD247	OARFCB30	0.0345	0,0157	+	N
MAF65	OARFCB20	0.0371	0,0152	+	N

P-Value significance = 0,05. SE standard error, N Non-syntenic, S Syntenic

Discussion

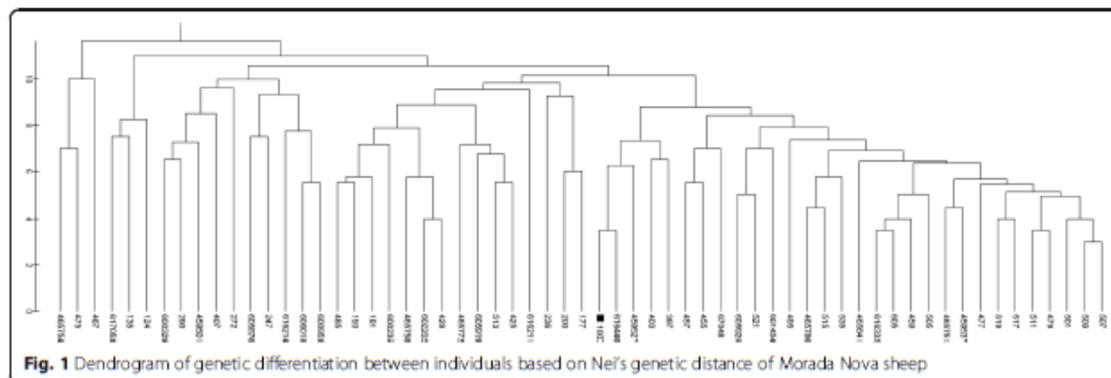
Microsatellite markers are commonly used in paternity tests and are considered an excellent alternative 22 for breed profiling [11, 12], genetic diversity, breeding and conservation programs, [13, 14]. The use of these markers is considered to be reliable because they have characteristics such as high polymorphism, good specificity, high mutation rate and wide genome distribution, besides being easy to analyze [14].

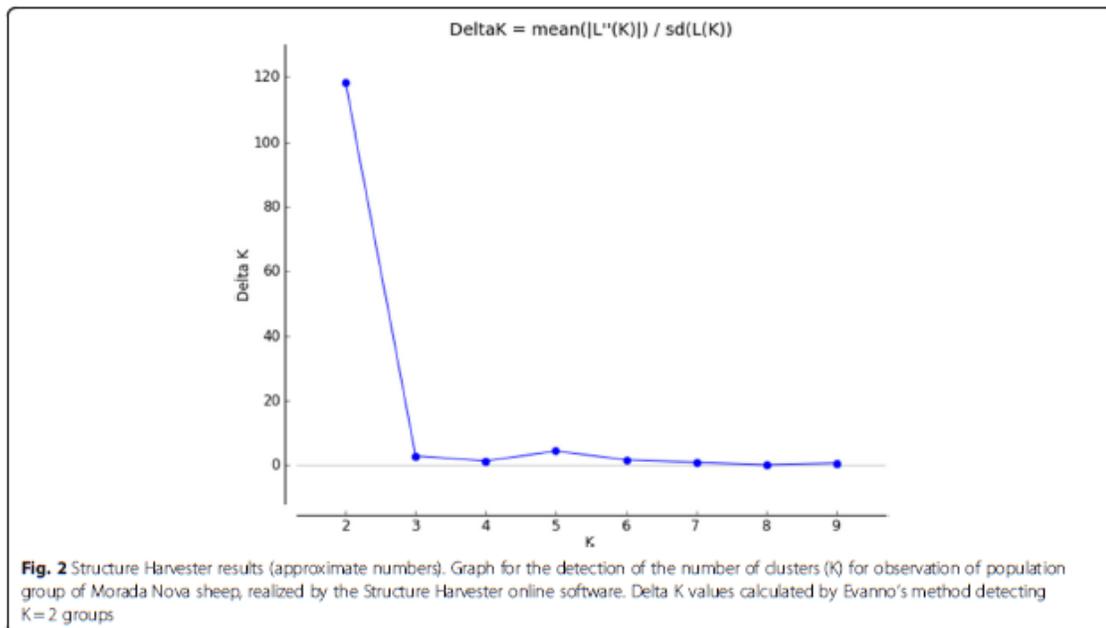
The inter simple sequence repeat (ISSR) technique also presented highly polymorphic loci and has been used previously in genetic diversity studies [9]. These markers are useful to find markers associated with major and minor

genes controlling important traits. Several studies have been conducted on associations of ISSR markers with important characteristics, including sheep production traits [7, 15].

Currently, breeding values in genomic selection are generally predicted based on SNP markers (single nucleotide polymorphism). These have also been used in analyses of genetic diversity [16]. There are more than 54,000 validated SNPs for sheep breeds of major economic interest, including Brazilian breeds such as Morada Nova and Santa Inés (Illumina, San Diego, CA). According to Fischer [17], the potential of SNPs to describe the genetic structure of the population depends heavily on the density of the chips used. However, the high cost to purchase these chips restricts research in countries that have low scientific investment, thus justifying preference for the use of microsatellite markers [18]. In studies using a low number of SNPs and microsatellites, the microsatellites presented similar or better results than SNPs [19, 20].

In this study, the microsatellite markers used reflected the genetic diversity evaluated in the population. The 14 markers were highly informative, with PIC above 0.50. PIC values above 0.50 are considered highly, values between 0.50 and 0.25 are moderately informative and values below 0.25 are considered slightly informative [20]. This high observed value is also an indicative parameter for the classification and selection of the microsatellite used, since these presented efficiencies in the detection of polymorphisms. The locus used in this study are commonly used in paternity test and genetic diversity in sheep and are recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG). The linkage disequilibrium observed between the locus is probably due to the inheritance of common alleles of common lineages. According to Flint-Garcia [21], the mating system of the species (selfing versus outcrossing),



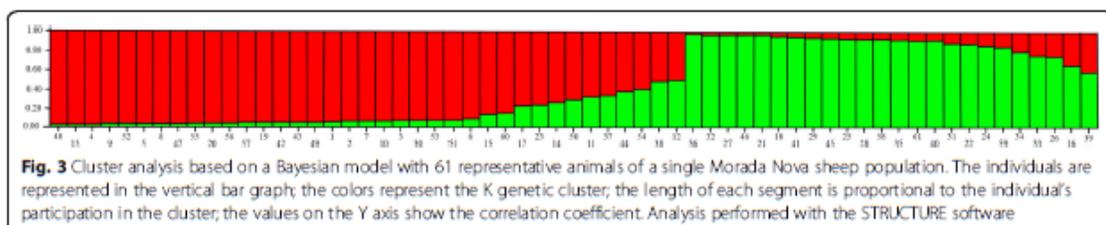


and phenomena such as population structure can strongly influence patterns of LD.

The number of alleles within a population as one of the parameters of genetic diversity and is a major factor in animal production, since a greater number of alleles within a population allows for greater possibilities of recombination. It is common to note that in commercial or geographically isolated herds, selection pressure exerts forces contrary to diversity, leading to genetic drift. However, the herd studied, although new and composed of small sheep, had a high N_a value compared to other studies conducted in different regions analyzing the same breed.

We found 100 alleles, with average number of alleles per locus of (N_a) 7.14. The highest number of allele markers were in OARFCB304, with 11 alleles, and INRA05 with 10 alleles, while least number were in ILST08 and OARAE129, with 2 and 3 alleles respectively. This result indicates that even though the population studied is isolated, the N_a was higher than that described in other studies evaluating Morada Nova herds. In Ceará, 89 alleles (3.28 alleles per locus)

were observed using 17 microsatellite markers in a study performed in 13 different farms [22]. Ferreira [23] used 15 microsatellites, of which, 5 were the same as those studied by us (MAF65, MCM527, INRA172, INRA05, OARF304) in the same breed in a single population, and described N_a of 81 alleles and average of alleles 4.62 per locus. Understanding of the relation between the effective size and the real size of a population is of fundamental importance for planning conservation strategies. The mean number of effective alleles (N_e) was 3.68, a medium value considering the value of N_a (7.14). The loci with lowest N_e values were also the lowest in the observed heterozygosity. The means were higher than those observed in five distinct populations of Kermani sheep, which presented means of $N_a 2.94 \pm 0.23$ and $N_e 2.31 \pm 0.23$ [9]. Even though the mentioned study was carried in different populations, the number of animals was low, which showed a loss of diversity of indigenous animals. The authors emphasized that a better understanding of the potential of native species is necessary to support long-term genetic improvement.



Our study revealed the presence of low allelic richness. The decrease of allelic richness may lead to a reduction in the population's potential for adaptation to future environmental changes, since this diversity is the raw material for evolution through natural selection [17].

The value of 4.51 identified for allelic richness in this study suggests unequal distribution of allelic frequencies with the presence of low-frequency alleles, such as ILST08 (1.96) and OAR129 (2.17). The average of allelic richness observed by GebreMichael [24] was 6.79 for animals of the same breed from different regions. The author observed phenotypic variability among populations and within populations, and attributed this variability as characteristic of traditional populations that were not subjected to a strong selection. However, that author only compared the allelic richness with values reported for other domestic sheep populations, and these values are similar to those observed in our study. On the other hand, the AR values observed by [24] in different breeds were reported to be above 8.0 for six of the seven breeds studied.

Like the AR values, the heterozygosity indices also estimate genetic variation within a population and are one of the most widely used parameters of genetic diversity [25]. Heterozygosity expresses great miscegenation and lower allele fixation. A higher proportion of heterozygous individuals than expected, according to the rate of segregation of a population, is desirable to maintain genetic diversity. The estimates of observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) in this study (0.65 and 0.67, respectively) represented moderate genetic diversity.

Values of H_o (0.53) and H_e (0.59) were attributed to the low diversity of the Morada Nova breed [22]. In that study, the authors used animals from eight farms in three different states. That result indicates that the isolated herd used in our study is representative of the breed, with moderate heterozygosity considering the number of animals studied.

Estimates of diversity in populations of sheep from Colombia presented mostly low heterozygosity, with values of H_o below the values of H_e , with means of 0.68 and 0.77 respectively [26]. In that study, the authors used 513 animals from 13 breeds from 56 farms, and values indicative of diversity were lower than those found in our study. The desired genetic diversity is H_o greater than H_e . Like the values observed in five Kermani sheep populations in Iran, which presented H_e of 0.56 ± 0.06 and H_o of 0.97 ± 0.12 [9]. The authors reported enormous biodiversity among domestic animals in developing countries and warned of the loss of this diversity because of the introduction of different breeds and the importance in conserving naturalized breeds.

One of the main factors that causes loss of heterozygosity is the fixation of alleles of commercial interest and mating directed to obtain higher production rates, common in industrial production. This heterozygosity loss increases with rising number of alleles in homozygosis, resulting in allele fixation. According to the FAO (1998), the estimated value through the fixation index (F) should not exceed 1%. In this study, the estimated value of F was 4.8%. The ETH152, ILSTS08 and OARAE markers presented values of 14.6, 19.6 and 37.5, respectively. These large values indicate high homozygous for these loci and possible loss of alleles. Five markers presented values below 6% and another five negative values, with these also being the loci with highest H_o . This fact can be attributed to the lack of gene flow and rigorous mating control. However, the low number of Morada Nova sheep in this geographic region makes it hard to introduce new genes to increase the diversity.

Likewise, in a study of diversity study of Morada Nova herds located in five Brazilian states including São Paulo, the authors found F values between 4 and 12% and reported consanguinity between the herds [27]. Inbreeding among herds of different regions observed in studies shows that the introduction of animals from different herds alone may not be sufficient to increase the breed's diversity, so intensified conservation work is important.

The Bayesian group factor analysis performed by the Structure software determined the structure of the sheep population studied and presented a population structure clearly divided into two representative groups, with some individuals presenting a mixture of the two gene groups, possibly due to the miscegenation of the main cluster present. This structure is possibly due to the origin of the herd, which was formed of individuals coming from different states.

The ability of the Bayesian algorithm to detect the most probable number of clusters that explain the distribution of the genetic groups of the population studied was based on a model that correlates the allelic frequencies within the population (admixture model). This contributes to the detection of subpopulations or genetic subgroups in a single population when individuals may be particularly related and presents the same detection ability as the independent allele frequency model, such as the absence of high levels of relationship between the individuals or populations evaluated [28].

The structure of the population presented here is important for the maintenance of genetic diversity through the direction of mating. The dendrogram allows observing the animals according to their genetic distance, which facilitates the identification of the best genetic combinations to avoid endogamous mating.

Diversity is conserved by the maintenance of individuals with few genetic relationships. Knowledge about

these relationships helps in the management herds with better use of existing genotypes in breeding programs, besides being fundamental in programs for conservation of genetic resources.

Conclusion

The herd of Morada Nova of the Instituto de Zootecnia presented moderate genetic diversity. Strategies to maintain or increase genetic diversity should be implemented considering the need to preserve what may be irreplaceable richness and the importance of the herd in the conservation of the breed regarding new production demands, mainly as a maternal lineage in industrial mating.

Methods

Locale and population studied

The study was carried out on 61 animals of the Morada Nova breed from the Sheep Unit of the Center for Research and Development of Diversified Animal Husbandry, of the Instituto de Zootecnia, part of the Paulista Agribusiness Technology Agency of the Department of Agriculture, located in Nova Odessa, SP (22° 42' S and 47° 18' W).

DNA extraction and genotyping

DNA was extracted from blood plasma using the commercial NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions, with subsequent quantification of DNA concentrations measured with a spectrophotometer (NanoDrop™ 2000-Thermo Science). The extraction and purification steps were performed at the Animal Genetic Improvement Laboratory of Norte Fluminense State University in Rio de Janeiro.

Genotyping was performed using a capillary sequencer (MegaBACE 1000 DNA Analysis System - GE Healthcare). We used 15 microsatellite markers recommended for identification of kinship and paternity in sheep by the International Society for Animal Genetics (ISAG): CSRD24, ETH152, ILSTS08, ILSTS87, INRA05, INRA06, INRA172, MASF65, MCM42, MCM527, OARAE129, OARCP49, OARFCB20, OARFCB304 AND INRA 63.

Statistical analysis

The GenAlEx software version 6.502 was used to evaluate population genetics, to estimate: number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), fixation index (F); and polymorphic information content analysis (PIC). Linkage disequilibrium was estimated for all marker pairs using GenePop software version 1.2 [29].

The distribution of genetic diversity was studied using the genetic distance analysis of Nei. For the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), Fisher's exact test was

applied. The population allele richness (A_R) measure of the 14 markers was estimated using the HP-RARE 1.0 software. Using Nei's genetic distance matrix with standardized data the dendrogram was constructed from the unweighted pair group method with arithmetic mean using the software MEGA-5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

The population structure was analyzed using the software STRUCTURE 2.3.4, which employs functions based on Bayesian clustering algorithms, considering a mixed ancestry model (admixture model) and correlating the allelic frequency in the population. The burn-in period was 200,000 rounds followed by 500,000 Monte Carlo Markov Chain interactions. To observe numbers of possible clusters in the population, the independent "K" test was performed from 1 to 10 clusters with 20 replicates, thus verifying the consistency of the results. The ideal "K" value was evaluated after the analysis of the result file by the Evanno method using the web-software STRUCTURE Harvester version 0.6.94.2012 software. After identification of the number of subpopulations, a test was performed to select the optimal "K" to generate the illustrative population plot.

Abbreviations

Ar: Allele richness; F: Fixation Index; He: expected heterozygosity; Ho: observed heterozygosity; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; ISAG: International Society for Animal Genetics; ISSR: Inter simple sequence repeat; LD: Linkage disequilibrium; MEGA-5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Na: Number of alleles; Ne: effective number of alleles; PIC: Polymorphic Information content

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) for the research grant.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed in this study are available from the corresponding author upon request.

Authors' contributions

CMGD and CRQ conceived and designed the experiments. CRQ directed the study. CMGD, ABJ and WHOV analyzed the results and wrote the manuscript. ABJ, CMGD, AFMO and RLDC participated in the data collection and revised the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Ethics approval

This study was performed with the approval of the Committee on Ethical Use of Animals (CEUA-UENF) according to the Brazilian Society of Laboratory Animals/Brazilian College of Animal Experimentation (SBCAL/COBEA) with protocol no. 317.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, 2000, Alberto Lamego Ave, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro 28016-811, Brazil. ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 482 Rod Br, Km 47, s/n - Rive, Alegre, Espírito Santo 29520-000, Brazil. ³Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, 56, Heitor Penteado St., Nova Odessa, São Paulo 13460-000, Brazil.

Received: 5 April 2018 Accepted: 31 October 2018

Published online: 16 November 2018

References

- Lacerda TS, Caetano AR, Facó O, de Faria DA, McManus CM, Lôbo RN, et al. Single marker assisted selection in Brazilian Morada Nova hair sheep community-based breeding program. *Small Rumin. Res. [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;139:15–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.04.009>
- Issakowicz J, Issakowicz ACKS, Bueno MS, da Costa RLD, Katki LM, Geraldo AT, et al. Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. *Small Rumin. Res. [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;136:96–103. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448816300165>
- Facó O, Paiva SR, Alves LRN, Lôbo RNB, Villela LCV. Raça Morada Nova: Origem, características e perspectiva. *Sobral Embrapa Caprinos*; 2008. p. 43.
- Notter DR. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci*. 1999;77:61–9.
- Mousavizadeh A, Abadi MM, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Koshkoleh AE. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iran J Biotechnol*. 2009;7:51–3.
- Mohammadabadi MR, Satayimkhtari R. Estimation of (Co) Variance Components of Ewe Productivity Traits in Kermani Sheep. *Slovak J Anim Sci*. 2013;2013:45–51.
- Mohammadabadi M. Inter-simple sequence repeat loci associations with predicted breeding values of body weight in kermani sheep. *Genet Third Millenn*. 2016;144:383–90.
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK, Moradi Shahrebabak H, Bordbar F, Ansari Namin S. Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Pol J Vet Sci*. 2016;19:281–9.
- Mohammadabadi M, Esfandyapoor E, Mousapour A. Using inter simple sequence Repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *J Reseach Dev*. 2017;5:1–4.
- Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barreto GB, Carneiro PLS, et al. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop Anim Health Prod*. 2011;43:1469–57.
- Sheriff O, Alemayehu K. Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: A review. *Cogent Food Agric. [Internet]*. Cogent; 2018;4. Available from: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2018.1459062>
- Crispim B do A, Matos MC, Seno LDO, Grisolia AB. Molecular markers for genetic diversity and phylogeny research of Brazilian sheep breeds. *African J Biotechnol*. 2012;11:15617–25.
- Phyu PP, Pichler R, Soe O, Aung PP, Than M, Shamsuddin M, et al. Genetic diversity, population structure and phylogeography of Myanmar goats. *Small Rumin. Res. [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;148:33–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.028>
- Ligda C, Altarayah J, Georgoudis A. Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Rumin Res*. 2009;83:42–8.
- Zamani P, Akhond M, Mohammadabadi M. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Rumin. Res. [Internet]*. Elsevier; 2015 [cited 2018 Sep 10];132:123–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448815300894>
- Kijas JW, Lenstra JA, Hayes B, Boitard S, Neto LRP, San M, et al. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biol*. 2012;10:e1001258.
- Fischer MC, Rellstab C, Leuzinger M, Roumet M, Gugerli F, Shimizu KK, et al. Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. *BMC Genomics*. 2017;18:69. Available from: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3459-7>.
- Wili Ö, Einarsson A, Waits L, Ellegren H. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Mol Ecol*. 2008;17:3808–17.
- Singh N, Choudhury DR, Singh AK, Kumar S, Srinivasan K, Tyagi RK, et al. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS One*. 2013;8:1–14.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980;32:314–31.
- Flint-Garcia SA, Thomsberry JM, Buckler ES. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2003;54:357–74. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurevplant.54.031902.134907>
- Silva RCB da, Pimenta Filho EC, Ribeiro MN, Silva EC da, Facó O, Paiva SR. Diversidade genética de ovinos Morada Nova no estado do Ceará, Brasil Regina. 48a Reun. Anu da Soc. Bras. Zootec. Belém – PA: In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2011. p. 1–3.
- Ferreira JSB, Paiva SR, Silva EC, McManus CM, Caetano AR, Façanha DAE, et al. Genetic diversity and population structure of different varieties of Morada Nova hair sheep from Brazil. *Genet Mol Res*. 2014;13:2480–90.
- GebreMichael SG. Sheep resources of Ethiopia: genetic diversity and breeding strategy; 2008.
- Toro MA, Caballero A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philos Trans R Soc*. 2005;360:1367–78.
- Ocampo R, Cardona H, Martí-nez R. Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chil J Agric Res*. 2016;76:40–7. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=50718-58392016000100006&lng=en&nrm=iso&lng=en.
- Arandas J, K G, Ribeiro M, N, Pimenta Filho, E. C., Silva, R. C. B., Facó, O., Esteves SN. Estrutura Populacional de Ovinos da Raça Morada Nova. IX Simpósio Bras. Melhor. Anim. João Pessoa, PB: Embrapa Caprinos e Ovinos - Artigos em Anais e Congressos In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 9. 2012. p. 3.
- Ponras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo Á, Lareu MV. An overview of STRUCTURE applications, parameter settings, and supporting software. *Front Genet*. 2013;4:1–13.
- Rousset F, Raymond M. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995;86:248–9.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



35 **7. CONCLUSÃO**

36 As evidências experimentais relatadas neste estudo mostraram que as
37 características avaliadas em campo apresentaram ser eficientes, quando avaliados de
38 maneira conjunta, e podem ser aplicadas para a seleção de indivíduos resistentes ou
39 para adoção de tratamento seletivo, uma vez que os exames laboratoriais retratam de
40 forma assertiva o estado clínico dos animais, apontando a capacidade de ovinos Morada
41 Nova em lidar com os desafios da infecção parasitária.

42 Considerando os aspectos positivos da raça na produção animal, o estudo de diversidade
43 genética realizado pontua a necessidade da implantação de programas de conservação.

44

45