

ANA PAULA GOMES PINTO

**ANÁLISE GENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM BOVINOS  
HOLANDÊS X GIR INFESTADOS PELO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659a  
2012

Pinto, Ana Paula Gomes, 1982-  
Análise genômica estrutural e funcional em bovinos  
Holandês x Gir infestados pelo *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* / Ana Paula Gomes Pinto. – Viçosa, MG, 2012.  
xi, 86f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo Sávio Lopes.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1.Locos de caracteres quantitativos. 2. Genômica.  
3. Bovino - Parasito. 4. Regulação de expressão gênica.  
5. Mapeamento cromossômico. 6. Carrapato do gado  
tropical. 7. Gado Holandês. 8. Gir (Zebu). I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20821

ANA PAULA GOMES PINTO

**ANÁLISE GENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM BOVINOS  
HOLANDÊS X GIR INFESTADOS PELO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de março de 2012

---

Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Coorientador)

---

Marco Antônio Machado  
(Coorientador)

---

Leonardo Lopes Bhering

---

Ana Luisa Souza Azevedo

---

Paulo Sávio Lopes  
(Orientador)

À minha amada filha, Camila.

“A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

“Não deseje que as coisas sejam mais fáceis, deseje ser mais forte.”

(Jim Rohn)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades, encontros e desencontros que definem a minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Paulo Sávio Lopes e Simone Eliza Facioni Guimarães, pela orientação, confiança, paciência, valiosos ensinamentos e por compreenderem as minhas limitações.

Ao pesquisador Marco Antônio Machado, pela confiança e pelas sugestões.

À minha filha Camila, por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra “amor” e por me fazer enxergar o mundo de uma forma mais colorida.

Aos meus pais, Ildevando e Raimunda, pelo estímulo em buscar os meus objetivos, apoio, paciência, carinho, amor, e por terem feito todos os esforços para permitir e incentivar meu acesso e interesse em sempre estudar.

Aos meus queridos João Drummond e Maria Teresa, pelo afetuoso acolhimento em sua linda família, pelo exemplo de vida a ser seguido, pelo amor e carinho dispensados à Camila e a mim.

Às companheiras de república Cris, Su, Deisy, Débora e Bebel pela paciência, compreensão, carinho e por terem compartilhado a minha maternidade... Sem o apoio de vocês eu jamais conseguiria chegar ao final desta jornada!

Aos amigos de longa data Cris, Su, Deisy, Bebel, Débora, Kati, Roque e Dudu por terem se tornado a minha família em Viçosa. Agradeço pelos almoços, risadas, festas, “comidas de boteco” e viagens.

À amiga Érika pelos conselhos, caronas e pela agradável companhia em programas infantis.

Ao amigo Carlos pelas valiosas sugestões e indispensáveis auxílios na condução do presente trabalho.

Aos amigos do LABTEC André, Bruna, Carlos, Carol, Darlene, Débora, Érika, Evelyze, Kati, Kleibe, Lucas, Margareth, Marcos, Mayara, Priscila, Renata, Robert e Iuri, pela convivência extremamente agradável.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
O parasita <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	1
Respostas do Hospedeiro e Moléculas Farmacologicamente Ativas na Saliva do Carrapato.....	2
Mecanismos de Evasão e Imunomodulação do Carrapato.....	5
Variabilidade Genética da Resistência ao <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ...	5
Etiquetas de Sequências Expressas ( <i>Expressed Sequence Tags – EST</i> ).....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO I: EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA PELE DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR INFESTADOS PELO CARRAPATO <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	166
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	366
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	366
CAPÍTULO II: MAPEAMENTO DE TRANSCRITOS NO GENOMA DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	422
MATERIAL E MÉTODOS.....	444
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	477
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO III: IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE SNP E MICROSSATÉLITES A PARTIR DE EST DE PELE DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR.....	655

RESUMO.....	655
ABSTRACT.....	655
INTRODUÇÃO .....	666
MATERIAL E MÉTODOS .....	688
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
CONCLUSÕES .....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
CONCLUSÕES GERAIS .....	85

## RESUMO

PINTO, Ana Paula Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012.  
**Análise genômica estrutural e funcional em bovinos Holandês x Gir infestados pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Orientador: Paulo Sávio Lopes.  
Coorientadores: Simone Eliza Facioni Guimarães e Marco Antônio Machado.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como o carrapato bovino, é um ectoparasita hematófago e monoxeno, que gera grandes prejuízos à bovinocultura de regiões tropicais e subtropicais. Sabe-se da existência de diferenças quanto à resistência ao carrapato entre *Bos taurus* e *Bos indicus* e que estas são geneticamente herdáveis, mas os mecanismos envolvidos permanecem pouco compreendidos, apesar de décadas de intensa pesquisa. A realização do presente estudo teve por objetivos: 1) identificar genes diferencialmente expressos na pele de bovinos Holandês x Gir e relacionados com o *status* resistência/susceptibilidade ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; 2) mapear transcritos, derivados de duas bibliotecas de pele de bovinos Holandês x Gir infestados por carrapato, e associar tal informação aos dados de uma varredura genômica para a detecção de QTL para resistência ao referido parasita; 3) identificar, *in silico*, marcadores microssatélites e SNP a partir das EST derivadas das citadas bibliotecas. Como não foram detectados genes diferencialmente expressos a partir da técnica *Northern* digital, baseou-se na anotação funcional dos transcritos e na sua classificação ontológica para a identificação de genes com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao carrapato, obtendo-se um conjunto de 11 genes. Observou-se uma maior expressão de MGST3, SOD1 e CYB5R1 nos animais susceptíveis nas primeiras 24 horas após a infestação e de CYB5R1, nas primeiras 48 horas. Nos animais resistentes, observou-se maior expressão de PCOLCE e CFH nas primeiras 24 horas após a infestação. Tal regulação gênica indica que a infestação por carrapatos induz um complexo conjunto de respostas imunológicas no hospedeiro. A análise dos transcritos que foram mapeados dentro dos intervalos de confiança de QTL associados à resistência a carrapatos permitiu a identificação de nove genes (IL-1 $\alpha$ , DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A, BLA-DQB e CD63) com potencial influência sobre o nível de resistência a tal parasita. Estudos mais aprofundados serão necessários para a validação destes genes como candidatos.

A partir da *pipeline* d2cluster/CAP3/MISA, a análise de 1.292 sequências únicas possibilitou a detecção de 168 microssatélites. Desconsiderando-se os monômeros, classe detectada em maior abundância, obteve-se sucesso no desenho de *primers* para 19 EST-SSR, sendo que somente cinco destas referem-se a regiões transcritas a proteínas. A mineração para identificação de SNP nas bibliotecas de cDNA foi realizada a partir da *pipeline* RepeatMasker/d2cluster/CAP3/AutoSnp e a confirmação dos polimorfismos foi realizada a partir da inspeção visual do arquivo de qualidade das sequências. Para aumentar a redundância do conjunto de EST, realizou-se o procedimento de enriquecimento a partir de sequências depositadas em bancos de dados. Foi possível detectar 10 SNP a partir de apenas um *contig*, sendo este formado por 27 sequências, possuindo 652 pb. Os resultados obtidos no presente trabalho e apresentados nos diferentes capítulos são relevantes e contribuem para um maior entendimento acerca da genômica envolvida na resistência ao carrapato bovino.

## ABSTRACT

PINTO, Ana Paula Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2012.  
**Structural and functional genomic analysis in Holstein x Gir cattle infested by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Adviser: Paulo Sávio Lopes. Co-Advisers: Simone Eliza Facioni Guimarães and Marco Antônio Machado.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, the cattle tick, is a hematophagous ectoparasite that causes extensive damage in cattle of tropical and subtropical regions. That are differences in tick resistance between *Bos taurus* and *Bos indicus*, but the mechanisms remain poorly understood, despite decades of intensive research. The accomplishment of the present study had as objective: 1) to identify differentially expressed genes that may influence the status resistance/susceptibility to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the skin of Holstein x Gir cattle, 2) to map transcripts derived from two cDNA libraries derived from Holstein x Gir skin infested by ticks, and associate that information with data from a genome scan to detect QTL for resistance to that parasite, 3) to identify SNP and microsatellites markers from EST libraries derived from the cDNA libraries. As non-differentially expressed genes were detected using the Northern Digital technique, a set of 11 genes was obtained from the analysis of the functional annotation of the transcripts and their ontological classification. It was possible to observe an up-regulated expression of MGST3, SOD1 and CYB5R1 in susceptible animals in the first 24 hours after infestation and CYB5R1 in the first 48 hours. In resistant animals, was observed an up-regulated expression of CFH and PCOLCE in the first 24 hours after infestation. This gene regulation indicates that the tick infestation induces a complex set of immune responses in the host. The analysis of the transcripts mapped within the QTL confidence intervals associated with resistance to ticks allowed the identification of nine genes (IL-1 $\alpha$ , DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A, BLA-DQB and CD63) with potential influence on the level of resistance to this parasite. Further studies are needed to validate these genes as candidates. From the pipeline d2cluster/CAP3/MISA, analysis of 1292 unique sequences allowed the detection of 168 microsatellites. Disregarding the monomers, class detected in greatest abundance, success was obtained in the design of 19 primers for EST-SSR, and only

five of them refer to the proteins transcribed regions. The mining for identification of SNP in cDNA libraries was carried out from the pipeline RepeatMasker/d2cluster/CAP3/AutoSnp and confirmation of polymorphisms was performed from the manual analysis of the quality file of the sequences. To increase the redundancy of the EST set, the enrichment procedure from sequences deposited in databases was carried out. 10 SNP could be detected from only a contig, this being composed of 27 sequences and have 652 bp. The results obtained in this study and shown in the different chapters are relevant and contribute to more information about the genomic involved in the resistance to cattle tick.

## INTRODUÇÃO GERAL

### O parasita *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, popularmente conhecido como o carrapato bovino, é um ectoparasita hematófago e monoxeno, que gera grandes prejuízos á bovinocultura de regiões tropicais e subtropicais. Os prejuízos causados pelo carrapato são devidos à sua ação espoliativa, gerando significativa queda na produção de leite e carne (Gonzales, 1995). Além disso, tais parasitas causam danos ao couro dos bovinos, decorrentes das reações inflamatórias provocadas no local de fixação e são transmissores dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de riquetsias do gênero *Anaplasma*, sendo ambos agentes etiológicos da tristeza parasitária bovina.

O ciclo de vida do *R. (B.) microplus* pode ser dividido em duas fases: a fase de vida livre e a fase de vida parasitária. A primeira inicia-se quando o carrapato fêmea adulto e ingurgitado se desprende do hospedeiro e cai ao solo, onde realizará a sua postura (Gonzales, 1995). Após a eclosão dos ovos e endurecimento de sua carapaça, as larvas migram por geotropismo negativo para as extremidades da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual (Waladde & Rice, 1982) e dióxido de carbono expirado (Sonenshine, 1993). A fase de vida livre termina quando a larva encontra o hospedeiro, iniciando-se assim, a fase parasitária.

Existem vários métodos para o controle do *R. (B.) microplus*, como por exemplo, a aplicação de acaricidas, a utilização de vacinas e a exploração das diferenças genéticas para resistência ao carrapato existentes entre as subespécies bovinas. No entanto, isoladamente, nenhum dos métodos disponíveis mostrou-se suficientemente eficaz. Nesse sentido, uma estratégia a ser empregada é a utilização conjunta de mais de uma metodologia.

Diferenças nos processos de domesticação e seleção contribuíram para considerável diferença genotípica e fenotípica entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Em geral, os animais *Bos indicus* são mais resistentes a doenças parasitárias do que os animais *Bos taurus*, mas pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos em tal resistência. Acredita-se que tal *status* esteja relacionado, principalmente, com características da resposta imune do hospedeiro frente à infestação.

## **Respostas do Hospedeiro e Moléculas Farmacologicamente Ativas na Saliva do Carrapato**

O processo de alimentação do carrapato causa a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas no organismo do hospedeiro (Wikel e Bergman, 1997). O sistema imune inato está naturalmente presente nos indivíduos, mesmo antes da exposição ao agente patogênico, compondo a primeira linha de defesa do organismo. Tal mecanismo é formado por barreiras físicas e químicas (epitélios e substâncias antimicrobianas produzidas na superfície epitelial), proteínas sanguíneas (Ex.: proteínas constituintes do sistema complemento) e células fagocíticas (Ex.: neutrófilos, macrófagos, linfócitos *natural killer*), atuando, geralmente, de forma inespecífica sobre diferentes patógenos (Abbas et al., 2003). Ressalta-se que algumas células fagocíticas, como por exemplo macrófagos e células dendríticas, expressam em sua superfície receptores *Toll-Like* (TLRs), sendo tais receptores capazes de realizar o reconhecimento específico de antígenos (Akira et al., 2001). O sistema imunológico adaptativo é induzido pelo reconhecimento específico de antígenos, sendo mediado pelos linfócitos B (LB), T (LT) e seus produtos, gerando memória adaptativa (Abbas et al., 2003).

Imediatamente após o dano tecidual decorrente da introdução das peças bucais do carrapato e do rompimento dos vasos sanguíneos do hospedeiro, são produzidos e liberados componentes que exercem o recrutamento de mediadores inflamatórios humorais e celulares. A inflamação é classicamente caracterizada pelos fenômenos de dor, eritema, edema e calor (Lewis, 1971), sendo estes decorrentes de um aumento do fluxo sanguíneo local, do aumento da permeabilidade capilar, do extravasamento celular e da infiltração de polimorfonucleares (Merchant e Taboada, 1991). Ressalta-se que a resposta inflamatória local, particularmente a ocorrência de dor e prurido, é a principal responsável por movimentos de rejeição ao parasita por parte do hospedeiro, através de estímulos de procura e remoção mecânica do agressor.

A lesão vascular leva à exposição de constituintes de tecidos adjacentes, bem como de fragmentos celulares, que, por sua vez, ativam uma série de reações inflamatórias. A interação dos componentes do sangue com a superfície negativa da membrana basal, associada à exposição de outras biomoléculas negativamente carregadas, oriundas de lesão celular e o desencadeamento das respostas

hemostáticas levam à ativação do sistema contato ou sistema caliceínas-cininas. A partir do referido sistema, há geração de cininas, dentre as quais está a bradicinina (BK), caracterizada como um potente mediador algésico, podendo causar ainda vasodilatação periférica, aumento da permeabilidade vascular, ativação de mastócitos e macrófagos, contração da musculatura lisa visceral, liberação de autacoides e eicosanoides (Bhoola et al., 1992).

O sistema de alimentação do carrapato também desencadeia a ativação do sistema complemento, que consiste em um sistema em cascata, envolvido no processo de opsonização de antígenos e lise de células estranhas ao organismo (Iturry-Yamamoto & Portinho, 2001).

Os mediadores inflamatórios acima citados exercem ainda um potente efeito quimiotático, atraindo para o local da lesão células inflamatórias. Em um primeiro momento, as células que chegam à lesão são principalmente neutrófilos, basófilos e mastócitos. As células apresentadoras de antígenos (APC) e os neutrófilos iniciam a fagocitose e o desencadeamento da resposta imune adaptativa, que terá vital importância nos casos de parasitismo de longa duração, como ocorre em infestações por carrapato. As células inflamatórias e os neutrófilos iniciam a produção de citocinas quimiotáticas e liberam diversos mediadores que interferem na manutenção do parasitismo (Wikel, 1996). Entre os mediadores liberados, encontram-se a serotonina (5-HT) e a histamina, que acentuam as condições pró-inflamatórias no sítio de fixação do parasita. A 5-HT pode ainda ser responsável por mediar a nocicepção e prurido (Sommer, 2006). A histamina, além dos efeitos inflamatórios clássicos, atua diretamente no desprendimento das larvas de carrapato, além de ativar a autolimpeza do hospedeiro (Schleger et al., 1976), via lambadura e/ou fricção da área afetada em superfícies ásperas.

Os linfócitos constituem outro grupo de células importantes na função efetora do sistema imune contra carrapatos (Brossard e Wikel, 2004), sendo que a ação de tais células é dividida em resposta humoral e resposta celular. A primeira é mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B (LB) e a segunda é mediada principalmente por linfócitos T (LT), sendo ambas induzidas pelo reconhecimento específico de antígenos.

Para garantir sua especificidade de ação, os linfócitos possuem receptores antigênicos em sua superfície. Os receptores antigênicos presentes nos LT necessitam da interação com antígenos ligados a moléculas de apresentação

antigênica, denominadas complexos de histocompatibilidade maior (MHC), os quais estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC). Em contrapartida, os receptores presentes nos LB são capazes de reconhecer partes livres solúveis dos antígenos, sem necessidade de participação das moléculas MHC (Tizard, 2009).

Dentre as sub-populações funcionalmente distintas de LT estão os LT citotóxicos (LTc), os LT auxiliares (Th- linfócito T helper) e os LT com receptores do tipo  $\gamma\delta$  (gama/delta). Os LTc, ou LT CD8+, ao reconhecer um antígeno não-*self* em uma molécula MHC de uma determinada célula do organismo (Ex.: células infectadas por vírus ou tumorosas), libera substâncias que lisam esta célula ou mediadores que a induzem a apoptose. Os LTh, ou LT CD4+, por sua vez, controlam a ação das demais células do sistema imune, a partir da secreção de citocinas (Tizard, 2009).

As células Th podem diferenciar-se em Th1 e Th2, caracterizando dois perfis distintos de respostas. Na resposta Th1, há secreção preferencial das interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), gerando a ativação da fagocitose e dos mecanismos citotóxicos, caracterizando assim uma resposta mediada por células. Na resposta Th2, há secreção preferencial de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, causando a estimulação da produção de anticorpos pelos LB, caracterizando uma resposta humoral (Tizard, 2009).

Os LT  $\gamma\delta$  são linfócitos grandes, granulares, efetores do sistema imune inato, cuja função é basicamente citotóxica. Os LT  $\gamma\delta$  representam aproximadamente 10-15% dos LT circulantes em bovinos e além de sua ação citotóxica, podem produzir TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Tal fato sugere que os LT  $\gamma\delta$  induzem a inflamação, contribuindo para o predomínio do perfil Th1 da resposta imune, atuando deste modo como peça de ligação entre os sistemas imune inato e adquirido (Tizard, 2009).

Os anticorpos secretados pelos LB são glicoproteínas denominadas imunoglobulinas (Ig), sendo divididos em cinco classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Os distintos isotipos se diferenciam a partir de suas propriedades biológicas, localizações funcionais e habilidade para lidar com diferentes antígenos. A ligação dos anticorpos ao patógeno faz com que o mesmo seja neutralizado e, em seguida, lisado por enzimas do sistema complemento ou por fagócitos (Tizard, 2009).

Além da produção de imunoglobulinas, os LB desempenham função de APC, sendo que a importância desta atividade pode ser confirmada pela resposta prejudicada dos LT em animais que possuem depleção de células B (Tizard, 2009).

### **Mecanismos de Evasão e Imunomodulação do Carrapato**

A infestação por *R. (B.) microplus* é um potente modulador negativo do sistema imune bovino (Inokuma et al., 1993). Demonstrou-se que o conteúdo das glândulas salivares do referido parasita possui potente atividade imunossupressora *in vitro*, inibindo a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocítica e oxidativa de neutrófilos e monócitos (Turni et al., 2002; 2004; 2007).

Sugere-se que a substância PGE<sub>2</sub>, presente na saliva do carrapato bovino, além de possuir atividades vasodilatadora e anti-hemostática, realça a produção de citocinas Th<sub>2</sub>, regulando negativamente o perfil Th<sub>1</sub>, e inibe a proliferação de LT através da supressão da produção de IL-2 (Harris et al.; 2002). Tal substância também causa a supressão *in vitro* de monócitos (Inokuma et al., 1994). A saliva do carrapato bovino contém ainda lectinas, que aparentemente regulam negativamente a resposta imune humoral (Bautista-Garfias et al., 1997), e outras proteínas que provavelmente estão relacionadas com a inibição do sistema complemento (Willadsen e Riding, 1980; Ferreira et al., 2002).

Existem ainda relatos de que a saliva do carrapato bovino possui proteínas ligantes de histamina (Brossard e Wikel, 2004) e de substâncias capazes de hidrolisar a bradicinina (Bastiani et al., 2002).

### **Variabilidade Genética da Resistência ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

O mecanismo de resistência ao carrapato é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido. Apesar disso, alguns fatores foram identificados como determinantes do grau de resistência ao *R. (B.) microplus* apresentado pelo hospedeiro. De acordo com Teodoro et al. (2004), dentre tais fatores pode-se citar sexo, idade, estado fisiológico, estação do ano, cor da pelagem e a subespécie a qual o animal pertence.

Em relação à subespécie, em geral, os animais *Bos indicus* são menos susceptíveis às infestações de carrapatos do que os animais *Bos taurus*. Tal diferença pode ser explicada a partir da história evolutiva entre parasita e hospedeiro. Como o *R. (B.) microplus* é originário do sudeste asiático, o gado indiano tem convivido há milhares de anos com tal parasita e possivelmente evoluiu a um considerável grau de resistência. Com a difusão do carrapato bovino para outros continentes, ocorreu o contato deste com o gado *Bos taurus*, iniciando uma nova relação parasitária. Os novos hospedeiros mostraram possuir um grau de resistência bem menor, possivelmente devido à falta de um contato evolutivo prévio (Tatchell, 1987).

Além da comprovada diferença de resistência ao carrapato entre as subespécies bovinas, diversos estudos evidenciaram a resistência diferencial entre raças pertencentes à mesma subespécie (Riek, 1956; Utech et al., 1978; Nagar et al., 1978) e entre indivíduos pertencentes à mesma raça (Utech et al., 1978).

Alguns trabalhos relatam que em sua primeira exposição aos carrapatos após o nascimento, os bezerros mestiços zebu são mais resistentes que os de raças europeias, apresentando, pois, uma parcela de imunidade inata (O'Kelly e Spiers, 1976). No entanto, segundo outros estudos, zebuínos e taurinos destituídos de experiência prévia com o carrapato são igualmente susceptíveis à infestação primária por larvas de *R. (B.) microplus*. De acordo com estes estudos, a resistência apresentada por zebuínos se torna aparente somente após um período de susceptibilidade à infestação primária, considerando a resistência uma característica predominantemente adquirida (Hewetson, 1971; Wagland, 1975).

Os mecanismos de resistência à infestação são direcionados contra todos os estágios de vida do parasita, mas são mais pronunciados contra a fase larval. Assim, grande parte da resistência se manifesta durante as primeiras 24 horas de fixação do carrapato no hospedeiro (Roberts, 1968), sendo que animais resistentes conseguem rejeitar mais de 90% das larvas (Allen, 1994). Assim, a ocorrência de animais naturalmente resistentes causa um impacto na capacidade de fixação e alimentação do carrapato, gerando reduções no número de fêmeas que atingem a maturidade sexual, no peso das fêmeas ingurgitadas e no número e viabilidade dos seus ovos (Roberts, 1968; Koudstaal et al., 1978; Willadsen, 1980).

A princípio, acreditava-se que uma reação de hipersensibilidade do tipo I ou imediata, sendo esta caracterizada por uma severa inflamação, fosse a base do componente imunológico da resistência dos zebuínos contra infestações de carrapato.

Atualmente, sabe-se que tanto animais taurinos quanto zebuínos apresentam uma reação de hipersensibilidade imediata em resposta à infestações por carrapato. No entanto, apenas os zebuínos que obtiveram contato prévio com o citado parasita apresentam uma resposta secundária, caracterizada como uma reação de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia (Bechara et al., 2000), mediada por células Th1 (Brossard e Wikel, 2004).

Recentes estudos, empregando as técnicas de RT-qPCR e *microarray*, onde foram comparados perfis de expressão gênica de animais previamente expostos ao carrapato, evidenciaram uma reação inflamatória mais vigorosa nos animais taurinos (Piper et al., 2008, 2009, 2010). Os perfis de células mononucleares da circulação periférica, a expressão de citocinas e de imunoglobulinas de animais Brahman e Holandês, previamente expostos ao carrapato, sustentam a hipótese de que enquanto *Bos taurus* apresentam uma resposta fundamentalmente inflamatória à infestação, os animais *Bos indicus* desenvolvem uma resposta mediada por LT (Piper et al., 2009).

Em relação ao perfil de isotipos de imunoglobulinas apresentado pelas diferentes subespécies bovinas, Kashino et al. (2005) observaram um aumento nos índices de IgG1 e IgG2 nos animais *Bos indicus*, e um decréscimo dos citados índices nos animais *Bos taurus*, concomitantemente a uma elevação dos níveis de IgE. Tais autores concluíram que os isotipos IgG1 e IgG2 estão envolvidos com relevantes mecanismos efetores do sistema imune e que o isotipo IgGE não é eficiente no controle às infestações por carrapatos. A participação de imunoglobulinas no processo de aquisição de resistência a carrapatos foi reforçada pela observação de maior número de LB no infiltrado induzido pelo carrapato adulto na pele de zebuínos do que na pele de taurinos previamente expostos ao parasita (Franzin, 2009).

Em contraste aos resultados apresentados acima, Piper et al. (2009) detectaram um maior nível de IgG1 nos animais taurinos do que nos zebuínos e observaram variações individuais no nível de IgG2 em resposta a extratos de diferentes antígenos de carrapato, indicando a necessidade de estudos mais aprofundados.

## **Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequence Tags* – EST)**

O genoma é um elemento virtualmente estático, ao passo que seus produtos, representados pelos RNA mensageiros (mRNA) e proteínas, possuem um caráter dinâmico, caracterizado por mudanças contínuas em resposta à estímulos internos e externos (Greenbaum et al., 2001). Assim, plataformas de pesquisa que possibilitam posicionar as funções individuais dos genes e seus produtos dentro de um contexto global, cujas técnicas analíticas permitem avaliar os padrões de expressão gênica e protéica nas células e tecidos, são de grande valia. Nesse sentido, uma abordagem bastante utilizada é o seqüenciamento das EST, cujo objetivo é caracterizar a expressão temporal e local dos genes mediante a identificação de seus respectivos RNAs mensageiros (mRNA).

Devido a grande instabilidade das moléculas de RNA, a estratégia utilizada nessa modalidade de sequenciamento é a utilização do princípio da transcrição reversa para converter o mRNA em seu DNA complementar (cDNA), que posteriormente terá as extremidades sequenciadas. Essas pequenas sequências são então analisadas por programas computacionais que têm a capacidade de identificar o gene que lhes deu origem.

As bibliotecas de EST são muito importantes para os estudos de genômica funcional e têm sido largamente utilizadas para identificação de novos genes, mapeamento e anotação de transcritos (Smith et al., 2001), assim como para a construção de mapas comparativos (Liu et al., 2004). Além disso, as bibliotecas de cDNA fornecem o substrato para a confecção das lâminas de *microarrays* utilizadas nos ensaios de expressão gênica (Suchyta et al., 2003).

Uma aplicação imediata dos resultados obtidos nestes projetos de sequenciamento tem sido a construção de mapas genéticos saturados para identificação de marcadores para características quantitativas. A grande quantidade de polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP) identificada está sendo utilizada para saturar os mapas de locos de características quantitativas (QTL - *Quantitative Trait Loci*) existentes, com o intuito de identificar os genes responsáveis pelas variações fenotípicas em bovinos (Sonstegard & Van Tassel, 2004). Esta estratégia tem gerado um grande número de marcadores

moleculares que estão sendo usados para rastrear os animais portadores de alelos ou combinação de alelos que aumentam a produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A .K.; LICHTMAN, A. J.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 3 ed. New York: Jordan S. Pober, 2003. 527p.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v.2, n8., p. 675-680, 2001.
- ALLEN, J.R. Host resistance to ectoparasites. **Revue Scientifique Technique International Office of Epizootics**, v.13, n.4, p. 1287-1303, 1994.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B.; GUIMARÃES, J.A.; TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v.32, n.11, p.1439-1446, 2002.
- BAUTISTA-GARFIAS, C.R.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.A.; CÒRDOBA-ALVA, F. Lectin activity from cattle tick (*Boophilus microplus*) saliva. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.39 (1-2), p.83-89, 1997.
- BECHARA, G.H.; MORELLI JR., J.; SZABÓ, M.P.J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences** 916, p. 570-575, 2000.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins; kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacological Reviews**, v.44, n.1, p. 1-80, 1992.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v.129, p.s161-s176. 2004.
- FRANZIN, A.M. Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estudo dos correlatos imunes de resistência e de susceptibilidade. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo. 2009.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2ed. Porto Alegre, 1995.

- GREENBAUM, D.; LUSCOMB, N.M.; JANSEN, R.; QUIAN, J.; GERSTEIN, M. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'Oming in on function. **Genome Research**, v.11, p.1463-1468, 2001.
- HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends of Immunology**, v.23, p.144-150, 2002.
- HEWETSON, R. W. Resistance by cattle to the cattle tick *Boophilus microplus*. III. The development of resistance to experimental infestations by purebred Sahiwal and Australian Illawarra shorthorn cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.22, p.331-342, 1971.
- INOKUMA, H.; KERLIN, R.L.; KEMP, D.H.; WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Veterinary Parasitology**, v.47 (1-2), p.107-118, 1993.
- INOKUMA, H.; KEMP, D.H.; WILLADSEN, P. Comparison of prostaglandin E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*, and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *B. microplus*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, n.6, p. 1217-1218, 1994.
- ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; PORTINHO, C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.1, p. 41-51, 2001.
- KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v.110, p.12-21, 2005.
- KOUDSTAAL, D., KEMP, D.H., KERR, J.D. *Boophilus microplus*: rejection of larvae from british breed cattle. **Parasitology**, v. 76, 379-386, 1978.
- LEWIS, G.P. Biochemical changes in local tissue injury. **British Journal of Dermatology**, v.85, n.5, p.481-483, 1971.
- LIU, L.; GONG, G.; LIU, Y.; NATARAJAN, S.; LARKIN, D, M.; DER WIND, A. E. V.; REBEIZ, J. E. Multi-species comparative mapping in silico using the COMPASS strategy. **Bioinformatics**, v.20, n.2, p.148-154, 2004.
- LONDT, J.G.H.; WHITEHEAD, G.B. Ecological studies of larval ticks in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Parasitology**, v.65, p.469-490, 1972.

- MERCHANT, S.R.; TABOADA, J. Dermatologic aspects of tick bites and tick-transmitted diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.145-155, 1991.
- NAGAR, S.K.; SAXENA, V.K.; RAOZADA, R.N. Studies on the rate of infestation of *Boophilus microplus* (acarina:Ixodidae) on Indian cattle: its activity and infestation differential. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.45, n3, p.173-173, 1978.
- O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.C. Resistance to *Boophilus microplus* (canestrini) in genetically different types of calves in early life. **Journal of Parasitology**, v.62, n2, p.312-317, 1976.
- PIPER, E.K., JACKSON, L.A., BAGNALL, N.H., KONGSUWAN, K.K., LEW, A.E., JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p.110–119, 2008.
- PIPER, E.K., JONSSON, N.N., GONDRO, C., LEW-TABOR, A.E., MOOLHUIJZEN, P., VANCE, M.E., JACKSON, L.A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, p.1074–1086, 2009.
- PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; JONSSON, N.N. tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.431–441, 2010.
- RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Australian Veterinary Journal**, v.32, p.204-209, 1956.
- ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. **Journal of Parasitology**, v.54, p.667-673, 1968.
- SCHLEGER, A.V.; LINCOLN, D.R.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; ROBERTS, J.A. *Boophilus microplus* cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.29, p.499-512, 1976.

- SMITH, T.P.L.; GROSSE, W.M.; FREKING, B.A.; ROBERTS, A.J.; STONE, R.T.; CASAS, E.; WRAY, J.E.; WHITE, J.; CHO, J.; FAHRENKRUG, S.C.; BENNETT, G.L.; HEATON, M.P.; LAEGREID, W.W.; ROHRER, G.A.; CHITKO-MCKOWN, C.G.; PERTEA, G.; HOLT, I.; KARAMYCHEVA, S.; LIANG, F.; QUACKENBUSH, J.; KEELE, J.W. Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. **Genome Research**, v.11, p.626-630, 2001.
- SOMMER, C. Is serotonin hiperalgesic or analgesic? **Current Pain and Headache Reports**, v.10, n.2, p.101-106, 2006.
- SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press Inc., vol. 2, 1993.
- SUCHYTA, S.P.; SIPKOVSKY, S.; KRUSKA, R.; JEFFERS, A.; MCNULTY, A.; COUSSENS, M. J.; TEMPELMAN, R.J.; HALGREN, R.; SAAMA, P.M.; BAUMAN, D.E.; BOISCLAIR, Y.R.; BURTON, J.L.; COLLIER, R.J.; DE PETERS, E.J.; FERRIS, T.A.; LUCY, M.C.; MUIRE, M.A.; MEDRANO, J.F.; OVERTON, T.R.; SMITH, T.P.; SMITH, G.W.; SONSTEGARD, T.S.; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; YAO, J.; COUSSENS, P.M. Development and testing of a high-density cDNA microarray resource for cattle. **Physiological Genomics**, v.15, p.158-164. 2003.
- TATCHELL, R.J. Interactions between ticks and hosts. **International Journal for Parasitology**, v.17, p.597-606, 1987.
- TEODORO, R.L.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; VERNEQUE, R.S. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004, Pirassununga. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, [2004]. (CD-ROM).
- TIZARD, I.R. **Introducción a la inmunología veterinária**. 8 ed. Barcelona, 2009. 574p.
- TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunology**, v.24, n.7, p.355-361, 2002.
- TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. A comparison of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus*

- microplus*. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.7, p.833-838, 2004.
- TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. the effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.5, p.545-552, 2007.
- UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.885-895, 1978.
- WALADDE, S.M.; RICE, M.J. The sensory basis of tick feeding behavior. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) **Physiology of ticks**. New York, Pergamon Press. 1982.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v.77, p. 63-70, 1998.
- WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**,v. 41, p.1-22, 1996.
- WIKEL, S.K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**. v. 13, n.10, 1997.
- WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Advances in Parasitology**, v.18, p. 293–311, 1980.

## Capítulo I

### EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA PELE DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR INFESTADOS PELO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS* (*BOOPHILUS*) *MICROPLUS*

#### RESUMO

Objetivou-se, com o presente estudo, identificar genes relacionados com o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus*. Para tanto, realizou-se a análise por RT-qPCR de 11 genes identificados em duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos pertencentes a uma população F2, derivada do cruzamento entre animais das raças Holandês e Gir. Foi possível a detecção de diferenças de expressão dos genes PCOLCE, MGST3, SOD1, CYB5R1 e CFH, entre amostras de pele de animais resistentes e susceptíveis ao carrapato, sob infestação pelo referido parasita. Observou-se uma maior expressão de MGST3, SOD1 e CYB5R1 nos animais susceptíveis nas primeiras 24 horas após a infestação e de CYB5R1, nas primeiras 48 horas. Nos animais resistentes, observou-se maior expressão de PCOLCE e CFH nas primeiras 24 horas após a infestação. Tal regulação gênica indica que a infestação por carrapatos induz um complexo conjunto de respostas imunológicas no hospedeiro.

**PALAVRAS-CHAVE:** RT-qPCR, *Bos taurus*, *Bos indicus*, carrapato, pele

#### ABSTRACT

The accomplishment of the present study had as objective to identify genes related to the resistance/susceptibility to *R. (B.) microplus*. Thus, was carried out a RT-qPCR analysis of 11 genes identified in two skin cDNA libraries of cattle of a F2 population derived from crosses between animals Gir and Holstein. It was possible to identify expression differences of PCOLCE, MGST3, SOD1, CYB5R1 and CFH between skin samples taken from resistant and susceptible animals, under infestation by the tick. It was possible to observe an up-regulated expression of MGST3, SOD1 and CYB5R1 in susceptible animals in the first 24 hours after infestation and CYB5R1 in

the first 48 hours. In resistant animals, was observed an up-regulated expression of CFH and PCOLCE in the first 24 hours after infestation. This gene regulation indicates that the tick infestation induces a complex set of immune responses in the host.

**KEY WORDS:** RT-qPCR, *Bos taurus*, *Bos indicus*, tick, skin

## INTRODUÇÃO

As perdas causadas pela infestação por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o carrapato bovino, acarretam um grande impacto na bovinocultura brasileira. Os prejuízos causados pelos carrapatos são devidos à perda de peso, baixa eficiência alimentar, perdas na qualidade do couro, toxicoses, lesões da pele, anemia e transmissão dos agentes etiológicos da tristeza parasitária bovina (Gonzales, 1975; Cordovés, 1997).

Existem vários métodos para o controle do *R. (B.) microplus*, como por exemplo, a aplicação de acaricidas, a utilização de vacinas e a exploração das diferenças genéticas para resistência ao carrapato existentes entre as subespécies bovinas. No entanto, isoladamente, nenhum dos métodos disponíveis mostrou-se suficientemente eficaz. Nesse sentido, uma estratégia a ser empregada é a utilização conjunta de mais de uma metodologia.

Diferenças nos processos de domesticação e seleção contribuíram para uma considerável diferença genotípica e fenotípica entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Em geral, os animais *Bos indicus* são mais resistentes a doenças parasitárias do que os animais *Bos taurus*, mas pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos em tal resistência, no entanto, sabe-se que esta é geneticamente herdável e, geralmente, mediada imunologicamente. A identificação de tais mecanismos é essencial para o desenvolvimento de marcadores preditivos para resistência, auxiliando também no desenvolvimento de vacinas que possibilitem uma eficiente imunização.

Objetivou-se com o presente estudo, identificar genes diferencialmente expressos na pele de bovinos F2 (Holandês x Gir) relacionados com o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus*. Para tanto, realizou-se um ensaio de RT-qPCR, sendo esta a técnica mais comumente utilizada para a caracterização e

confirmação de padrões de expressão gênica e comparação dos níveis de mRNA em diferentes amostras, devido à sua alta sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e facilidade de uso.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População Experimental**

Foram utilizados animais pertencentes a uma população F2, desenvolvida pela Embrapa Gado de Leite, derivada do cruzamento entre quatro machos da raça Holandesa e 27 fêmeas da raça Gir. A formação detalhada da população foi descrita por Machado et al. (2010).

### **Análises de Bioinformática**

#### Conjunto de EST

As EST utilizadas no presente estudo são provenientes de duas bibliotecas de cDNA construídas a partir de amostras de pele de bovinos pertencentes à geração F2 da população experimental e classificados como resistentes ou susceptíveis ao *R. (B.) microplus*, após infestação artificial pelo referido parasita. A metodologia detalhada para a construção e sequenciamento das bibliotecas foi descrita por Nascimento et al. (2011).

#### Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

As EST foram clusterizadas e montadas em *contigs*, utilizando-se o *software* CAP3 (Huang e Madan, 1999), considerando-se similaridade mínima de 80% em fragmentos acima de 40 pb. As EST que não formaram *contigs* foram denominadas *singletons*, sendo que o conjunto formado entre *contigs* e *singletons* foi denominado conjunto de sequências únicas. O número de EST presentes em cada *contig* foi determinado e utilizado para a construção de uma tabela para análises posteriores. A anotação funcional do conjunto de sequências únicas foi realizada com o auxílio do programa BLASTX (Altschul et al., 1990), contra o banco de dados de transcritos SwissProt, considerando-se  $e\text{-value} \leq 1E-5$ .

A existência de expressão gênica diferencial entre as bibliotecas de cDNA foi verificada a partir da comparação dos perfis de expressão gênica digital, técnica esta conhecida como *Northern* digital (Audic & Claverie, 1997). A partir desta metodologia, considera-se que o número de *tags* é proporcional à abundância dos transcritos correspondentes no tecido ou célula utilizados para a construção da

biblioteca de cDNA. Para verificar a variação na frequência relativa das EST, informações acerca do número de EST por *contig* e os IDs correspondentes foram submetidos ao *software* estatístico IDEG6 (Romualdi et al., 2003), possibilitando a implementação de comparações par a par, a partir da estatística AC (Audic and Claverie, 1997), teste exato de Fisher 2x2 e teste  $Chi^2$  2x2 e de comparações múltiplas, a partir da estatística R (Stekel et al., 2000), estatística GT (Greller & Tobin, 1999), e do teste  $Chi^2$  generalizado. Para cada teste realizado, o limiar de significância associado ( $P < 0,05$ ) foi aplicado considerando-se a proteção de Bonferroni.

### **Análise de Redes Gênicas**

*Contigs* e *singletons* foram utilizados para a determinação da ontologia gênica (GO) funcional, identificação de mecanismos, vias e funções representados nas bibliotecas de cDNA, a partir do *software* TOPPCLUSTER (Kaimal et al., 2010). A visualização e a edição das vias identificadas foram realizadas a partir do aplicativo Cytoscape.

### **PCR Quantitativo em Tempo Real**

#### **Animais e Tratamentos**

Os animais da geração F2 da população experimental foram avaliados quanto à resistência a carrapatos e ordenados de acordo com o seu valor genético. Assim, três animais dentre os com menores valores genéticos (resistentes) e três animais dentre os com maiores valores genéticos (susceptíveis) foram utilizados no presente estudo. A metodologia utilizada para as avaliações foi descrita por Nascimento et al. (2011).

#### **Infestação e Coleta das Amostras**

Os animais selecionados receberam banhos de carrapaticida e sarnicida 21 e 14 dias antes da infestação, sendo desde então mantidos em baias individuais com piso de cimento até o dia da infestação.

Cerca de 20.000 larvas do carrapato *R. (B.) microplus* foram colocadas sobre a região do lombo dos animais. Amostras de pele, com aproximadamente 8 mm de diâmetro, foram coletadas da região da garupa, antes da infestação e 24 e 48 horas após a infestação. Para a conservação do RNA intacto, as amostras foram imediatamente imergidas em RNA *later* (Ambion, Inc), acondicionadas por no

mínimo 24 horas à temperatura de 4 – 8°C sendo, então, congeladas a -20°C até o momento de extração de RNA.

#### Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi isolado das amostras de pele utilizando-se o RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração total do RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare) e a qualidade do RNA extraído foi verificada a partir do equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc.), utilizando-se o Agilent RNA 6000 Nano Kit.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for RT-QPCR (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração total do cDNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

#### Reações de RT-qPCR

Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes (Tabela 1) foram desenhados com base nas sequências de nucleotídeos correspondentes depositadas no GeneBank. Para tanto, utilizou-se os programas PrimerQuest e PrimerBlast, disponibilizados por Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) e NCBI, respectivamente.

As reações de RT-qPCR foram feitas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems PCR (Applied Biosystems), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation). Basicamente as reações de amplificação consistiram em: 95°C por 2 minutos, ciclos de amplificação de 95 °C por 15 segundos e extensão por 60 segundos. Ao final dos ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 95°C foi utilizado para a obtenção da curva de dissociação. As amplificações foram feitas em diferentes poços e em duplicatas técnicas (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Genes utilizados nas análises de RT-qPCR, sequência de nucleotídeos dos *primers* correspondentes, número de acesso no GeneBank e tamanho do *amplicon* gerado.

GENE	Sequência de Nucleotídeos (5' - 3')	Acesso	Tamanho do Amplicon <sup>1</sup>
COL1A1	F: AAAGATGGACTCAATGGTCTCC R: CAGGAAGCTCAAGTCGTAGC	NM_001034039.1	150
CCL27	F: TTTCCCCTGGCTGCGCATGTGG R: ACAGCTCATCAGGCCCGCAGA	XM_002689812.1	91
LAMA4	F: GATACAATCCCAGCCCCTC R: TGATTCCACTGACAGCTTTCG	NM_001205965.1	144
DMKN	F: TGTGTTGTGGACCGTTTGTGTCGCA R: CCAGAGTTCTGTATCCAGGGCGGCA	NM_001082463.1	149
CFH	F: GTGTTGTGGACCGTTTGTGTCGCA R: CCCAGAGTTCTGTATCCAGGGCGG	NM_001033936.1	150
PCOLCE	F: AGGGAACCCTGACCACGCCCAA R: GGGCGCGATGATGTGCCAGGAA	NM_001045888.1	80
CYB5R1	F: AGGAACCTGGGAATGATTGC R: TGTCTTTTCAGTCTGGTTGG	NM_001034518.1	130
PHGDH	F: TGC ACTGGACGTGTTTAC R: ACAAACTGGAGGGCGATC	NM_001035017.1	141
SOD1	F: GTGTTGCCATCGTGGATATTG R: CGTTGCCAGTCTTTGTACTTTC	NM_174615.2	141
GLRX	F: CTGGTCGGTCAGCCGAGCTTT R: CGAACGCTTGAGCCATGCTGCC	NM_001037604.1	89
MGST3	F: TCTGGCTTGGGCTTGGCCTGGA R: ATGAAGCTCAGGGCTCCCCGCT	NM_001035046.1	101
GAPDH <sup>2</sup>	F: GTGAAGGTCGGAGTGAACG R: TGGGTGGAATCATACTGGAAC	NM_001034034.1	149

COL1A1 - colágeno tipo I, alfa I; CCL27 - quimiocina (C-C motif) ligante 27; LAMA4 - laminina 4; DMKN - dermoquina; CFH - fator F do sistema complemento; PCOLCE - procolágeno C-endopeptidase enhancer 1; CYB5R1: citocromo B5 redutase 1; PHGDH - 3-3-fosfoglicerato desidrogenase; SOD1 - superóxido dismutase; GLRX - glutaredoxina (tiotransferase); MGST3 - microssomal glutationa S-transferase 3; GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

1 Tamanho do *amplicon* em número de nucleotídeos

2 Controle endógeno

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada para a escolha da melhor combinação entre as concentrações de *primer* e cDNA. Para tanto, estimou-se o *slope* da regressão linear estabelecida entre o  $\log_{10}$  da concentração de cDNA utilizada (5, 15 e 45 ng/ $\mu$ L) e o valor de Ct obtido para cada concentração de *primer* (100, 200 e 400 nM). Assim, a eficiência foi calculada a partir da seguinte fórmula (Pfaffl, 2001):

$$E = \left(10^{\frac{-1}{slope}}\right) - 1$$

## Análises Estatísticas

As diferenças de expressão gênica foram avaliadas em contrastes formados pela combinação entre os grupos fenotípicos (resistente - R e susceptível - S) e o tempo da coleta do tecido em relação à infestação (0h, 24h e 48h). Assim, foram avaliados os seguintes contrastes: entre os diferentes grupos fenotípicos de acordo com o tempo da coleta do tecido em relação à infestação (R0xS0, R24xS24 e R48xS48) e dentro do mesmo grupo fenotípico, considerando-se diferentes tempos de coleta do tecido em relação à infestação (R0xR24, R0xR48, R24xR48, S0xS24, S0xS48, S24xS48). O valor da diferença de expressão a ser apresentado é do segundo grupo em relação ao primeiro.

As diferenças de expressão entre os tratamentos foram identificadas a partir da análise dos valores de Ct obtidos ao fim das reações de RT-QPCR, com o auxílio do programa REST 2009 (Pfaffl et al., 2002).

## RESULTADOS

### Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

O programa CAP3 foi utilizado para agrupar, simultaneamente, EST oriundas das duas bibliotecas que possuíssem sequências sobrepostas, formando assim, uma sequência consenso para cada *contig*. Cada EST presente em um mesmo *contig* foi considerada uma cópia da sequência gênica do mesmo transcrito. O conjunto de 1.292 sequências únicas, representando possíveis transcritos bovinos, foi formado por 458 *contigs* e 834 *singletons*. Posteriormente, realizou-se o alinhamento dos *contigs* contra o banco de dados SwissProt, a partir do programa BlastX. As informações acerca do número de EST por *contig* e os IDs correspondentes foram submetidos ao *software* estatístico IDEG6 (Romualdi et al., 2003). Não foram encontrados genes diferencialmente expressos. Frente a este resultado, para a identificação de genes com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus*, realizou-se a anotação das sequências únicas em categorias funcionais.

### **Classificação Funcional e Análise de Redes Gênicas**

Realizou-se a determinação das funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares representados nas bibliotecas de cDNA, a partir do aplicativo TOPPCLUSTER (Kaimal et al., 2010). Com base na anotação funcional dos transcritos e a sua classificação ontológica, foi possível obter uma lista de 11 genes com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus* (Tabela 2). Dentre os 11 genes selecionados, 10 (COL1A1, CCL27, LAMA4, DMKN, PCOLCE, CYB5R1, PHGDH, SOD1, GLRX, MGST3) puderam ser agrupados em uma única rede gênica (Figura 1) a partir de cinco sub-redes (atividade estrutural, matriz extracelular, quimiotaxia, processo de oxidação-redução e atividade de oxidoreductase).

Tabela 2: Processo biológico, função molecular e componente celular dos genes com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus*.

GENE	GO: Processo Biológico	GO: Função Molecular	GO: Componente Celular
COL1A1	Desenvolvimento da epiderme Quimiotaxia	Atividade estrutural	Espaço extracelular Matriz extracelular
CCL27	Quimiotaxia	Atividade de quimiocina	Espaço extracelular
LAMA4	Constituinte estrutural da matriz extracelular	Atividade estrutural	Espaço extracelular Matriz extracelular
DMKN		Atividade estrutural	Região extracelular
CFH	Ativação da via alternativa do complemento Ativação da resposta imune Resposta imune humoral Resposta imune inata		Espaço extracelular
PCOLCE	Desenvolvimento de organismos multicelulares	Ativação de peptidase	Espaço extracelular Matriz extracelular
CYB5R1	Processo de oxidação-redução	Atividade de oxidoreductase	Mitocôndria
PHGDH	Processo de oxidação-redução	Atividade de oxidoreductase	Citoplasma
SOD1	Processo de oxidação-redução	Atividade de oxidoreductase	Espaço extracelular Matriz extracelular
GLRX	Processo de oxidação-redução	Atividade de oxidoreductase	Mitocôndria
MGST3	Produção de leucotrieno envolvidos em processos inflamatórios	Atividade de oxidoreductase	Retículo Endoplasmático

COL1A1 - colágeno tipo I, alfa I; CCL27 - quimiocina (C-C motif) ligante 27; LAMA4 - laminina 4; DMKN - dermoquina; CFH - fator F do sistema complemento; PCOLCE - procolágeno C-endopeptidase enhancer 1; CYB5R1: citocromo B5 redutase 1; PHGDH - 3-3-fosfoglicerato desidrogenase; SOD1 - superóxido dismutase; GLRX - glutaredoxina (tiotransferase); MGST3 - microsomal glutathione S-transferase 3

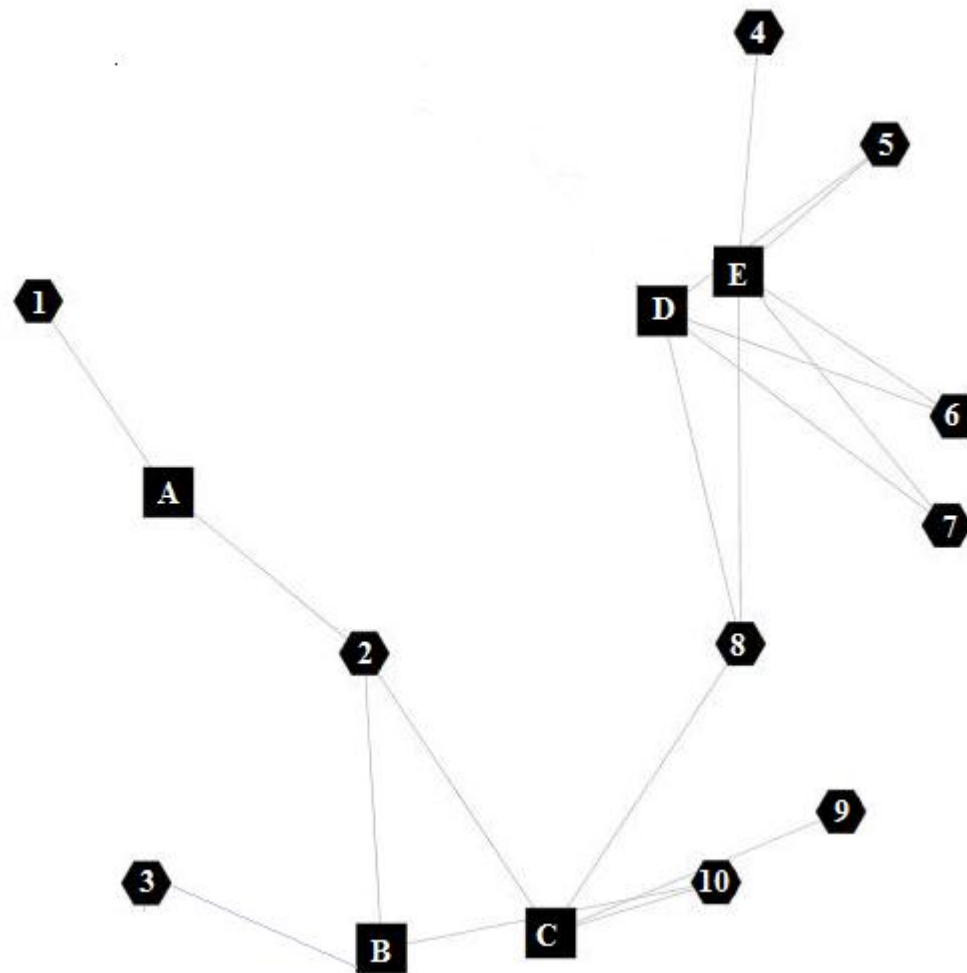


Figura 1 - Rede gênica funcional e suas interações. Os números representam os genes: CCL27 (1), COL1A1 (2), DMKN (3), MGST3 (4), CYB5R1 (5), PHGDH (6), GLRX (7), SOD1 (8), PCOLCE (9), LAMA4 (10). As letras representam as sub-redes: quimiotaxia (A), atividade estrutural (B), matriz extracelular (C), processo de oxidação-redução (D), atividade oxidoreductase (E).

Apesar de CFH não estar associado à rede gênica representada na Figura 1, foi mantido nas análises subsequentes, pois sabe-se que o sistema complemento está envolvido no processo de resistência a carrapatos (Wikel & Allen, 1978; Allen, 1989; Brossard & Wikel, 1997).

### **PCR Quantitativo em Tempo Real**

Para verificar a influência exercida pelos 11 genes identificados com base na anotação funcional e classificação ontológica dos transcritos derivados das bibliotecas de cDNA no *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus*, comparou-se o nível de expressão gênica destes entre amostras de pele de animais resistentes e susceptíveis ao referido parasita sob infestação. Os contrastes avaliados foram formados pela combinação entre os grupos fenotípicos (resistente e susceptível) e os diferentes tempos da coleta do tecido em relação à infestação (0h, 24h e 48h).

Utilizou-se como controle endógeno o gene GAPDH (Domingues, 2011). As eficiências de amplificação entre o gene alvo e o controle endógeno foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação, tal como descrito por Livak & Schmittgen (2001). As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNA utilizados nas reações de amplificação estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições de amplificação dos genes utilizados na análise de RT-qPCR.

Gene	Concentração de Primer (nM)	Concentração de cDNA (ng)	Número de ciclos	Temperatura de Extensão (°C)
PCOLCE	100	25	40	60
CCL27	100	25	40	60
LAMA4	100	75	40	60
MGST3	200	25	40	60
SOD1	100	75	40	63
GLRX	100	75	40	63
CYB5R1	100	25	40	63
DMKN	200	75	38	65
PHGDH	200	25	38	65
CFH	100	75	35	65
COL1A1	100	75	35	65
GAPDH <sup>1</sup>	200	75	-	-

PCOLCE - procolágeno C-endopeptidase enhancer 1; CCL27 - quimiocina (C-C motif) ligante 27; LAMA4 - laminina 4; MGST3 - microsomal glutathione S-transferase 3; PTGR1 - prostaglandina redutase 1; SOD1 - superóxido dismutase; GLRX - glutaredoxina (tiotransferase); CYB5R1: citocromo B5 redutase 1; DMKN - dermoquina; PHGDH - 3-3-fosfoglicerato desidrogenase; CFH - fator F do sistema complemento; COL1A1 - colágeno tipo I, alfa I; GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

<sup>1</sup>Utilizado como controle endógeno. Amplificou em todas as condições.

Analisando-se os dados referentes aos animais resistentes no decorrer do tempo (Tabela 4 e Figura 2), pode-se observar que o gene COL1A1 apresentou um aumento de expressão 24 horas após a infestação (24hp.i.), enquanto o gene PCOLCE apresentou um aumento de expressão 48 horas após a infestação (48hp.i.). O gene GLRX apresentou aumento de expressão às 24hp.i. e 48hp.i. e o gene MGST3, às 48hp.i. em relação ao período anterior à infestação e em relação às 24hp.i. SOD1 apresentou diminuição de expressão nas primeiras 24 horas pós-infestação e aumento nas 24 horas subsequentes.

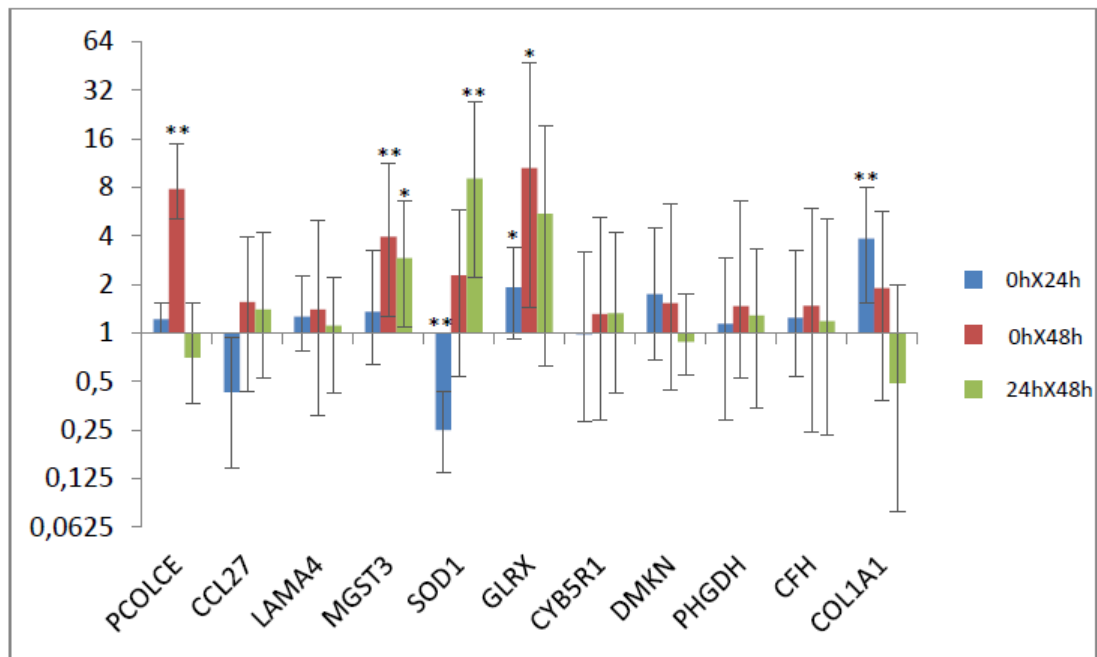


Figura 2: Razão de expressão gênica entre os diferentes tempos analisados nos animais resistentes. As barras cinza representam o erro-padrão.

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

No grupo de animais susceptíveis, os genes CFH, SOD1 e MGST3 apresentaram diferença significativa de expressão com o decorrer do tempo (Tabela 4 e Figura 3). Os dois primeiros apresentaram diminuição de expressão às 24hp.i. em relação a 0hp.i. e aumento, em relação às 48hp.i. O gene MGST3 foi mais expresso às 48hp.i. do que às 24hp.i.

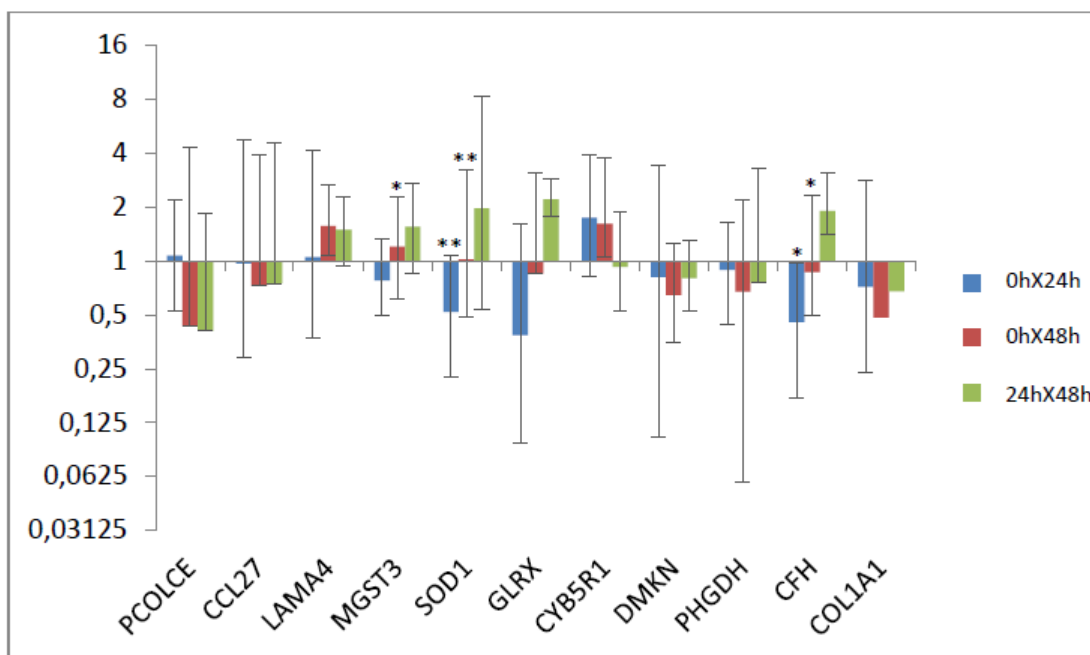


Figura 3: Razão de expressão gênica entre os diferentes tempos analisados nos animais susceptíveis. As barras cinza representam o erro-padrão.

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$ .

Comparando-se a expressão entre os grupos de animais resistentes e susceptíveis nos mesmos tempos, nos susceptíveis foi observada maior expressão de COL1A1, GLRX e MGST3 antes da infestação, de CYB5R1, MGST3 e SOD1 às 24 horas após a infestação e de CYB5R1 48hp.i., enquanto que nos resistentes foi observada maior expressão de CFH e PCOLCE (Tabela 4 e Figura 4) 24hp.i.

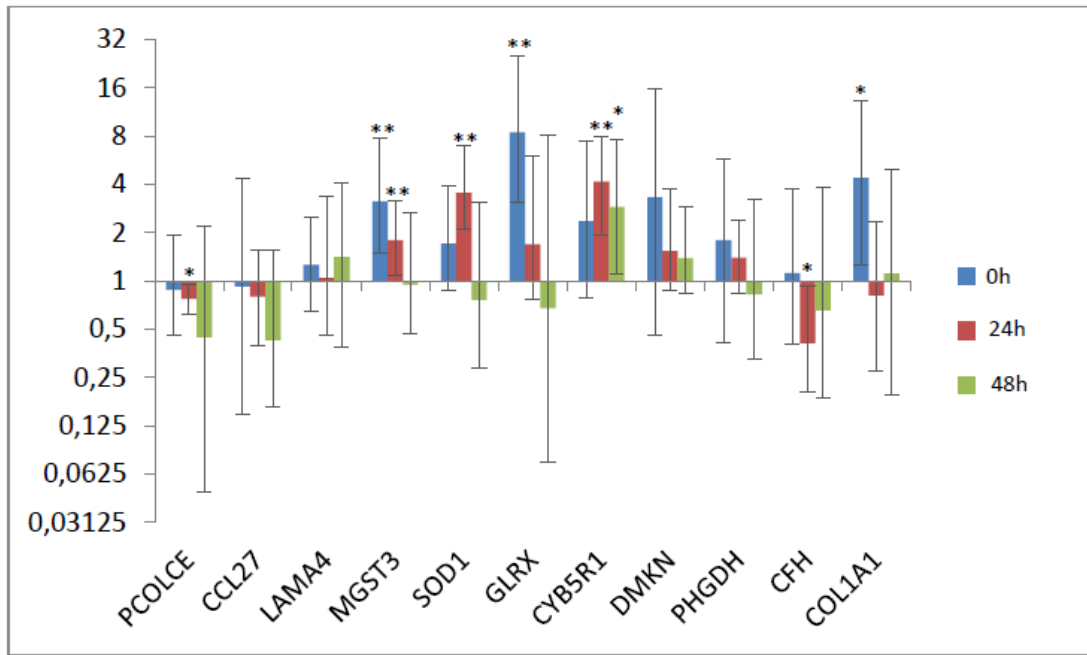


Figura 4: Razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados. As barras cinza representam o erro-padrão.

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$ .

Tabela 4: Relação dos p-values referentes aos valores de expressão gênica diferencial entre contrastes formados por distintos grupos fenotípicos e tempos das biópsias em relação à infestação

Genes <sup>2</sup>	Contrastes <sup>1</sup>								
	R0xR24	R0XR48	R24xR48	S0xS24	S0xS48	S24xS48	R0xS0	R24xS24	R48xS48
PCOLCE	0,112	0,001**	0,155	0,796	0,375	0,409	0,074	0,011*	0,403
CCL27	0,077	0,382	0,436	0,949	0,570	0,510	0,819	0,468	0,153
LAMA4	0,348	0,349	0,748	0,921	0,321	0,478	0,439	0,928	0,479
MGST3	0,387	0,0013**	0,018*	0,197	0,469	0,042*	0,007**	0,009**	0,882
PTGR1	0,002**	0,057	0,324	0,046*	0,125	0,097	0,055	0,001**	0,087
SOD1	<0,001**	0,074	0,002**	0,050*	0,960	0,005**	0,149	0,002**	0,601
GLRX	0,035*	0,019*	0,053	0,104	0,741	0,164	0,001**	0,373	0,597
CYB5R1	0,989	0,575	0,532	0,077	0,211	0,740	0,092	0,000**	0,029*
DMKN	0,259	0,324	0,667	0,722	0,505	0,452	0,159	0,209	0,249
PHGDH	0,769	0,532	0,570	0,717	0,180	0,267	0,261	0,178	0,706
CFH	0,580	0,526	0,764	0,035*	0,693	0,015*	0,760	0,023*	0,485
COL1A1	0,001**	0,237	0,268	0,574	0,283	0,456	0,025*	0,571	0,856

1 - Contrastes formados entre os grupos fenotípicos (resistente -R e susceptível -S) e os diferentes tempos da coleta do tecido em relação à infestação (0h, 24h e 48h)

2 - PCOLCE - procolágeno C-endopeptidase enhancer 1; CCL27 - quimiocina (C-C motif) ligante 27; LAMA4 - laminina 4; MGST3 - microsossomal glutationa S-transferase 3; SOD1 - superóxido dismutase; GLRX - glutaredoxina (tiotransferase); CYB5R1: citocromo B5 redutase 1; DMKN - dermoquina; PHGDH - 3-3-fosfoglicerato desidrogenase; CFH - fator F do sistema complemento; COL1A1 - colágeno tipo I, alfa I

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

## DISCUSSÃO

### Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

Não foram identificados genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de cDNA, a partir da metodologia *Northern* digital. Este resultado pode ser decorrente do baixo número de sequências representadas nas bibliotecas de cDNA utilizadas, culminando em baixa redundância de transcritos. De acordo com Audic & Claverie (1997), um perfil real de transcritos é obtido a partir de bibliotecas de cDNA não normalizadas e com alta redundância.

### Classificação Funcional e Análise de Redes Gênicas

Todas as sequências únicas foram submetidas ao aplicativo TOPPCLUSTER (Kaimal et al., 2010) para a determinação das funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares representados. Com base na anotação funcional dos transcritos e a sua classificação ontológica, foi possível obter uma lista de 11 genes com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao *R. (B.) microplus* (Tabela 2). Dentre os 11 genes selecionados, 10 (COL1A1, CCL27, LAMA4, DMKN, PCOLCE, CYB5R1, PHGDH, SOD1, GLRX, MGST3 e HPGD) puderam ser agrupados em uma única rede gênica (Figura 1) a partir de cinco sub-redes (atividade estrutural, matriz extracelular, quimiotaxia, processo de oxidação-redução e atividade de oxidoreductase).

A sub-rede “atividade estrutural” é uma importante função molecular representada nas bibliotecas de cDNA, consistindo na contribuição proteica para a integridade das células e tecidos de um organismo, conferindo forma, suporte e resistência. Entre tais proteínas estão, principalmente, os colágenos, queratinas e lamininas. Sabendo-se que a resistência da pele do hospedeiro pode interferir no processo de alimentação do carrapato (Kemp et al., 1976), a investigação da expressão de genes relacionados com a estrutura epitelial torna-se importante. No presente estudo, foi identificado um gene que codifica para moléculas de colágeno (COL1A1) e um que codifica para laminina (LAMA4).

A proteína DMKN também foi agrupada na sub-rede “atividade estrutural”, pois acredita-se que tal proteína esteja envolvida na diferenciação de queratinócitos (Matsui, 2004), sendo observado aumento de sua expressão em doenças inflamatórias (Naso et al., 2007). PCOLCE, envolvido no processo biológico de

desenvolvimento de organismos multicelulares, é uma glicoproteína que induz a clivagem enzimática do pró-colágeno tipo I, elevando a atividade da proteinase-C (Ricard-Blum et al., 2002), sendo esta atividade essencial para a formação da estrutura triplo helicoidal das fibrilas de colágeno.

As proteínas CCL27 e COL1A1 foram conectadas a partir da sub-rede “quimiotaxia”. A quimiocina (C-C motif) ligante 27 (CCL27) é uma citocina com ação quimiotática sob linfócitos T de memória, exercendo importante papel em processos inflamatórios da pele mediados por células T (Kakinuma et al., 2003). Os colágenos possuem uma atividade quimiotática indireta, na medida em que os estímulos físicos e/ou a sinalização química realizada a partir da exposição de fragmentos de colágeno, após um dano tissular, estimulam a produção de citocinas e eicosanoides, substâncias estas com propriedades quimiotáticas diretas (Balbino et al., 2005).

Dentre as sub-redes com maior número de elementos estão o “processo de oxidação-redução” (quatro proteínas: CYB5R1, PHGDH, SOD1, GRLX) e a “atividade de oxidoreductase” (quatro proteínas: CYB5R1, PHGDH, SOD1, GRLX).

As reações de oxidação e redução consistem em reações químicas reversíveis em que o estado de oxidação de um átomo ou átomos dentro de uma molécula é alterado. Um substrato atua como um doador de elétrons e torna-se oxidado, enquanto o outro substrato atua como um receptor de elétrons, tornando-se reduzido. Reações de oxidação e redução são bastante frequentes em um organismo, estando presentes em praticamente todas as vias metabólicas, inclusive naquelas relacionadas à resposta imune. Alguns genes pertencentes à referida classe ontológica atuam diretamente nos processos imunológicos como é o caso de: hidroxiprostaglandina desidrogenase 15 - (NAD) (PHGDH); microsomal glutathione S-transferase 3 (MGST3); glutaredoxina (tioltransferase) (GLRX) e superóxido dismutase (SOD1), enquanto outros genes atuam de forma indireta, como é o caso de citocromo B5 redutase 1 (CYB5R1) e 3-3-fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH).

MGST3, membro da família MAPEG (proteínas de membrana associadas ao metabolismo de eicosanoides e glutathione), sendo esta constituída por proteínas associadas à produção de LT e prostaglandina E, catalisa a conjugação do LTA4 e reduz a glutathione para a produção do LTC4 (Jakobsson et al., 2000). O gene GRLX, pertence à família das glutaredoxinas e codifica para uma enzima que catalisa a redução reversível de proteínas-glutathionas associadas a dissulfetos. Tal enzima é

crucial para diversas vias de sinalização, por controlar o *status* de S-glutationilação de mediadores da sinalização, como por exemplo, aquele relacionado ao receptor de interleucina 1/*Toll-like* 4 (Chantzoura et al., 2010). SOD1 é responsável pela destruição de radicais livres, normalmente produzidos pelas células, e que são tóxicos para os sistemas biológicos (Yi, 2002). Tais radicais livres são gerados, entre outras situações, durante a ativação e ação de fagócitos (Fang, 2004).

Os genes que estão indiretamente relacionados aos processos imunes codificam para proteínas envolvidas na geração de energia e precursores das vias metabólicas associadas. CYB5R1 está envolvido na biossíntese de colesterol (Reddy et al., 1977) e na desaturação e alongação de ácidos graxos (Oshino et al., 1971; Keys & Cinti, 1980), sendo estes últimos essenciais para a síntese de eicosanoides. PHGDH catalisa a via de fosforilação da biossíntese da serina, sendo tal aminoácido imprescindível para a síntese de serino-proteases, como por exemplo, alguns elementos envolvidos na coagulação sanguínea (fatores de coagulação: fVIIa, fIXa, fVIIIa, fVa, além da proteína C e trombina), kalicreínas e bradicinina.

Sabendo-se do envolvimento do sistema complemento no processo de resistência a carrapatos (Wikel & Allen, 1978; Allen, 1989; Brossard & Wikel, 1997), CFH foi mantido nas análises subsequentes, mesmo não estando associados à rede gênica. CFH é constituinte do *cluster* gênico regulador da ativação do sistema complemento, restringindo tal mecanismo inato de defesa (Iturry-Yamamoto & Portinho, 2001).

## **PCR Quantitativo em Tempo Real**

### Atividade estrutural

O gene COL1A, que codifica para a pró-cadeia  $\alpha 1$  do colágeno do tipo I, mostrou-se mais expresso no grupo de animais resistentes 24 horas após a infestação (24hp.i.). Considerando-se que na fase inflamatória da cicatrização, que se inicia imediatamente após a lesão, há estímulo para a produção de colágeno (Salles et al., 2012), esta expressão diferencial pode indicar uma tentativa de reconstituição de tecidos injuriados pela ação espoliativa do carrapato. Reforçando esta teoria, PCOLCE, gene que codifica para uma proteína responsável pela estabilização da estrutura tridimensional das fibrilas de colágeno, apresentou-se mais expresso no

referido grupo fenotípico 48 horas após a infestação (48hp.i.). O mesmo não foi observado nos animais susceptíveis.

Não foram encontradas diferenças significativas de expressão gênica de LAMA4, e DMKN entre os contrastes formados. Esses resultados não corroboram com aqueles obtidos por Wang et al. (2007), pois, ao estudar o perfil de expressão gênica na pele de animais Hereford x Shorthorn, a partir da tecnologia de *microarray*, tais autores detectaram um aumento da expressão de DMKN. Essa diferença entre resultados pode ser devida à utilização de diferentes raças e, possivelmente, diferentes linhagens de carrapato entre os diferentes estudos. Em adição, os resultados obtidos, por Wang et al. (2007) não foram validados por RT-qPCR.

#### Sistema complemento

Entre os animais susceptíveis, o gene CFH mostrou-se menos expresso às 24hp.i. do que no período anterior à infestação, e apresentou uma maior expressão às 48p.i. do que às 24hp.i., indicando menor inativação da via alternativa do sistema complemento nas primeiras 24 horas pós-infestação. O sistema complemento (SC) é o principal mediador humoral do processo inflamatório, estando relacionado à inflamação, quimiotaxia, opsonização e limpeza microbiana. É constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e é ativado por três vias: clássica, alternativa e da lectina. CFH atua na inativação da via alternativa, facilitando a degradação enzimática de C3b pelo Fator I.

Comparando-se os grupos fenotípicos às 24hp.i., pode-se observar uma menor expressão de CFH nos animais susceptíveis. Ao realizar um ensaio de *microarray* a partir de amostras de pele de bovinos, pertencentes à mesma população do presente estudo, Domingues (2011) detectou maior expressão de genes relacionados à ativação da via alternativa do complemento (fator B e properdina) em animais resistentes após infestação por carrapatos. Assim, uma maior expressão de CFH nos animais resistentes, pode indicar uma tentativa de minimizar a formação do complexo lítico de membrana no próprio tecido e de controlar a formação de mediadores da inflamação.

## Processo metabólico de eicosanoides

Os animais susceptíveis apresentaram uma maior expressão do gene *CYB5R1* do que os animais resistentes às 24hp.i. e 48hp.i. Tal gene é um dos integrantes do complexo da dessaturase linoleoyl-CoA  $\Delta 6$ , sendo este responsável pela metabolização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico para a síntese dos ácidos araquidônico e eicosapentanóico, respectivamente. Os ácidos araquidônico e eicosapentanóico são o substrato utilizado por cicloxigenases e lipoxigenases para a síntese de prostanóides (prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina) e leucotrienos, respectivamente. Adicionalmente, foi observada por Domingues (2011), às 48 horas pós-infestação, uma maior expressão da proteína ativadora do araquidonato 5-lipoxigenase (*ALOX5AP*) nos animais susceptíveis do que nos resistentes. Tais resultados podem indicar uma maior produção de leucotrienos nos animais susceptíveis.

Comparando-se a atividade do gene *MGST3* no grupo de animais resistentes, pode-se perceber que houve aumento de expressão às 48hp.i. em relação aos períodos 0hp.i. e 24hp.i. *MGST3* está envolvido na produção do leucotrieno *LTC4*, que possui atividades pró-inflamatórias, como aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e quimiotaxia, causando a manutenção da inflamação. Contrastando-se os diferentes grupos fenotípicos no intervalo de tempo 24hp.i., percebe-se uma maior expressão nos animais susceptíveis, indicando uma resposta inflamatória mais acentuada.

## Quimiocinas

Não foi verificada expressão diferencial de *CCL27* em nenhum dos contrastes testados. Trabalhos anteriores indicam diferenças de expressão de outras quimiocinas entre o sítio de fixação de carrapatos e locais isentos deste parasita em animais susceptíveis (Piper et al., 2008) e em animais resistentes, 24 e 48 horas após infestação (Domingues, 2011).

## Sinalização Celular

Os animais resistentes apresentaram maior expressão do gene *GLRX* 24hp.i. e 48hp.i., em relação a 0h. Tal gene codifica para uma enzima capaz de promover a S-deglutinationilação do fator 6 associado a TNF (*TRAF6*), sendo essa reação essencial para a funcionalidade deste. A S-deglutinationilação consiste no processo

inverso de uma reação pós-transcricional caracterizada pela formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína específicos de uma proteína. Esta modificação protege as proteínas de reações de oxidação não-reversíveis, podendo regular ou alterar as funções proteicas (Chantzoura, et al. 2010).

TRAF6 é uma molécula intermediária envolvida na propagação da sinalização realizada pela família do receptor de interleucina 1/*Toll-like* 4 (IL-1R/TLR4) (Chantzoura, et al. 2010). Os receptores do tipo *Toll-like* possuem um importante papel na detecção de invasores microbianos e como mediadores da inflamação, e embora sejam classicamente conhecidos por possuir ativação por componentes bacterianos e virais, eles também podem reconhecer moléculas produzidas por tecidos danificados (Tizard, 2009). Contrastando-se os grupos fenotípicos no período anterior à infestação, pôde-se observar maior expressão de GLRX nos animais susceptíveis, podendo indicar infecções anteriores ao presente estudo.

Piper et al. (2008) detectaram maior expressão dos genes relacionados a via de sinalização dos receptores *Toll-like*, entre eles TRAF6 e IL-1 $\beta$ , nos sítios de fixação de carrapatos do que nas regiões sem carrapato de bovinos Holstein-Friesian infestados, não detectando tais diferenças em animais da raça Brahman ou entre contrastes formados entre as raças Holstein-Friesian e Brahman.

#### Produção de espécies reativas de oxigênio

O gene SOD1 apresentou variação de expressão similar entre os grupos fenotípicos: diminuição 24hp.i. em relação a 0hp.i. e aumento 48hp.i. em relação a 24hp.i. Considerando-se que dismutases são responsáveis pela neutralização do radical superóxido e que esta espécie reativa de oxigênio (ERO) é utilizada por fagócitos para a eliminação de invasores, a diminuição da atividade das dismutases no início da resposta inflamatória permite uma utilização mais efetiva do radical superóxido por importantes células de defesa, como neutrófilos e mastócitos. No entanto, EROs são poderosos agentes oxidantes capazes de danificar estruturas celulares do próprio organismo que os produziu, portanto, para evitar maiores danos às células, a atividade das dismutases deve ser restabelecida.

O gene SOD1 foi mais expresso nos animais susceptíveis do que nos resistentes às 24hp.i., indicando uma maior neutralização de radicais superóxido. Tal

fato pode ser relativo a uma maior atividade de fagócitos e conseqüentemente, maior produção de EROs nos animais susceptíveis.

## CONCLUSÃO

Foi possível a detecção de diferenças de expressão dos genes PCOLCE, MGST3, SOD1, CYB5R1 e CFH, entre amostras de pele de animais resistentes e susceptíveis ao carrapato, sob infestação pelo referido parasita. Observou-se uma maior expressão de MGST3, SOD1 e CYB5R1 nos animais susceptíveis nas primeiras 24 horas após a infestação e de CYB5R1, nas primeiras 48 horas. Nos animais resistentes, observou-se maior expressão de PCOLCE e CFH nas primeiras 24 horas após a infestação. Tal regulação gênica indica que a infestação por carrapatos induz um complexo conjunto de respostas imunológicas no hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental & Applied Acarology**, v.7, p. 5-13, 1989.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403–410, 1990.
- AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. The significance of digital gene expression. profiles. **Genome Research**, v. 7, p. 986-995, 1997.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, 2005.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, p.270-276. 1997.
- CHANTZOURA, E.; PRINARAKIS, E.; PANAGOPOULOS, D.; MOSIALO, G.; SPYROU, G. Glutaredoxin-1 regulates TRAF6 activation and the IL-1 receptor/TLR4 signalling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V.403, P. 335–339, 2010.
- CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2.ed. porto Alegre, Agropecuária, 176p, 1997.

- COULOMBE, P.A.; OMARY, M.B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Current Opinion in Cell Biology**; v.14, p.110-22; 2002.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTEIRO, C.; GARCIA, G.J.C. MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; OUE, O.; FIVAZ, B. H.; DE WAAL, D. T.; LANDER, K. Indigenous and crossbred cattle, a comparison of resistance to ticks and implications for their strategic control in Zimbabwe. **Tropical Animal Health Production**, v. 24, n. 2, p. 81-89, 1992.
- DOMINGUES, R. Expressão gênica diferencial em animais cruzados Holandês x Gir infestados com o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Viçosa, MG: UFV, 2011. 109 p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175-185, 1998.
- FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, p.820-832, 2004.
- FOELL, D.; WITTKOWSKI, H.; VOGL, T.; ROTH, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. **Journal of Leukocyte Biology**, V.81,2007.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2ed. Porto Alegre, 1995.
- GRELLER, L.D.; TOBIN, F.L. Detecting selective expression of genes and proteins. **Genome Research**, v. 9, p. 282–296, 1999.
- HUANG, X. AND MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p.868-877, 1999.
- ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; PORTINHO, C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.1, p. 41-51, 2001.
- JAKOBSSON, P.; MORGENSTERN, R.; MANCINI, J.; FORD-HUTCHINSON, A.; PERSSON, B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG) a widespread protein superfamily. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, V.161, p. S20–S24, 2000.
- KAIMAL, V.; BARDES, E.E.; TABAR, S.C.; JEGGA, A.G.; ARONOW, B.J. ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment

- clustering and network-based dissection of biological systems. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W96-W102, 2010.
- KAKINUMA, T.; SAEKI, H.; TSUNEMI, Y.; FUJITA, H.; ASANO, N.; MITSUI, H.; TADA, Y.; WAKUGAWA, M.; WATANABE, T.; TORII, H.; KOMINE, M.; ASAHINA, A.; NAKAMURA, K.; TAMAKI, K. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, V. 111, Issue 3, P.592–597, 2003.
- KARSENTY, G.; PARK, R.W. Regulation of Type I Collagen Genes Expression. **International Reviews of Immunology**, Vol. 12, n 2-4, p. 177-185, 1995.
- KEMP DH, KOUDSTAAL D, ROBERTS JA, KERR JD. *Boophilus microplus* – effect of host resistance on larval attachments and growth. **Parasitology**, v.73, p 123–136, 1976.
- KEYES, S.R.; CINTI, D.L. Biochemical properties of cytochrome b5-dependent microsomal fatty acid elongation and identification of products. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.11357-11364, 1980.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTIGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.; TEODORO, R.L.; PIRES, M.A.; PEIXOTO, M.G.C.D.; FREITAS, C.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, M.V.G.B.; GUIMARÃES, S.E.F.; REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R.S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, 11: 280, 2010.
- MATSUI, T.; HAYASHI-KISUMI, F.; KINOSHITA, Y.; KATAHIRA, S.; MORITA, K.; MIYACHI, Y.; ONO, Y.; IMAI, T.; TANIGAWA, Y.; KOMIYA, T.; TSUKITAC, S. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-a/-h and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1. **Genomics**, V.84, P.384–397, 2004.
- NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; MARTINS, M.F.; PEIXOTO, J.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; LOPES, P.S. Expressed sequenced tags profiling of resistant and susceptible Gyr x Holstein cattle infested with the tick *Rhipicephalus*

- (Boophilus) microplus. **Genetics and Molecular Research**. Ahead of Print, 2011.
- NASO, M.F.; LIANG1, B.; HUANG, C.C.; SONG, X-Y; SHAHIED-ARRUDA, L.; BELKOWSKI, S.M.; D'ANDREA, M.R.; POLKOVITCH, D.A.; LAWRENCE, D.R.; GRISWOLD, D.E.; SWEET, R.W.; AMEGADZIE, B.Y. Dermokine: An Extensively Differentially Spliced Gene Expressed in Epithelial Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.1622-1631, 2007.
- OSHINO, N.; IMAI, Y.; SATO, R.: A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. **Journal of Biochemistry**, v.69, p.155-167, 1971.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, e45, 2001.
- PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, e36, 2002.
- PIPER, E.K., JACKSON, L.A., BAGNALL, N.H., KONGSUWAN, K.K., LEW, A.E., JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of Bos taurus and Bos indicus cattle infested with the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p.110–119, 2008.
- REDDY, V.V.R.; KUPFER, D.; CAPSI, E. Mechanism of C-5 double bond and introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, p.2797-2801, 1977.
- RICARD-BLUM, S.; BERNOCCO, S.; FONT, B.; MOALI, C.; EICHENBERGER, D.; FARJANEL, J.; BURCHARDT, E.R.; VAN DER REST, M.; KESSLER, E.; HULMES, D.J.S. Interaction Properties of the Procollagen C-proteinase Enhancer Protein Shed Light on the Mechanism of Stimulation of BMP-1. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 277, N.37, Issue 13, p. 33864–33869, 2002.
- ROMUALDI, C.; BORTOLUZZI, S.; D'ALESSI, F.; DANIELI, G.A. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. **Physiol Genomics**, v. 12, n. 2, p. 159-162, 2003.
- SALLES, A.G.; FERREIRA, M.C.; LOTIERZO, P.H.; ARAÚJO, M.F. Curso On-line de Fundamentos de Medicina Estética e Laser. Disponível em <<http://plastica.fm.usp.br/estetica/capitulo-4.html>> Acesso em: 19/01/2012.

- STEKEL, D.J.; GIT, Y.; FALCIANI, F. The Comparison of Gene Expression from Multiple cDNA Libraries. **Genome Research**, v. 10, n. 12, p. 2055–2061, 2000.
- TIZAR, I.R. **Introduccion a la inmunología veterinária**. 8 ed. Barcelona, 2009. 574p.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in bos indicus and their crosses with Bos taurus. **Veterinary Parasitology**, v.77, p. 63-70, 1998.
- WANG YH, REVERTER A, KEMP D, MCWILLIAM SM, INGHAM A, DAVIS CK, MOORE RJ, LEHNERT SA. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with Boophilus microplus tick larvae. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.47, p. 1397-1407, 2007.
- WHARTON RH, UTECH KBW. The Relation between Engorgement and Dropping of Boophilus microplus (canestrini) (Ixodidae) to the Assessment of Tick Numbers on Cattle. **Journal of the Australian Entomological Society**, v.9, p. 171-182, 1970.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology**, v.32, p. 457 - 465 , 1977.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HENGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. **Parasitology**, Cambridge, v.110, p.43-50, 1995.
- YI, Z.; JUN-ZHI, W.; YONG-JIE, W.; WEN-GUANG, L. Anti-inflammatory effect of recombinant human superoxide dismutase in rats and mice and its mechanism. **Acta Pharmacol Sinica**, v.23, n 5, p. 439-444, 2002.

## Capítulo II

### MAPEAMENTO DE TRANSCRITOS NO GENOMA DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR

#### RESUMO

Objetivou-se mapear transcritos derivados de duas bibliotecas de pele de bovinos F2 Holandês x Gir infestados pelo *R. (B.) microplus* e associar tal informação aos dados de uma varredura genômica para a detecção de QTL. A análise dos genes mapeados dentro dos intervalos de confiança dos QTL permitirá a identificação de genes candidatos para resistência ao carrapato bovino. A determinação das posições cromossômicas, em pares de bases, dos transcritos representados nas bibliotecas de cDNA foi obtida a partir do programa Biomart. As posições em centiMorgan de marcadores flanqueadores, intervalo de confiança e provável posição de QTL foram utilizados para a construção de mapas genéticos. A representação gráfica dos mapas foi realizada com o auxílio do programa MapChart. A partir de 1.292 sequências únicas, foram mapeados 1.029 transcritos nos 29 cromossomos autossomais e nos cromossomos X e mitocondrial bovino. Observou-se uma média de 33,93 genes por cromossomo, com valores variando de 10 genes no BTA28 a 84 genes no BTA5. A densidade média foi de um gene a cada 3,79 cM; variando de um gene a cada 1,50 cM no BTA18 a um gene a cada 7,45 cM no BTA20. A análise dos genes mapeados dentro dos intervalos de confiança de QTL associados à resistência a carrapatos permitiu a identificação de nove genes (IL-1 $\alpha$ , DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A, BLA-DQB e CD63) com potencial influência sob o *status* resistência/susceptibilidade ao carrapato bovino. Estudos mais aprofundados são necessários para a validação destes genes como candidatos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biblioteca de cDNA, EST, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, QTL

#### ABSTRACT

The accomplishment of the present study had as objective to map transcripts derived from two cDNA libraries generated using skin tissues of animals Holstein x Gir infested by *R. (B.) microplus* and associate this information to data from a genomic scan to detect QTL. Analysis of the genes mapped within the confidence intervals of

QTL enables the identification of candidate genes for resistance to cattle tick. The transcripts chromosomal positions were obtained through the Biomart program. The positions of flanking markers in centiMorgan, confidence intervals and likely position of QTL were used to construct the genetic maps. The graphical representation of the maps was performed with the aid of the MapChart. From 1,292 unique sequences, 1,029 transcripts were mapped in the 29 autosomal chromosomes and X and mitochondrial bovine chromosomes. There was a mean of 33.93 genes by chromosome with values ranging from 10 to 84 in BTA28 and BTA5, respectively. The average density was a gene every 3.79 cM, ranging from a gene for each 1.50 cM to a gene each 7.45 cM in BTA18 and BTA20. The analysis of the genes mapped within the confidence intervals of QTL associated with resistance to ticks allowed the identification of nine genes (IL-1 $\alpha$ , DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A, BLA-DQB and CD63) with potential influence on resistance / susceptibility to cattle tick status. Further studies must be performed to validate these genes as candidates.

**KEY WORDS:** cDNA library, EST, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, QTL

## INTRODUÇÃO

O mapa genético de um organismo é um modelo abstrato do arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores (Schuster & Cruz, 2004), sendo que a sua construção constitui um importante passo para pesquisas em análise genômica estrutural.

O mapeamento genético possibilita a cobertura e a análise completa de genomas, a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (Lee, 1995). Estas informações genômicas são principalmente úteis para auxiliar na avaliação de características complexas e de difícil mensuração, como é o caso da resistência ao *R. (B.) microplus*. Nesse sentido, um procedimento bastante utilizado é a varredura genômica para detecção de Loci de Características Quantitativas (*Quantitative Trait Loci* - QTL). A hipótese

empregada para a localização de um QTL é de que marcadores moleculares polimórficos estejam próximos e suficientemente ligados ao QTL, de forma que, na maioria da progênie de um indivíduo heterozigoto para o marcador, seja possível associar a variação na característica quantitativa de interesse com o genótipo do marcador, que será indicativo do genótipo do QTL. A frequência de ocorrência de recombinação causada por *crossing-over* nos cromossomos dos indivíduos parentais permitirá estabelecer a estimativa da distância entre o marcador e o QTL. Como a localização do marcador é conhecida, é possível obter uma estimativa da localização do QTL.

Apesar de QTL serem consideravelmente informativos, o objetivo final a ser alcançado a partir de estudos de varredura genômica é chegar ao (s) gene (s) candidato (s) que possa (m) estar influenciando a característica fenotípica e, por conseguinte, à mutação causal. Para tanto, uma das possibilidades é associar informações derivadas de bibliotecas de cDNA aos dados de QTL (Martinez & Machado, 2002).

Bibliotecas de cDNA consistem em uma coleção de fragmentos de cDNA, representando os genes expressos em um tecido ou órgão, sob determinada influência ambiental, no momento da extração do mRNA. O sequenciamento das extremidades dos fragmentos obtidos gera as etiquetas de sequências expressas (EST), que ao serem analisadas por *softwares* específicos, permitem a identificação do gene que lhes originou. Esta abordagem tem sido utilizada para a identificação de novos genes, mapeamento e anotação de transcritos (Smith *et al.*, 2001), assim como para a construção de mapas comparativos (Liu *et al.*, 2004). Além disso, as bibliotecas de cDNA fornecem o substrato para a confecção das lâminas de *microarrays* utilizadas nos ensaios de expressão gênica (Suchyta *et al.*, 2003).

Objetivou-se mapear transcritos derivados de duas bibliotecas de pele de bovinos F2 Holandês x Gir infestados pelo *R. (B.) microplus* e associar tal informação aos dados de uma varredura genômica para a detecção de QTL. A análise dos genes mapeados dentro dos intervalos de confiança dos QTL permitirá a identificação de genes candidatos para resistência ao carrapato bovino.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População Experimental**

Foram utilizados animais pertencentes a uma população F2, desenvolvida pela Embrapa Gado de Leite, derivada do cruzamento entre quatro machos da raça Holandesa e 27 fêmeas da raça Gir. A formação detalhada da população foi descrita por Machado et al. (2010).

### **Locos de Características Quantitativas (*Quantitative Trait Loci* - QTL)**

As informações de QTL utilizadas no presente estudo são derivadas de uma varredura genômica, a partir de 180 marcadores microssatélites, para a detecção de QTL relacionados à resistência ao *R. (B.) microplus*. Sabendo-se da influência das estações do ano sobre o número de carrapatos por animal, os indivíduos da geração F2 da população experimental foram avaliados quanto à resistência ao carrapato durante os períodos da seca (abril a setembro) e das águas (outubro a março). A metodologia detalhada foi descrita por Machado et al. (2010). O resumo da varredura genômica está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo da varredura genômica na população F2 pertencente à EMBRAPA Gado de Leite (Machado et al., 2010).

BTA	Estação	F		Posição cM	0,95 CI	Início CI	Fim CI	Efeito		$\sigma^2$
		A	AD					Aditivo	Dominante	
2	Seca	5,4	6,9**	56	22	43	65	0,19	-0,32	4,22
5	Chuvosa	16,3#	8,2**	140	20	129	149	-0,39	0,05	5,57
10	Seca	12,2**	6,4*	19	47	32	79	0,37	0,18	4,00
11	Seca	7,2*	4,0					0,24	0,14	
	Chuvosa	16,5#	8,6**	43	26	27	53	0,39	0,12	5,26
23	Seca	19,7##	9,9#	22	12	18	30	0,38	-0,07	5,90
	Chuvosa	18,9##	9,7#	32	17	25	42	0,40	-0,11	5,82
27	Chuvosa	11,1**	5,5*	0	12	0	12	0,32	0,01	3,31

BTA - cromossomo de *Bos taurus*

F - Estatística F

A - Modelo aditivo

AD - Modelo aditivo + dominante

CI - Intervalo de confiança (cM)

$\sigma^2$  - Proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL

\*Pc < 0,05 - Nível cromossômico

\*\*Pc < 0,01 - Nível cromossômico

#Pg < 0,05 - Nível genômico

##Pg < 0,01 - Nível genômico

### Conjunto de EST

As EST utilizadas no presente estudo são provenientes de duas bibliotecas de cDNA construídas a partir de amostras de pele de bovinos pertencentes à geração F2 da população experimental e classificados como resistentes ou susceptíveis ao *R. (B.) microplus*, após infestação artificial pelo referido parasita. A metodologia detalhada para a construção e sequenciamento das bibliotecas foi descrita por Nascimento et al. (2011).

## **Construção dos Mapas Físicos e Genéticos**

Primeiramente, as EST foram clusterizadas e montadas em *contigs*, utilizando-se o *software* CAP3 (Huang & Madan, 1999), considerando-se similaridade mínima de 80% em fragmentos acima de 40 pb. As EST que não formaram *contigs* foram denominadas *singletons*, sendo que o conjunto formado entre *contigs* e *singletons* foi denominado conjunto de sequências únicas.

O conjunto de sequências únicas foi alinhado contra o banco de dados de cDNA de bovinos ([ftp://ftp.ensembl.org/pub/current/fasta/bos\\_taurus/cdna/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/current/fasta/bos_taurus/cdna/)) a partir do programa Megablast (Zhang et al., 2000), considerando-se similaridade mínima de 95% e  $e\text{-value} < 0,05$ . Os IDs obtidos foram utilizados para a determinação das posições cromossômicas, em pares de bases, dos transcritos representados nas bibliotecas de cDNA, com o auxílio do programa Biomart, disponibilizado no *web site* Ensembl. Com base nas posições obtidas, construiu-se os mapas físicos, utilizando-se o *software* MapChart (Voorrips, 2002).

As posições em centiMorgan de marcadores flanqueadores, intervalo de confiança e provável posição de QTL foram utilizados para a construção de mapas genéticos, com o auxílio do *software* MapChart (Voorrips, 2002). Para permitir a correspondência entre os mapas físico e genético, as posições em pares de base dos marcadores flanqueadores dos QTL (Tabela 2) foram disponibilizadas.

Tabela 2: Posições dos marcadores flanqueadores dos QTL para resistência ao carrapato bovino.

BTA <sup>1</sup>	Marcador Flanqueador	Posição (cM) <sup>2</sup>	Posição (pb) <sup>3</sup>
2	MNB-83	22	22
	TGLA226	76	101
5	BMS490	101	53
	BMS1248	140	87
10	BM1237	0	15
	BMS2614	103	98
11	INRA177	24	25
	RM150	54	64
23	CYP21	18	27
	BM818	34	39
	BM1905	47	46
27	BM3507	0	4
	BMS2137	15	18

<sup>1</sup>BTA - Cromossomo de *Bos taurus*

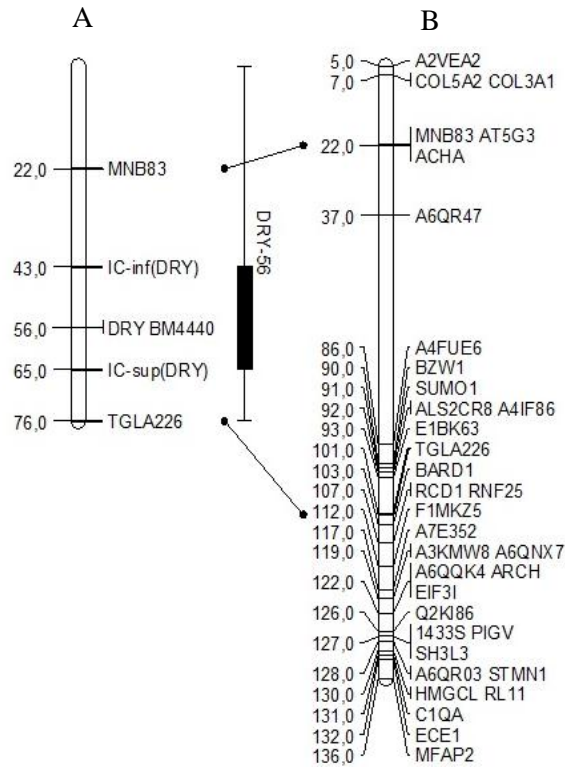
<sup>2</sup>Fonte: Machado et al. (2010)

<sup>3</sup>Posições físicas divididas por um milhão. Fonte: ENSEMBL54 Btau\_4.0.54 Cow Assembly, disponível em <http://www.thearkdb.org/arkdb>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 1.292 sequências únicas, foi possível o mapeamento físico de 1.029 transcritos nos 29 cromossomos autossomais e nos cromossomos X e mitocondrial (Mt) de bovinos. Os mapas genéticos e físicos dos cromossomos onde Machado et al. (2010) detectaram QTL para resistência a carrapatos podem ser observados na Figura 1. Para uma melhor representação gráfica, as posições em pares de base foram divididas por um milhão.

### BTA2



A: mapa genético (cM)

B: mapa físico (pb)

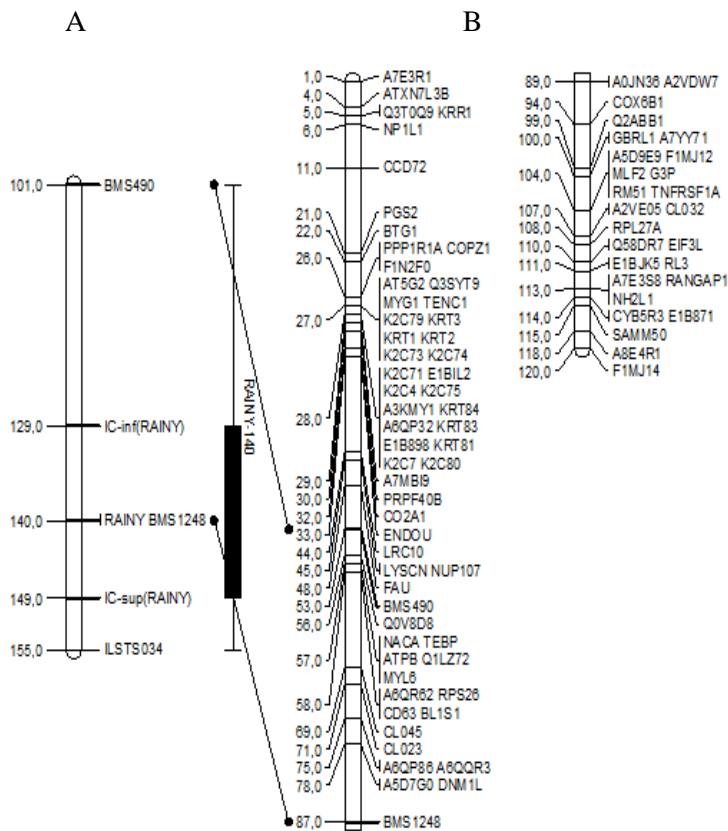
IC-inf: Intervalo de confiança inferior

IC-sup: intervalo de confiança superior

DRY: QTL para resistência a carrapatos na época da seca

MNB83 e TGLA226: marcadores flanqueadores do QTL

### BTA5



A: mapa genético (cM)

B: mapa físico (pb)

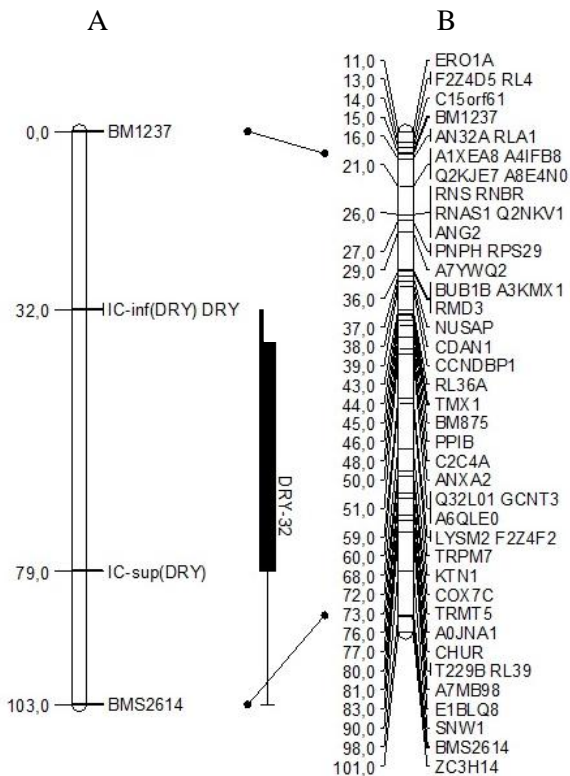
IC-inf: Intervalo de confiança inferior

IC-sup: intervalo de confiança superior

RAINY: QTL para resistência a carrapatos na época das águas

BMS490 e ILSTS034: marcadores flanqueadores do QTL

### BTA10



A: mapa genético (cM)

B: mapa físico (pb)

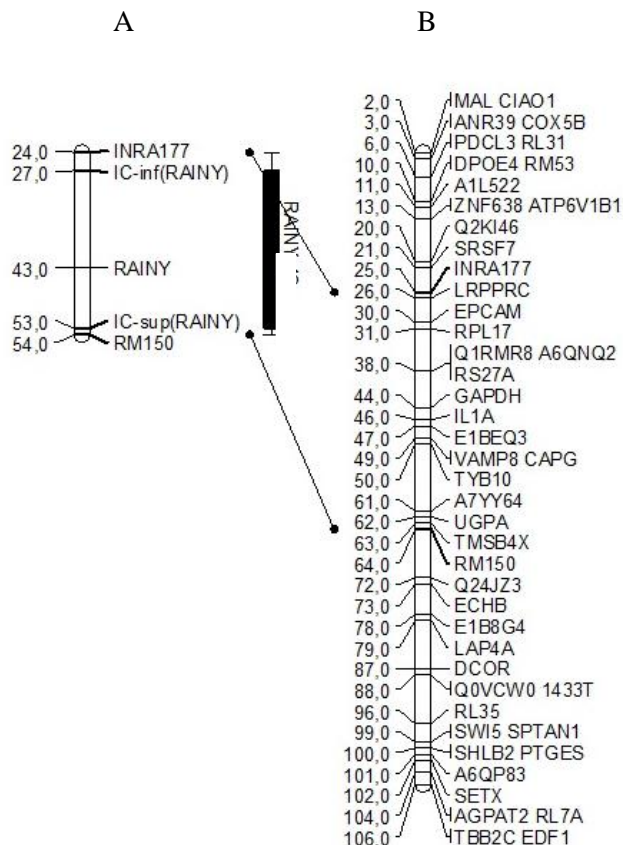
IC-inf: Intervalo de confiança inferior

IC-sup: intervalo de confiança superior

DRY: QTL para resistência a carrapatos na época da seca

BM1237 e BMS2614: marcadores flanqueadores do QTL

### BTA11



A: mapa genético (cM)

B: mapa físico (pb)

IC-inf: Intervalo de confiança inferior

IC-sup: intervalo de confiança superior

RAINY: QTL para resistência a carrapatos na época das águas

INRA177 e RM150: marcadores flanqueadores do QTL

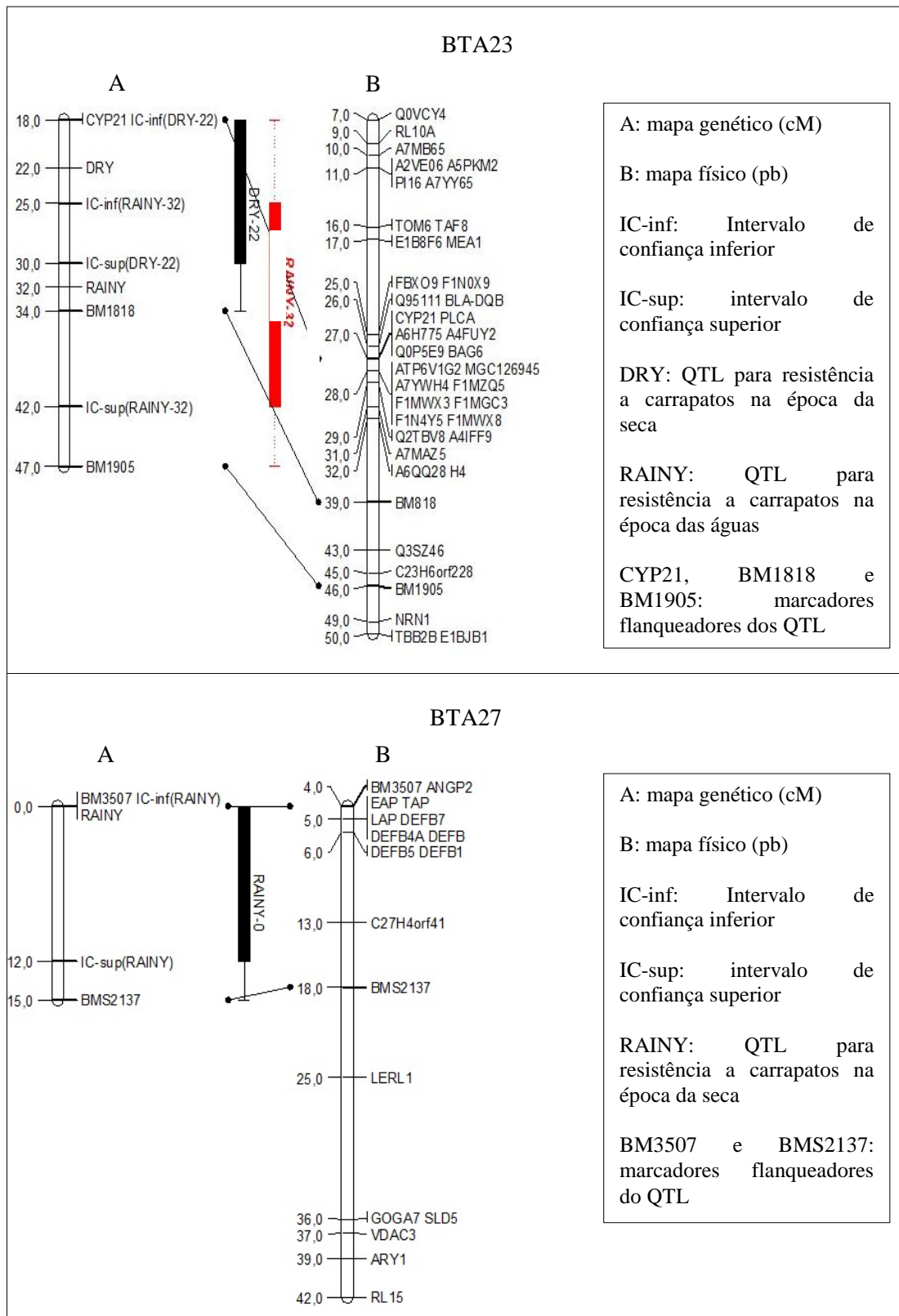


Figura 1: Mapa genético dos cromossomos de bovinos Holandês x Gir que contêm QTL para resistência a carrapatos (Machado et al., 2010) e mapeamento físico dos transcritos representados em duas bibliotecas de pele de bovinos Holandês x Gir sob infestação por carrapatos.

Observou-se uma média de 33,93 transcritos mapeados por cromossomo, com valores variando de 10 transcritos no BTA28 a 84 no BTA5. A densidade média foi de um transcrito a cada 3,79 cM; variando de um transcrito a cada 1,50 cM no BTA18 a um a cada 7,45 cM no BTA20. A representação gráfica da densidade de transcritos está representada: Figura 2.

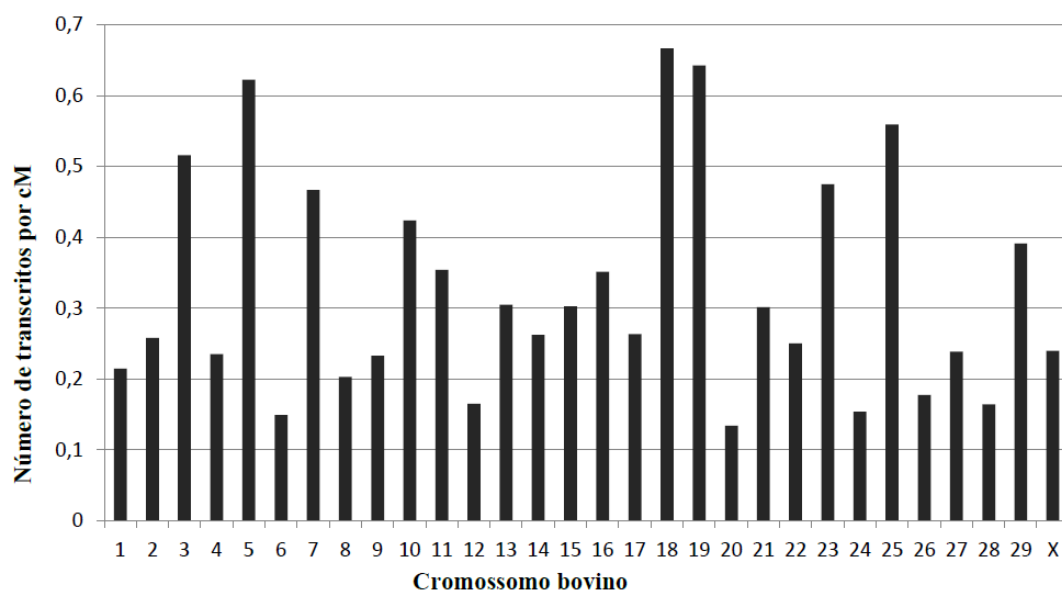


Figura 2: Número de transcritos, derivados de duas bibliotecas de pele de bovinos Holandês x Gir, mapeados por cM de cromossomo bovino.

Machado et al. (2010) identificaram sete QTL para resistência a carrapatos nos cromossomos 2, 5, 10, 11, 23 e 27 de bovinos. Foi possível mapear transcritos na região delimitada pelos marcadores flanqueadores de todos os QTL identificados. O número médio de transcritos por região delimitada por flanqueadores foi de 18,7; variando de nove (BTA2) a 42 (BTA10). A densidade média foi de um transcrito a cada 4,64 cM; variando de um transcrito a cada 1,45 cM (BTA23) a um a cada 6 cM (BTA2). A representação gráfica da densidade de transcritos está representada na Figura 3.

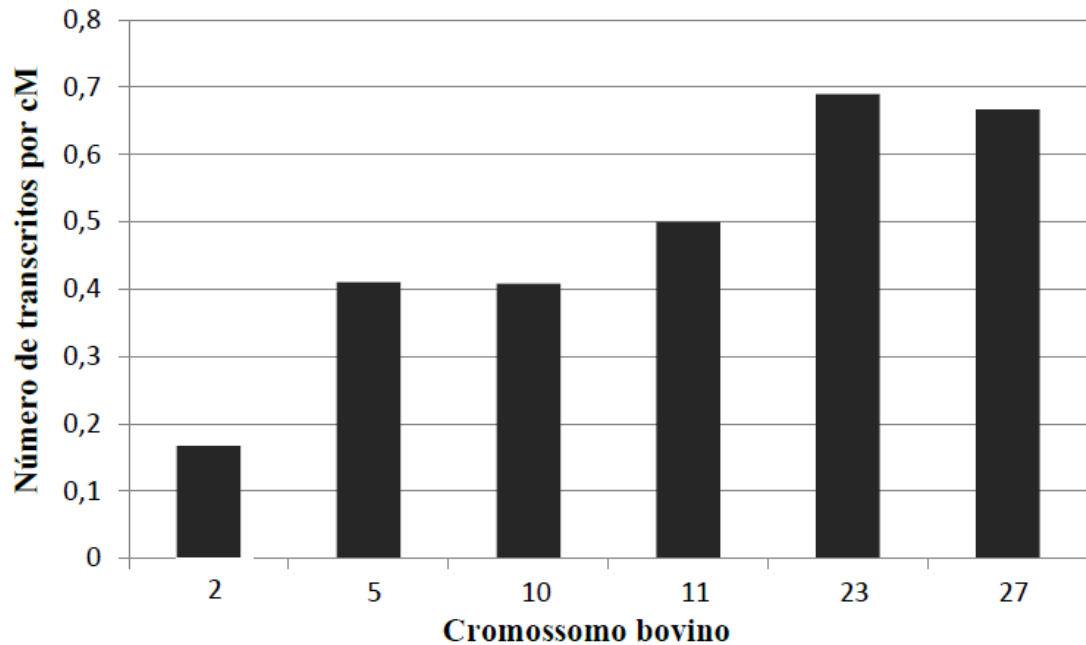


Figura 3: Número de transcritos mapeados por cM da região delimitada pelos marcadores flanqueadores dos QTL identificados por cromossomo bovino.

A análise detalhada do mapeamento de transcritos nas regiões delimitadas pelos marcadores flanqueadores de QTL, por cromossomo bovino, é apresentada a seguir.

#### **Cromossomo Dois (BTA2)**

Um total de 33 transcritos foram mapeados no BTA2, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 3,88 cM. No referido cromossomo também foi mapeado um QTL para resistência a carrapato no período da seca ( $P_c < 0,01$ ), com provável posição a 56 cM e intervalo de confiança de 43-65 cM. Tal QTL explica 4,22% da variação fenotípica (Machado et al., 2010).

Entre as posições dos marcadores flanqueadores (MNB83 e TGLA226) da região de detecção do QTL, foram mapeados nove transcritos, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada seis cM, mas nenhum deles refere-se a genes relacionados à resposta imunológica.

#### **Cromossomo Cinco (BTA5)**

Um total de 84 transcritos foram mapeados no BTA5, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 1,61 cM. No referido cromossomo, Machado et al. (2010) mapearam um QTL para resistência a carrapato no período das águas ( $P_c < 0,01$ ), com provável posição a 140 cM e intervalo de confiança de 129-149 cM. Este QTL explica 5,57% e os alelos da raça Holandesa causam um decréscimo no

número de carrapatos. Uma das possíveis explicações para tal fato é que a seleção genética para resistência a carrapatos exercida ao longo de vários anos tenha ocasionado a expressão de alelos crípticos.

Entre as posições dos marcadores flanqueadores (BMS490 e BMS1248) da região de detecção do QTL, foram mapeados 16 transcritos, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 2,44 cM, dentre os quais está o gene CD63 (Figura 4).

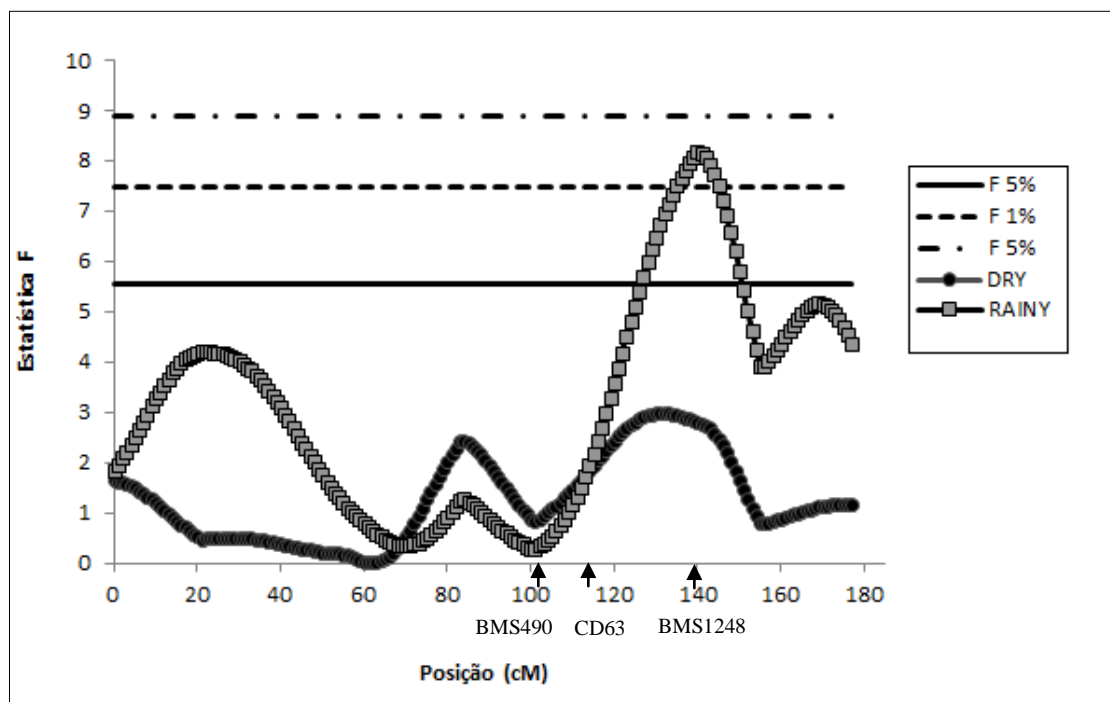


Figura 4: Estatística F ao longo do BTA5 e mapeamento de transcritos na região entre os marcadores flanqueadores. Resultado da análise considerando-se o modelo aditivo + dominante e as características resistência a carrapatos na época da seca (DRY) e na época das águas (RAINY). O eixo X indica a posição relativa no mapa genético. As setas indicam a posição dos marcadores BMS490 e BMS1248 e do gene CD63. As linhas horizontais indicam os níveis de significância cromossômico (5% - linha contínua, 1% - linha tracejada) e genômico (5% - linha intermitente). Adaptado de: Machado et al. (2010).

O marcador de superfície CD63 é um dos membros da superfamília transmembrana-4, consistindo em uma glicoproteína de superfície celular expressa em células ativadas, como basófilos, mastócitos, macrófagos e plaquetas (Nieuwenhuis et al., 1987; Metzelaar et al., 1991). Nos granulócitos em repouso, o

CD63 está localizado nas membranas dos grânulos intra-citoplasmáticos e praticamente ausente da superfície celular (Füreder et al., 1994; Valente et al., 2001), mas durante a exocitose quando as membranas dos grânulos se fundem com a membrana celular, é translocado para a superfície celular (Monneret-Vautrin et al., 1999; Sainte-Laudy et al., 1998; Lambert et al., 2003). Nos basófilos, foi demonstrada uma correlação estreita entre a expressão de CD63 e a libertação de histamina (Knol et al., 1991).

### **Cromossomo Dez (BTA10)**

Um total de 50 transcritos foram mapeados no BTA10, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 3,36 cM. No referido cromossomo, Machado et al. (2010) mapearam dois picos de QTL para resistência a carrapato na época da seca ( $P_c < 0,05$ ), com provável posição a 19 cM e intervalo de confiança de 32-70 cM. Tal QTL explica 4,0% da variação fenotípica da característica.

Entre as posições dos marcadores flaqueadores (BM1237 e BMS2614) da região de detecção do QTL, foram mapeados 42 transcritos, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 2,45 cM. Dentre estes transcritos está C2C4A (Figura 5).

Acredita-se que a proteína codificada por C2C4A possa estar envolvida em processos inflamatórios, na medida em que sua síntese é induzida por citocinas pró-inflamatórias (Warton et al., 2004) e na regulação da arquitetura e adesão celular.

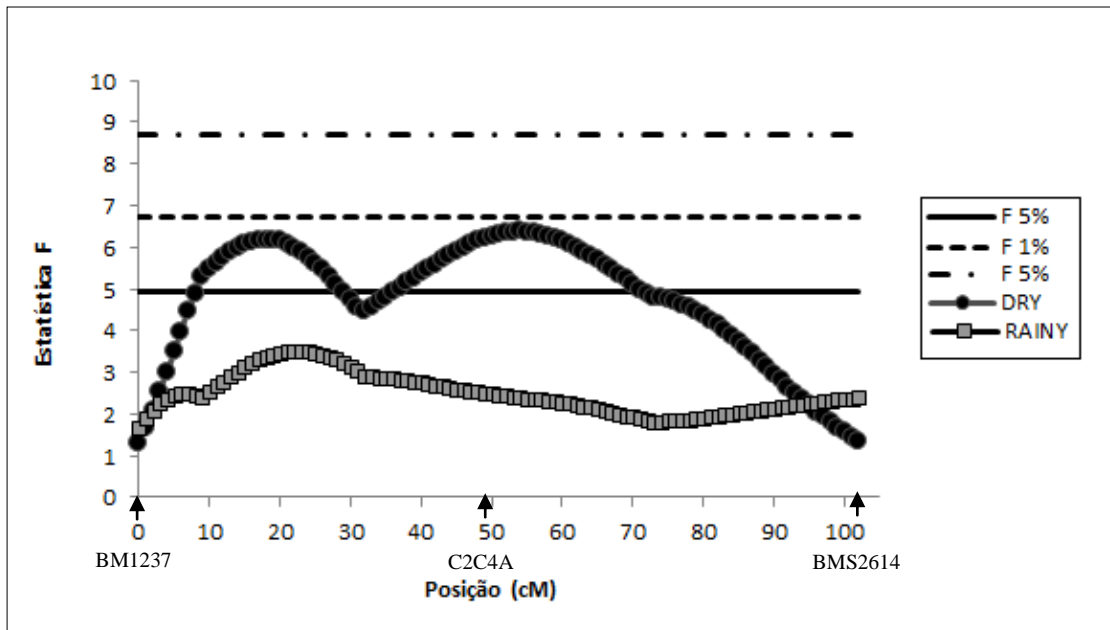


Figura 5: Estatística F ao longo do BTA10 e mapeamento de transcritos na região entre os marcadores flanqueadores do QTL. Resultado da análise considerando-se o modelo aditivo + dominante e as características resistência a carrapatos na época da seca (DRY) e na época das águas (RAINY). O eixo X indica a posição relativa no mapa genético. As setas indicam a posição dos marcadores BM1237 e BMS2614 e do gene C2C4A. As linhas horizontais indicam os níveis de significância cromossômico (5% - linha contínua, 1% - linha tracejada) e genômico (5% - linha intermitente). Adaptado de: Machado et al. (2010).

### **Cromossomo 11 (BTA11)**

Um total de 46 transcritos foram mapeados no BTA11, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 2,83 cM. No referido cromossomo, Machado et al. (2010) mapearam um QTL para resistência a carrapato no período da chuva (Pg < 0,05), com provável posição a 43 cM e intervalo de confiança de 27-53 cM. Tal QTL explica 5,26% da variação fenotípica.

Entre as posições dos marcadores flanqueadores (INRA177 e RM150) da região de detecção do QTL, foram mapeados 15 transcritos, correspondendo a uma densidade de um transcrito a cada 2 cM, dentre os quais está IL1A (Figura 6).

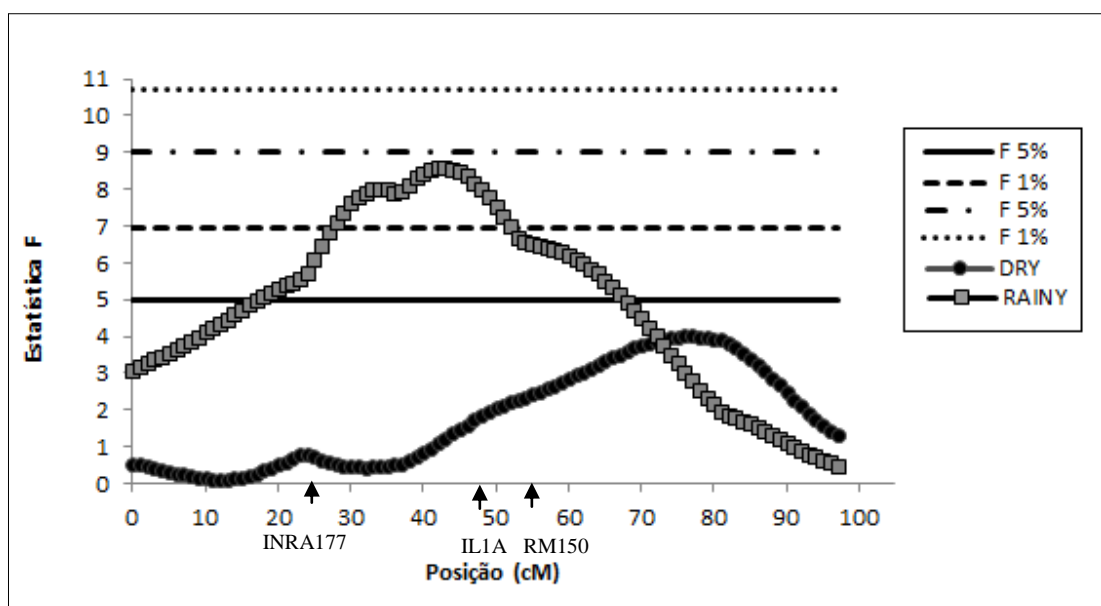


Figura 6: Estatística F ao longo do BTA11 e mapeamento de transcritos na região entre os marcadores flanqueadores do QTL. Resultado da análise considerando-se o modelo aditivo + dominante e as características resistência a carrapatos na época da seca (DRY) e na época das águas (RAINY). O eixo X indica a posição relativa no mapa genético. As setas indicam a posição dos marcadores INRA177 e RM150 e do gene IL1A. As linhas horizontais indicam os níveis de significância cromossômico (5% - linha contínua, 1% - linha tracejada) e genômico (5% - linha intermitente, 1% - linha pontilhada). Adaptado de: Machado et al. (2010).

O gene IL1A é um membro da família das interleucinas-1, sendo expresso por uma variedade de células, como por exemplo, monócitos, macrófagos, queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans, linfócitos T e B (Dinarello, 1989). A proteína IL-1 é uma citocina pluripotente e multifuncional, que possui um importante papel na iniciação e desenvolvimento de respostas inflamatórias e imunes (Uchi et al., 2000).

Os queratinócitos produzem IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que possuem atividades biológicas similares, dentre as quais podem ser citadas: mediação da resposta de fase aguda, induzindo a síntese de outras citocinas como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF; promoção da diferenciação de queratinócitos e ativação das células de Langerhans, sendo estas potentes células apresentadoras de antígenos (APC) (Enk & Katz, 1992; Uchi et al., 2000). A maior parte da IL-1 sintetizada por queratinócitos permanece no citoplasma e é normalmente perdida devido à descamação do extrato córneo. No entanto, na ocorrência de uma injúria na pele ou ainda quando os queratinócitos

sofrem uma deformação mecânica, uma grande quantidade de IL-1 é liberada, podendo levar a uma rápida resposta imune (Lee et al., 1997; Uchi et al., 2000).

A partir de um ensaio de RT-qPCR, Piper et al. (2008) detectaram uma maior expressão de IL-1 $\beta$  nos locais de fixação do carrapato do que nos locais livres do parasita em animais da raça Holandesa infestados. O mesmo não foi observado nas amostras derivadas dos animais da raça Brahman.

### **Cromossomo 23 (BTA23)**

Um total de 38 transcritos foram mapeados no BTA23, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 2,11 cM. No referido cromossomo, Machado et al. (2010) mapearam dois QTL. Um deles foi associado à resistência a carrapatos durante o período da seca ( $P_g < 0,01$ ), sua provável posição é 12 cM e o intervalo de confiança varia de 18 a 30 cM. O outro QTL foi associado à resistência a carrapatos durante o período das águas ( $P_g < 0,01$ ), com provável posição a 32 cM e o intervalo de confiança variando de 25 a 42 cM. Tais QTL explicam 5,90 e 5,82% da variação fenotípica, respectivamente. Entre as posições dos marcadores flanqueadores (CYP21 e BM1905) da região de detecção do QTL para resistência a carrapato na época das águas, foram mapeados 20 transcritos, correspondendo a uma densidade de um transcrito a cada 1,45 cM, dentre os quais está BLA-DQB (Figura 7).

O gene codificante para o MHC bovino, classe II, DQ beta (BLA-DQB) é expresso na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). O complexo antígeno/MHC II interage com os receptores presentes na superfície dos LT CD4+, proporcionando a especificidade de ação destas células. Uma vez ativados, os LT CD4 mobilizam outros componentes do sistema imunológico, participando ativamente da imunorregulação (Tizard, 2009). A expressão do citado gene na pele bovina pode ser resultado da movimentação de APC do sangue periférico em direção à pele, com objetivo de combater a infestação.

O loco MHC bovino tem sido amplamente estudado em razão de sua influência sobre características produtivas e características relacionadas à saúde animal (Machado et al., 2005). Alelos de genes do MHC II têm sido associados à incidência de diversas doenças, como mastite (Yoshida et al., 2011) e leucemia viral bovina (Juliarena et al., 2008). Em um trabalho a partir da mesma população utilizada no presente estudo, Martinez et al. (2006) identificaram três alelos do gene DRB3.2 associados à resistência ao carrapato bovino.

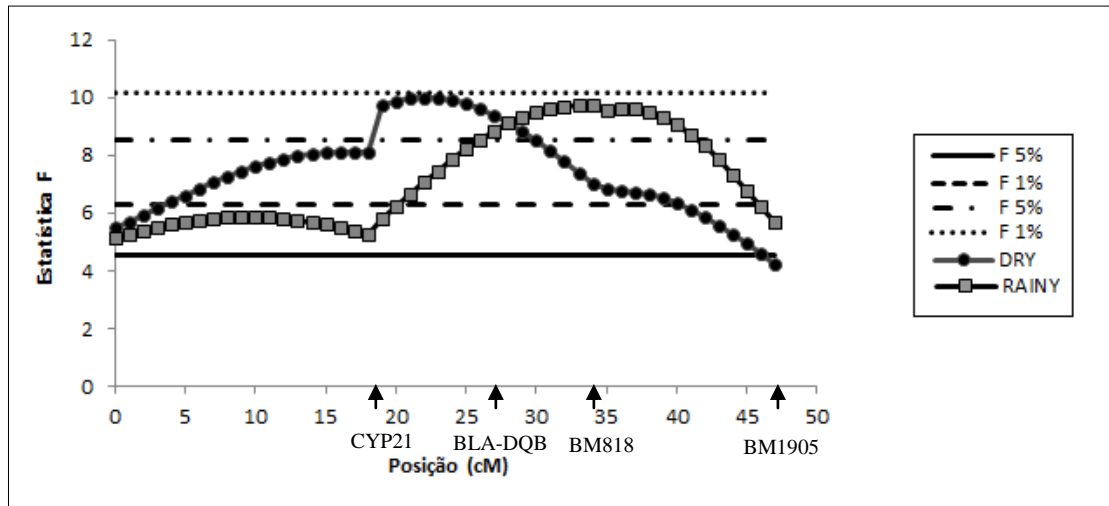


Figura 7: Estatística F ao longo do BTA23 e mapeamento de transcritos na região entre os marcadores flanqueadores do QTL. Resultado da análise considerando-se o modelo aditivo + dominante e as características resistência a carrapatos na época da seca (DRY) e na época das águas (RAINY). O eixo X indica a posição relativa no mapa genético. As setas indicam a posição dos marcadores CYP21 e BMS818 e do gene BLA-DQB. As linhas horizontais indicam os níveis de significância cromossômico (5% - linha contínua, 1% - linha tracejada) e genômico (5% - linha intermitente, 1% - linha pontilhada). Adaptado de: Machado et al. (2010).

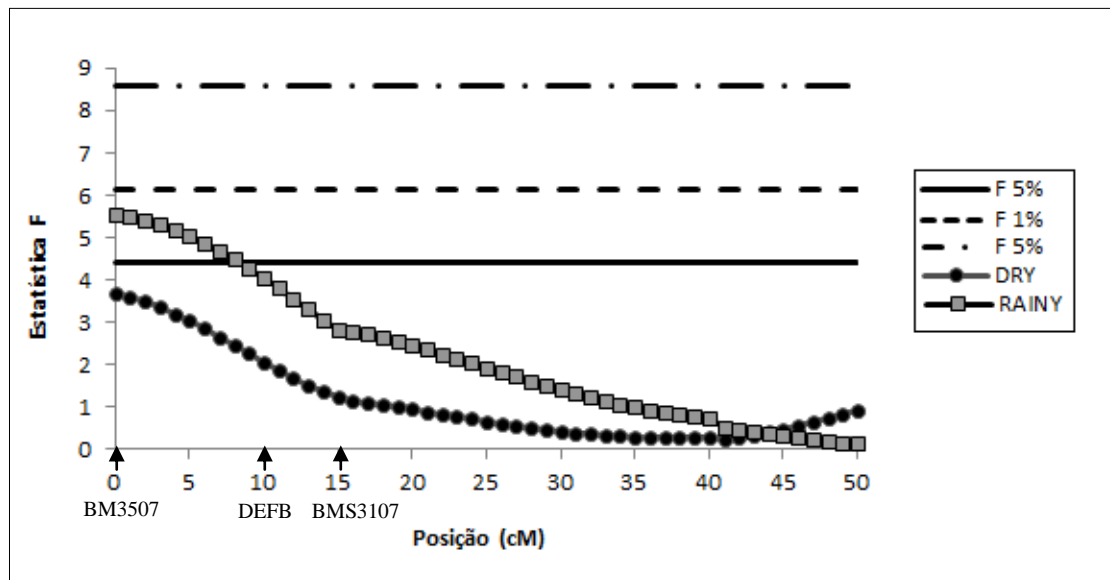
### Cromossomo 27 (BTA27)

Um total de 16 transcritos foram mapeados no BTA27, o que corresponde a uma densidade de 1 gene a cada 4,19 cM. No referido cromossomo, Machado et al. (2010) mapearam um QTL para resistência a carrapato no período da chuva ( $P_c < 0,01$ ), com provável posição a 12 cM e intervalo de confiança de 0-12 cM. Tal QTL explica 3,31% da variação fenotípica da característica.

Entre as posições dos marcadores flanqueadores (BM3507 e BMS2137) da região de detecção do QTL, foram mapeados 10 transcritos, o que corresponde a uma densidade de um transcrito a cada 1,5 cM. Dentre estes se podem citar cinco constituintes da família das  $\beta$ -defensinas: DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5 e DEFB7 (Figura 8).

As defensinas (DEFs) são peptídeos expressos nas células epiteliais e fagócitos, possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, leveduras e vírus. O principal mecanismo da atividade antimicrobiana e citotóxica das DEFs consiste na formação de poros nas membranas

alvo, mas alguns destes peptídeos possuem ainda atividade quimiotática. A síntese de DEF pode ser constitutiva, como no caso da  $\beta$ -defensina 1 ou induzida por infecções microbianas e/ou por citocinas, como como no caso da  $\beta$ -defensina 4 (Gracia et al., 2001; Ganz, 2003).



## CONCLUSÕES

Foram identificados nove genes com potencial influência sobre a variação fenotípica da resistência ao carrapato bovino: IL1A, BLA-DQB, DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A e CD63. São necessários estudos acerca da expressão gênica diferencial entre animais susceptíveis e resistentes ao referido parasita para validá-los como candidatos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental & Applied Acarology**, v.7, p. 5-13, 1989.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, p.270-276. 1997.
- DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1999.
- ENK, A.H.; KATZ, S.I. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p.1398–402, 1992.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175-185, 1998.
- FÜREDER, W.; AGIS, H.; SPERR, W.R.; LECHNER, K.; VALENT, P. The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. **Allergy**, v. 49, p. 861-865, 1994.
- GARCÍA, J-R.C.; KRAUSE, A.; SCHULZ, S.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F-J; KLÜVER, E.; ADERMANN, K.; FORSSMANN, U.; FRIMPONG-BOATENG, A.; BALS, R.; FORSSMANN, W-G. Human  $\beta$ -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. **The FASEB Journal** express article 10.1096/fj.00-0865fje. Published online June 18, 2001.
- HAUSER, C.; SAURAT, J.H.; SCHMITT, A.; JAUNIN, F.; DAYER, J.M. Interleukin 1 is present in normal human epidermis. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 9, p. 3317-3323, 1986.
- HUANG, X. AND MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p.868-877, 1999.
- JULIARENA, M.A.; POLI, M.; SALA, L.; CERIANI, C.; GUTIERREZ, S.; DOLCINI, G.; RODRÍGUEZ, E.M.; MARINˆO, B.; RODRÍGUEZ-DUBRA, C.; ESTEBAN, E.N. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLADRB3.2 gene. **Animal Genetics**, v.39, issue 4, p. 432-438, 2008.

- KNOL, E.F.; MUL, F.P.J.; JANSEN, H.; CALAFAT, J.; ROOS, D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. **Journal of Allergy Clinical and Immunology**, v.88, p. 328-338, 1991.
- LAMBERT, C.; GUILLOUX, L.; DZVIGA, C.; GOURGAUDMASSIAS, C.; GENIN, C. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. **Cytometry**, v. 52B, p. 13-19, 2003.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, 55: 263-344, 1995.
- LEE, R.T.; BRIGGS, W.H.; CHENG, G.C.; ROSSITER, H.B. LIBBY P, KUPPER T. Mechanical deformation promotes secretion of IL-1a and IL-1 receptor antagonist. **Journal of Immunology**, v.59, p. 5084–5088, 1997.
- LIU, L.; GONG, G.; LIU, Y.; NATARAJAN, S.; LARKIN, D, M.; DER WIND, A. E. V.; REBEIZ, J. E. Multi-species comparative mapping in silico using the COMPASS strategy. **Bioinformatics**, v.20, n.2, p.148-154, 2004.
- MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.F. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, 2005.
- MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.; TEODORO, R.L.; PIRES, M.A.; PEIXOTO, M.G.C.D.; FREITAS, C.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; SILVA, M.V.G.B.; GUIMARÃES, S.E.F.; REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R.S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, 11: 280, 2010.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 4, 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2002.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; SILVA, M.V.G.B.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; CAMPOS, A.L.; GUIMARÃES, M.F.M.; AZEVEDO, A.L.S.; PIRES, M.F.A.; VERNEQUE, R.S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n.3, p.513-524, 2006.

- METZELAAR, M.J.; WIJINGAARD, P.L.; PETERS, P.J.; SIXMA, J.J.; NIEUWENHUIS, H.K.; CLEVERS, H.C. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 3239-3245, 1991.
- MONNERET-VAUTRIN, D.A.; SAINTE-LAUDY, J.; KANNY, G.; FREMONT, S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 82, p. 33-40, 1999.
- NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; MARTINS, M.F.; PEIXOTO, J.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; LOPES, P.S. Expressed sequenced tags profiling of resistant and susceptible Gyr x Holstein cattle infested with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**. Ahead of Print, 2011.
- NIEUWENHUIS, H.K.; VAN OOSTERHOUT, J.J.; ROZEMULLER, E.; VAN IWAARDEN, F.; SIXMA, J.J. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. **Blood**, v. 70, p. 838-845, 1987.
- PIPER, E.K., JACKSON, L.A., BAGNALL, N.H., KONGSUWAN, K.K., LEW, A.E., JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p.110–119, 2008.
- SAINTE-LAUDY, J.; SABBAH, A.; VALLON, C.; GUERIN, J.C. Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. **Inflammation Research**, v. 47, p. 401-408, 1998.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568 p.
- SMITH, T.P.L.; GROSSE, W.M.; FREKING, B.A.; ROBERTS, A.J.; STONE, R.T.; CASAS, E.; WRAY, J.E.; WHITE, J.; CHO, J.; FAHRENKRUG, S.C.; BENNETT, G.L.; HEATON, M.P.; LAEGREID, W.W.; ROHRER, G.A.; CHITKO-MCKOWN, C.G.; PERTEA, G.; HOLT, I.; KARAMYCHEVA, S.;

- LIANG, F.; QUACKENBUSH, J.; KEELE, J.W. Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. **Genome Research**, v.11, p.626-630, 2001.
- SUCHYTA, S.P.; SIPKOVSKY, S.; KRUSKA, R.; JEFFERS, A.; MCNULTY, A.; COUSSENS, M. J.; TEMPELMAN, R.J.; HALGREN, R.; SAAMA, P.M.; BAUMAN, D.E.; BOISCLAIR, Y.R.; BURTON, J.L.; COLLIER, R.J.; DE PETERS, E.J.; FERRIS, T.A.; LUCY, M.C.; MCUIRE, M.A.; MEDRANO, J.F.; OVERTON, T.R.; SMITH, T.P.; SMITH, G.W.; SONSTEGARD, T.S; SPAIN, J.N.; SPIERS, D.E.; YAO, J.; COUSSENS, P.M. Development and testing of a high-density cDNA microarray resource for cattle. **Physiological Genomics**, v.15, p.158-164. 2003.
- TIZAR, I.R. **Introducción a la inmunología veterinaria**. 8 ed. Barcelona, 2009. 574p.
- UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, Suppl. 1, p. S29–S38, 2000.
- VALENT, P.; SCHERNTHANER, G.H.; SPERR, W.R.; FRITSCH, G.; AGIS, H.; WILHEIM, M.; BÜHRING, H.J.; ORFAO, A.; ESCRIBANO, L. Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease. **Immunological Reviews**, v. 179, p. 74-81, 2001.
- VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, n.1, p.77-78, 2002.
- WANG, Y.H.; REVERTER, A.; KEMP, D.; MCWILLIAM, S.M.; INGHAM, A.; DAVIS, C.K.; MOORE, R.J.; LEHNERT, S.A. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.47, p. 1397-1407, 2007.
- WARTON, K.; FOSTER, N.C.; GOLD, W.A.; STANLEY, K.K. A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. **Gene**, v. 342, n. 1, p. 85-95, 2004.
- WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology**, v.32, p. 457 - 465 , 1977.
- YOSHIDA, T.; FURUTA, H.; KONDO, Y.; MUKOYAMA, H. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese

Holstein. **Animal Science Journal**. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00972.x.  
2011.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for  
aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v.7, p. 203-214,  
2000.

### Capítulo III

## IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE SNP E MICROSSATÉLITES A PARTIR DE EST DE PELE DE BOVINOS HOLANDÊS X GIR

### RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo a identificação *in silico* de marcadores microssatélites e SNP a partir de EST derivadas de duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos Holandês x Gir infestados pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Para a detecção de microssatélites, foi utilizada a *pipeline* d2cluster/CAP3/MISA. O conjunto de 1.292 sequências únicas permitiu a detecção de 168 microssatélites. Desconsiderando-se os monômeros, a classe mais abundante de microssatélites foram os dímeros, seguidos pelos trímeros e tetrâmeros. Ainda desconsiderando-se os monômeros, obteve-se sucesso no desenho de *primers* para 19 EST-SSR, sendo que somente cinco destas referem-se a regiões transcritas a proteínas. Para a detecção de SNP utilizou-se a *pipeline* RepeatMasker/d2cluster/CAP3/AutoSnp. Para aumentar a redundância do conjunto de EST, realizou-se o procedimento de enriquecimento a partir de sequências depositadas em bancos de dados. A confirmação dos SNP foi realizada a partir da inspeção visual dos arquivos de qualidade das EST-SNP. Foi possível detectar 10 SNP a partir de apenas um *contig*, sendo este formado por 27 sequências, possuindo 652 pb. Após validação experimental dos resultados obtidos *in silico*, os marcadores moleculares identificados no presente trabalho poderão ser utilizados em estudos de mapeamento genômico, genética de populações, testes de paternidade e para a seleção de indivíduos geneticamente superiores.

**PALAVRAS-CHAVE:** EST, biblioteca de cDNA, Gir, Holandês

### ABSTRACT

The accomplishment of the present study had as objective to identify SNP and microsatellite markers from EST libraries derived from two cDNA skin Holstein x Gir cattle infested by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. For detection of

microsatellites, we used the pipeline d2cluster/CAP3/MISA. A total of 168 microsatellites were identified from 1,292 unique sequences. Disregarding the monomers, the dinucleotide repeat motif was the most abundant SSR, followed by trimers and tetramers. Still ignoring the monomers, primers were design successfully for 19 EST-SSR, and only five of these code to proteins. The pipeline RepeatMasker/d2cluster/CAP3/AutoSNP was used to identify SNP. To increase the redundancy of the set of EST was carried out the enrichment procedure from sequences deposited in databases. Confirmation of SNP was performed by visual inspection of quality files of EST. 10 SNP could be detected from a unique contig composed of 27 sequences and has 652 bp. After experimental validation, molecular markers identified in this study can be used in studies of genomic mapping, population genetics, paternity analyses and assisted marker selection.

**KEY WORDS:** EST, cDNA library, Gir, Holstein

## INTRODUÇÃO

O carrapato *R. (B.) microplus* é um dos mais importantes ectoparasitas dos rebanhos bovinos de regiões tropicais e subtropicais, atingido animais da América Central, América do Sul, Ásia, África e Oceania. No Brasil, estima-se que os prejuízos causados pelo carrapato bovino correspondam a US\$ 2 bilhões anuais (Grisi et al., 2002). Tais prejuízos são decorrentes da perda de peso, baixa eficiência alimentar, perdas na qualidade do couro, toxicoses, lesões da pele, anemia e transmissão dos agentes etiológicos da tristeza parasitária bovina (Gonzales, 1975; Cordoves, 1997).

Sabe-se da existência de diferentes níveis de resistência ao carrapato bovino e que esta é geneticamente herdável. Assim, uma possibilidade para o controle das infestações é a seleção de indivíduos resistentes. Nesse sentido, a identificação de marcadores moleculares que possam auxiliar em tal seleção torna-se fundamental.

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados para estudos genômicos estão os microsatélites (*Single Sequence Repeat* - SSR) e os polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP).

Microsatélites são sequências curtas, compostas de repetições em *tandem* de um a seis nucleotídeos (Guimarães, 2001). Os microsatélites são flanqueados por

sequências supostamente únicas no genoma e conservados entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies relacionadas. Essas sequências únicas servem como molde para a síntese de *primers* de microssatélites, que permitirão a amplificação do segmento de DNA que possui a região repetitiva, ou seja, a amplificação do loco único de microssatélite.

Marcadores microssatélites têm sido bastante utilizados em projetos de mapeamento por apresentar alto grau de polimorfismo alélico e co-dominância. Além disso, estão amplamente distribuídos pelo genoma de eucariotos, permitem a automação das análises, sendo que estas possuem confiabilidade e reprodutibilidade, e os mapas genéticos de algumas espécies domésticas de interesse econômico possuem alta densidade. O alto grau de polimorfismo observado nos microssatélites ainda não é totalmente compreendido, mas sugere-se que sua origem esteja associada à ocorrência de *crossing-over* desigual entre as cromátides irmãs ou a erros de replicação do DNA, em um processo conhecido como *slippage* ou deslizamento da DNA polimerase.

Polimorfismos de base única (SNP) são alterações, com frequência mínima de 1% na população, de uma única base entre fragmentos homólogos de DNA, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras, como em regiões não codificadoras do genoma. Os SNP são classificados de acordo com a variação de nucleotídeos em transições (em que uma base púrica é substituída por outra púrica ou uma base pirimídica é substituída por outra pirimídica) e transversões (em que uma base púrica é substituída por uma pirimídica, ou vice-versa).

A grande vantagem da utilização de SNP como marcador molecular consiste na abundância de polimorfismos entre alelos de um determinado gene e na ampla distribuição, podendo estar presentes em praticamente todos os locos gênicos. No entanto, a maioria dos marcadores do tipo SNP são bialélicos, resultando em pouca informação por loco. Do ponto de vista de mapeamento, de cinco a 10 marcadores desse tipo fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco de microssatélite, de tal forma que os mapas de SNP devem ter densidade maior do que os de microssatélites para se obter o mesmo poder de detecção de QTL. Porém, a densidade necessária ao mapeamento fino de QTL só pode ser obtida com esse tipo de marcador (Vignal et al., 2002).

Uma das metodologias disponíveis para a identificação de marcadores moleculares consiste na análise de sequências obtidas de fragmentos clonados

(Vignal et al., 2002), como por exemplo, a análise de etiquetas de sequências expressas (*expressed sequence tags* – EST), que são pequenas sequências (200 – 500 nucleotídeos) obtidas a partir do sequenciamento de moléculas de cDNA derivadas do mRNA de interesse. O grande benefício em se detectar marcadores moleculares a partir de EST deve-se ao fato da possibilidade de identificação de mutações que possuam características funcionais (Kim et al., 2003).

Objetivou-se com este estudo a identificação *in silico* de marcadores SSR e SNP a partir de EST derivadas de duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos infestados pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População Experimental**

Foram utilizados animais pertencentes a uma população F2, desenvolvida pela Embrapa Gado de Leite, derivada do cruzamento entre quatro machos da raça Holandesa e 27 fêmeas da raça Gir. A formação detalhada da população foi descrita por Machado et al. (2010).

### **Conjunto de EST**

As EST utilizadas no presente estudo são provenientes de duas bibliotecas de cDNA construídas a partir de amostras de pele de bovinos pertencentes à geração F2 da população experimental e classificados como resistentes ou susceptíveis ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, após infestação artificial pelo referido parasita. A metodologia detalhada para a construção e sequenciamento das bibliotecas foi descrita por Nascimento et al. (2011).

### **Identificação *in silico* de EST-SSR**

As EST foram clusterizadas com o auxílio do *software* d2cluster (Burke et al., 1999) e montadas em *contigs* a partir do *software* CAP3 (Huang & Madan, 1999). Os parâmetros utilizados para o CAP3 (Huang e Madan, 1999) foram similaridade e *overlap* mínimos de 95% e 50 pb, respectivamente, e para o d2cluster (Burke et al., 1999), similaridade mínima de 80%. As EST que não formaram *contigs* foram

denominadas *singletons*. Esse procedimento possibilitou a obtenção de um conjunto de sequências únicas formado por *contigs* e *singletons*.

A identificação e a localização de microssatélites perfeitos e compostos, sendo estes caracterizados por possuir uma interrupção em seu *motif*, foram realizadas com o auxílio do *software* MISA (Thiel et al., 2003), considerando-se os parâmetros *default*. Assim, foram classificadas como microssatélites as sequências que apresentaram *motifs* entre um a seis nucleotídeos e os seguintes números mínimos de repetição: dez repetições para mononucleotídeos, seis para dinucleotídeos e cinco para tri, tetra, penta e hexa-nucleotídeos. Considerou-se 100 nucleotídeos o número máximo de interrupções entre dois SSR contidos em uma estrutura composta.

### **Identificação *in silico* de EST-SNP**

As regiões de baixa complexidade das EST foram mascaradas utilizando-se o *software* RepeatMasker. Posteriormente, realizou-se o alinhamento das EST contra o banco de dados de *traces* de bovinos do NCBI (disponível para *download* em: [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/TraceDB/bos\\_taurus/](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/TraceDB/bos_taurus/)), a partir do *software* Megablast (Zhang et al., 2000). A sequência em formato FASTA e o respectivo arquivo de qualidade das sequências que apresentaram identidade mínima de 90% e *hit score* mínimo de 100 nucleotídeos, com as EST do presente estudo, foram adicionados ao conjunto de dados, constituindo um banco de dados local. O procedimento de enriquecimento a partir de sequências depositadas em bancos de dados é de extrema importância em situações em que o conjunto de dados original é constituído por um número reduzido de sequências, na medida em que um dos parâmetros considerados para a detecção de SNP é a redundância do conjunto de EST utilizado.

As sequências do banco de dados local foram clusterizadas com o auxílio do *software* d2cluster (Burke et al., 1999) e montadas em *contigs* a partir do *software* CAP3 (Huang & Madan, 1999). Os parâmetros utilizados para o CAP3 (Huang e Madan, 1999) foram similaridade e *overlap* mínimos de 95% e 50 pb, respectivamente, e para o d2cluster (Burke et al., 1999), similaridade mínima de 80%. A identificação de SNP foi realizada com o auxílio do *software* AutoSNP (Barker et al., 2003), sendo que os polimorfismos foram definidos como uma posição da sequência consenso em que um determinado número de *reads* possui diferentes nucleotídeos. O número de *reads* que contém a mudança de base deve ser maior do

que a redundância mínima definida para o *contig*, o qual está relacionada com o número de *reads* que o formaram. Para cada *contig* que contém até sete sequências, a redundância mínima é dois; entre oito e 11 sequências, a redundância mínima é três; entre 12 e 19 sequências, a redundância mínima é quatro; e para 20 ou mais sequências, a redundância mínima é cinco. Esses valores conservativos são utilizados para limitar o efeito da acumulação de erros derivados da associação de um grande número de *reads*.

Como medida da confiabilidade das análises, foi calculado o *score* de co-segregação entre os SNP localizados em um mesmo *contig*. A inexistência de co-segregação implica na redução da possibilidade do polimorfismo representar uma variação genética verdadeira.

Realizou-se uma inspeção visual dos arquivos de qualidade das EST-SNP, garantindo-se um PHRED *score* mínimo igual a 20. Tal procedimento teve como objetivo minimizar a possibilidade de que os SNP identificados fossem derivados de erros de sequenciamento.

### **Anotação Funcional**

Para obter informações acerca da função gênica relacionada aos microssatélites e SNP detectados, as EST-SSR e EST-SNP foram comparadas ao banco de dados de transcritos RefSeq utilizando-se a versão *on line* do programa BLASTX (Altschul et al., 1990), considerando-se um *E-value* < 10.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Identificação *in silico* de EST-SSR**

Foram agrupadas 2.700 EST, a partir do programa CAP3 (Huang e Madan, 1999), formando uma sequência consenso para cada *contig*. O conjunto de 1.292 sequências únicas, representando possíveis transcritos bovinos, foi formado por 458 *contigs* e 834 *singletons*.

O conjunto de sequências únicas, representando aproximadamente 0,57 Mb, foi submetido ao *software* MISA, permitindo a detecção de 168 SSR em 157 sequências, sendo que apenas 10 destas apresentaram mais de um SSR. Os

mononucleotídeos foram o tipo mais abundante, apresentando uma frequência de 77,97%, seguidos pelos di (7,74%), tri (5,36%) e tetranucleotídeos (0,60%). Foram observados dez SSR em formação composta, representando 3,57%. As frequências dos diferentes tipos de SSR estão apresentadas na Figura 1. O número médio de repetições entre todos os *motifs* analisados foi de 13,93, variando de 5 repetições em tri e tetra-nucleotídeos a 30 em mononucleotídeos.

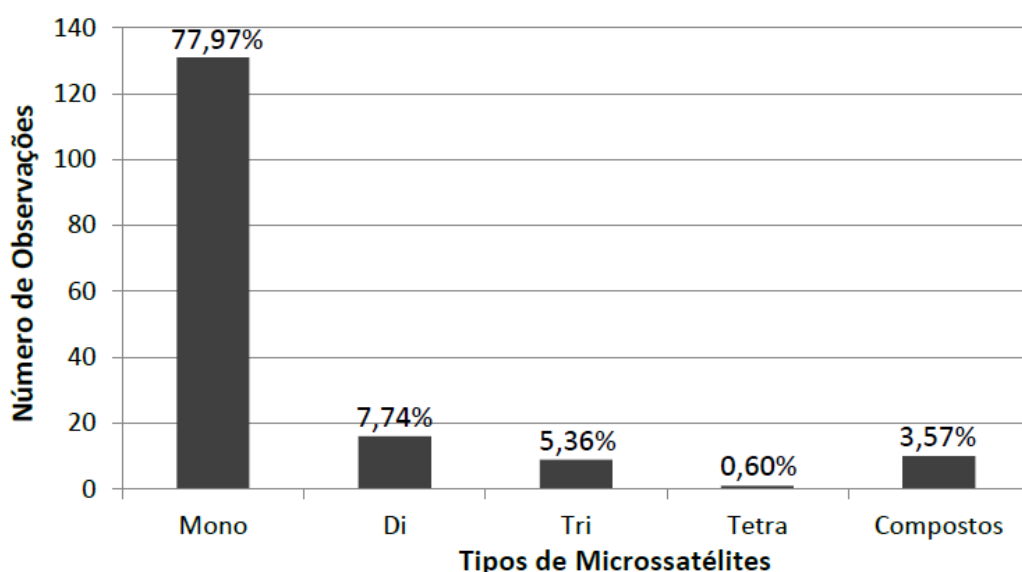


Figura 1: Frequência dos diferentes tipos de microssatélites (*motifs* de 1-4 unidades) identificados nas bibliotecas de pele de bovinos. Os números sobre as barras indicam a porcentagem de cada tipo de microssatélite em relação ao total.

Os resultados apresentados indicam que a frequência dos diferentes tamanhos de unidades de repetição dos SSR detectados nas bibliotecas de pele de bovinos é variável, sendo que os menores *motifs* foram predominantes. Quando o comprimento das unidades de repetição aumenta, suas ocorrências diminuem. Isso pode ser explicado pelo fato de que longas repetições possuem altas taxas de mutações, e por conseguinte, são menos estáveis (Wierdl et al., 1997).

Os SSR identificados apresentaram dois diferentes *motifs* para mono-; três para di-, seis para tri- e um para tetranucleotídeos. Entre os mono-, o *motif* mais frequente foi A/T, representando 99,28%; entre os di-, AC/GT e AT/AT, cada um representando 38,89%; entre os trinucleotídeos, AAG/CTT e AAT/ATT, cada um representando 20% (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição de *motifs* nos diferentes tipos de microssatélites, considerando-se a sequência complementar.

Motifs	Número de Repetições													Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
A/T	-	-	-	-	-	22	13	12	6	8	20	57	138	
C/G	-	-	-	-	-		1						1	
AC/GT	-	3	2						1	1			7	
AG/CT	-	3		1									4	
AT/AT	-	3	2		2								7	
AAC/GTT		1											1	
AAG/CTT		2											2	
AAT/ATT		1	1										2	
AGC/CTG	1												1	
AGG/CCT				1									1	
CCG/CGG	1	2											3	
AAAC/GTTT	1												1	
Total													168	

A maioria dos estudos para mineração de SSR a partir de EST em espécies animais, presente na literatura consultada, desconsidera a classe dos mononucleotídeos (Rohrer et al., 2002; Serapion et al., 2004; Perez et al. 2005; Ju et al., 2005; Yan et al., 2008; Nie et al, 2011). Tal fato pode ser justificado pela ocorrência de altas taxas de inserção ou deleção durante a replicação enzimática *in vitro* de homopolímeros compostos por oito ou mais nucleotídeos (Shind et al., 2003; Fazekas et al., 2010), devido ao processo de *slippage*. Estas altas taxas de mutação podem causar altas taxas de erros de genotipagem, diminuindo a acurácia das análises genômicas. Além disso, a qualidade das sequências após uma repetição mononucleotídica composta por 10 ou mais bases é muitas vezes bastante reduzida, inviabilizando o desenho de *primers* a partir das sequências flanqueadoras.

Desconsiderando-se os monômeros, a classe mais abundante de SSR encontrada no presente estudo passa a ser os dímeros, seguidos pelos trímeros e tetrâmeros. Tal resultado está de acordo com estudos empregando-se bovinos (Yan et al., 2008), suínos (Nie et al, 2011), zebrafish (Ju et al., 2005) e camarão (Serapion et al., 2004). O *motif* mais frequente em dinucleotídeos foi AC/GT, assim como o encontrado por Yan et al. (2008) e Nie et al. (2011). Tal resultado é consistente com o esperado para mamíferos, pois poli(GT) são as repetições mais frequentes, aparecendo em aproximadamente 5 a 10 x 10<sup>4</sup> locos individuais (Regitano & Veneroni, 2009).

Obteve-se sucesso no desenho de *primers* para 139 EST-SSR (83%), sendo que 84,17% destas referem-se a sequências de mono-; 8,63% de di-; 4,32 % de tri-; 0,72% de tetranucleotídeos e 2,88% a formações compostas. As sequências remanescentes não apresentaram região flanqueadora com tamanho adequado para o desenho de *primers*. As informações acerca das sequências *foward* e *reverse* e tamanho (pb) dos *primers*, temperatura de *melting* (°C) e tamanho esperado do produto da amplificação (pb) encontram-se na Tabela 2. Os resultados obtidos para monômeros e formações compostas foram omitidos.

Realizou-se a anotação das EST-SSR a partir das quais foi possível o desenho de *primers*. Foram consideradas apenas as sequências de EST que contêm di-, tri- e tetranucleotídeos. Das 19 EST-SSR analisadas, somente cinco referem-se a genes (Tabela 3). Tal resultado já era esperado, na medida em que SSR têm sido detectados principalmente no interior de regiões não codificantes do genoma.

Ao analisar a Tabela 3, pode-se perceber que nenhuma das EST-SSR detectadas foram mapeadas nos cromossomos bovinos onde Machado et al. (2010) detectaram QTL para resistência ao carrapato, sendo que estes autores empregaram a mesma população experimental do presente estudo.

Tabela 2: Sequências *forward* e *reverse*, tamanho e temperatura de *melting* dos *primers* e tamanho esperado do produto gerado para os SSR detectados a partir de duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos Holandês x Gir.<sup>1</sup>

Id <sup>1</sup>	Motif	Forward (5'-3')	Tm <sup>3</sup>	Tam <sup>4</sup>	Reverse (5'-3')	Tm <sup>3</sup>	Tam <sup>4</sup>	TamP <sup>5</sup>
SSR1	(TA)9	GGCGTTTAGAGATAAAGGCC	60,061	20	GCCTTCAAATCCCATCAGA	60,01	20	189
SSR2	(TG)6	CTGCCATCTCCTCACTGACC	60,829	20	GCCTTGTTCTTTATTGCCCA	60,07	20	101
SSR3	(AG)8	CCAAAATGGCCAGTGAAAAT	59,801	20	ACCGGTCTATGTTTTGTGGG	59,71	20	204
SSR4	(GT)7	ACTCTGGACCTCCCACCTCT	60,112	20	GTGGGTAAGACTGCACTCCC	59,58	20	143
SSR5	(AT)6	TCAGTACCATTTTCTAGGTTCCA	59,098	24	GTACAGCTGCAACCACCTCA	59,91	20	227
SSR6	(AT)6	TCATGCATCTATATTATCATTTTCTGT	57,460	27	CTGGAATCTACAGGCACAGC	58,47	20	144
SSR7	(AC)7	TGGTTGTCATCAAAGAGGCA	60,240	20	GTTCTGTCCATGTCCTGGCT	60,12	20	267
SSR8	(AT)7	CCAGGACATGGACAGAACCT	59,962	20	TCCATCCGTGTTGTACAGT	60,01	20	174
SSR9	(AT)9	GGTTGTCCTGCTAAGGATGC	59,700	20	ATGAACCCAAACAAAACCCA	60,07	20	157
SSR10	(TC)6	TGCAGACAGAGGAGCAGAGA	60,005	20	GAATTGTCCTTCCAAGCCAG	59,67	20	255
SSR11	(AG)6	TGAGACGGAGTGTGTTGGAG	59,864	20	TCTTTCCAAGGTCTGCCAGT	59,84	20	267
SSR12	(AG)6	TATCAAAGGGCCACCAGAAG	60,066	20	TCCACCCCAAAGTTCCTA	60,35	20	121
SSR13	(AGA)6	GAGGTCAGACTCCCAAGGTG	59,682	20	CTTCTTCTTGCCAAAGGTGG	59,85	20	122
SSR14	(CAG)5	CCTATGGAGGCCTGTCTGTC	59,679	20	ATGGTCACCTTCTCACTGCC	60,12	20	253
SSR15	(AAC)6	TTGGGCTGAACACTAGTCCC	60,111	20	AGCGTGGATGTTGGATGTTT	60,39	20	277
SSR16	(TTC)6	GTCAGCCTGCACTTGTGCTC	62,203	20	GAGCTGCGCCATTTACTTTC	59,99	20	205
SSR17	(GCG)5	CGCTGAGCCTAGAAGGAAGA	59,853	20	CGGAGAAGATGGGGAGTTC	59,60	19	194
SSR18	(CCT)8	CTCAGATGTTACGTCACGC	60,473	20	CATCAGCAGAAGTTGGACCC	60,66	20	103
SSR19	(TGTT)5	TGGTCACTCTTTCTGCACCA	60,440	20	CAAGGAGGTAGGTTAGAAAATGG	59,4	24	121

<sup>1</sup>Os resultados referentes a mononucleotídeos e formações compostas foram omitidos.

<sup>2</sup>Identificação

<sup>3</sup>Temperatura de *melting* em °C

<sup>4</sup>Tamanho do *primer* em pares de bases

<sup>5</sup>Tamanho do produto da amplificação dos *primers* em pares de bases

Tabela 3: Anotação gênica das EST-SSR detectadas a partir de duas bibliotecas de pele de bovinos Holandês x Gir<sup>1</sup>

Identificação do SSR	Motif	BTA	Gene	Símbolo	ID
SSR12	(AG)6	9	Domínio enoil-CoA hidratase-contendo proteína 1	F1MDK4	ENSBTAT00000005072
SSR13	(AGA)6	29	40S ribossomal proteína S30	RS30	ENSBTAT00000027728
SSR14	(CAG)5	19	Queratina, tipo I do citoesqueleto, 14	F1MC11	ENSBTAT00000036393
SSR16	(TTC)6	21	RNA helicase ATP-dependente DDX24	A6H7B6	ENSBTAT00000004441
SSR18	(CCT)8	29	Ciclina-D1 específica de G1/s	CCND1	ENSBTAT00000023277

<sup>1</sup>Anotação das EST-SSR cuja sequência flanqueadora permitiu o desenho de *primers*. Os resultados referentes a mononucleotídeos e formações compostas foram omitidos.

### Identificação *in silico* de EST-SNP

Um total de 2.700 EST de alta qualidade e livres de contaminantes foi submetido a alinhamento contra as sequências depositadas no banco de dados de *traces* de bovinos do NCBI (disponível para *download* em: [ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/TraceDB/bos\\_taurus/](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/TraceDB/bos_taurus/)). Como resultado, foram obtidas 1.722 sequências com elevada similaridade com as EST derivadas das bibliotecas de cDNA utilizadas no presente estudo, sendo então empregadas para aumentar a redundância do conjunto de dados original. Assim, 4.422 sequências foram submetidas à *pipeline* d2cluster/Cap3 gerando 516 *contigs*. Com o auxílio do *software* AutoSNP (Barker et al., 2003), foram identificados 12 SNP em apenas um *contig*, sendo este denominado *contig* 5 (Figura 2). O *contig* 5 possui 652 pb e foi formado por 27 sequências, sendo uma destas derivada do conjunto de dados original

e as demais, das sequências depositadas no banco de dados de *traces* do NCBI.

SNP1		Posição	201..... 226 ..... 251
		Consenso	GAAATAAGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGGAGAAAA *GAGGCTGAATAA'
gnl ti 175071033 eds10e09.y1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGTAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 175071032 eds15b03.x1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGTAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 175071034 eds14d06.y1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGTAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGGAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGGAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1			AGGATAGCTCAGTGAGNAAATTCAGTGGAGAAAAAGAGGCTGAATAATTCAGC
gnl ti 126976003 cbx18g02.x1			AGGATAGCTCAGTGAGGAAATTCAGTGGAGAAAA-GAGGCTGAATAATTCAGC
SNP2		Posição	263 ..... 301 ..... 313
		Consenso	AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTCAGTGAACAAGGC'
gnl ti 175071036 eds03a01.y1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTC GTGAACAAGGC
gnl ti 175071035 eds12h11.x1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTC GTGAACAAGGC
gnl ti 175071033 eds10e09.y1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTC GTGAACAAGGC
gnl ti 175071032 eds15b03.x1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTC GTGAACAAGGC
gnl ti 175071034 eds14d06.y1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTC GTGAACAAGGC
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTCGGTGAACAAGGC
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTCGGTGAACAAGGC
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1			AAGGTAAGAGAAAGAGCGACATGGTGAGACCAAGTTTCGGTACACAAGGC
gnl ti 126976003 cbx18g02.x1			AAGGTAAGAGAAAGAACGACATGGTGAGACCAAGTTTCGGTGAACAAGGC
SNP3		Posição	303 ..... 313 ..... 323
		Consenso	GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071037 eds04a07.x1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071036 eds03a01.y1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071035 eds12h11.x1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071033 eds10e09.y1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071032 eds15b03.x1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 175071034 eds14d06.y1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1			ACACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
gnl ti 126976003 cbx18g02.x1			GAACAAGGCCCGCACTTTATTTTCCAA
SNP4		Posição	316 ..... 356 ..... 371
		Consenso	CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071039 eds08h12.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071040 eds07h12.x1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071037 eds04a07.x1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071038 eds02b09.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071036 eds03a01.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071035 eds12h11.x1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071033 eds10e09.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071032 eds15b03.x1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 175071034 eds14d06.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA
gnl ti 126976003 cbx18g02.x1			CACTTTATTTTCCAAAGTAGTTTTTATACCTTAAGTTATGCATAGAGGATAATGGGGGAA

SNP5 e SNP6

Posição	372..... 388 .. 393 ..... 421
Consenso	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071045 eds09e06.y1	GGAAGGGGTAGAGTCATGCAGTAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071039 eds08h12.y1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071040 eds07h12.x1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071037 eds04a07.x1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071038 eds02b09.y1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071036 eds03a01.y1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071035 eds12h11.x1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071033 eds10e09.y1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071032 eds15b03.x1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 175071034 eds14d06.y1	GGAAGGGGTAGAGTCAGGCAGCAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1	GGAAGGGGTAGAGTCATGCAGTAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1	GGAAGGGGTAGAGTCATGCAGTAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1	GGAAGGGGTAGAGTCATGCAGTAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA
gnl ti 126976003 cbx18g02.x1	GGAAGGGGTAGAGTCATGCAGTAAGCCAGGCTTTCTTCCTGCAAACCTTATCATA

SNP7

Posição	627 ..... 651 ..... 673
Consenso	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
Bs_Res_88G03 622 0 622 ESD	GTTACAAACATTAAAGCTACTATTACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976012 cbx17d04.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976013 cbx13h02.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071043 eds05b05.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071044 eds14h06.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976011 cbx20d05.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071045 eds09e06.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071041 eds02e04.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071042 eds08f07.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071047 eds14b01.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071039 eds08h12.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071040 eds07h12.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976014 cbx14e03.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071037 eds04a07.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071038 eds02b09.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071036 eds03a01.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976015 cbx16f05.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071035 eds12h11.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976017 cbx04f09.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071033 eds10e09.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071032 eds15b03.x1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 175071034 eds14d06.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976006 cbx13h07.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976007 cbx12c06.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA
gnl ti 126976005 cbx20h11.y1	GTTACAAACATTAAAGCTACTACTCACACCAATTATATTAATCAATACA

!

SNP8	
Posição	851.....901
Consenso	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
Bs_Res_88G03 622 0 622 ESD	TCACATGTGGCCGGAAAA-CCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976012 cbx17d04.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976013 cbx13h02.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071043 eds05b05.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071044 eds14h06.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976011 cbx20d05.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071045 eds09e06.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071041 eds02e04.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071042 eds08f07.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071047 eds14b01.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071039 eds08h12.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071040 eds07h12.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976014 cbx14e03.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071037 eds04a07.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACCTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976015 cbx16f05.y1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 175071035 eds12h11.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
gnl ti 126976017 cbx04f09.x1	TCACATGTGGCCGGAAAAACGTATTCAGGCAGGCTAGAGGATTTCCAAAGGAG
SNP9	
Posição	951.....959.....1001
Consenso	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
Bs_Res_88G03 622 0 622 ESD	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976012 cbx17d04.x1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976013 cbx13h02.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 175071043 eds05b05.x1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 175071044 eds14h06.x1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976011 cbx20d05.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTC
gnl ti 175071045 eds09e06.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 175071047 eds14b01.x1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976014 cbx14e03.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976015 cbx16f05.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976017 cbx04f09.x1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
gnl ti 126976016 cbx10h10.y1	TAAGCTAACTTTTTTCAGAGAGGTAGTGGGGGACAGCCCCCGTAAAGTCAGAG
SNP10	
Posição	1034.....1057.....1079
Consenso	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTACATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 175071045 eds09e06.y1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTAGATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 175071047 eds14b01.x1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTAGATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 126976014 cbx14e03.y1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTACATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 126976015 cbx16f05.y1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTACATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 126976017 cbx04f09.x1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTACATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC
gnl ti 126976016 cbx10h10.y1	GCAGACTCTGGTTTTGGGGGTACATTGCTCGAGAATTTCCAGGGAGAC

Figura 2: Alinhamento entre as seqüências contidas nas regiões de detecção de SNP.

Os polimorfismos estão indicados pelas seguintes cores: vermelho, verde, amarelo e azul. Os traços indicam *gaps* e os números, a posição dos nucleotídeos. A = adenina, G = guanina, T = Timina, C = citosina.

Informações acerca das raças dos animais utilizados para a geração das 26 sequências extraídas do banco de dados, assim como o tecido utilizado nas análises não estão disponíveis. Sabe-se apenas que tais sequências são derivadas de uma biblioteca genômica, cujos dados não foram publicados.

Recomenda-se que apenas *reads* de alta qualidade sejam utilizadas para a detecção de SNP (Wang et al., 2011). Assim, realizou-se uma inspeção visual dos arquivos de qualidade das sequências, garantindo-se um PHRED *score* mínimo de 20. Como resultado, foram confirmados 10 SNP (Tabela 4).

Tabela 4: SNP identificados a partir de duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos Holandês x Gir.

SNP	Alelo 1	Alelo 2	Distribuição Alélica		Número de Sequências	Classificação
			Alelo 1	Alelo 2		
SNP1	T	G	3	4	7	Transversão
SNP2	A	G	5	4	9	Transversão
SNP3	C	T	6	4	10	Transição
SNP4	T	C	4	9	13	Transição
SNP5	T	G	5	9	14	Transversão
SNP6	T	C	5	9	14	Transição
SNP7	T	C	11	14	25	Transição
SNP8	C	G	10	7	17	Transversão
SNP9	C	G	8	4	12	Transversão
SNP10	C	G	4	2	6	Transversão

Investigando-se a distribuição de *reads* nas diferentes regiões do *contig 5* onde foram detectados SNP, pode-se perceber uma variação de seis a 26 *reads*, sendo que apenas SNP7, SNP8 e SNP9 estão localizados em regiões que contêm a sequência derivada do conjunto de dados original. A menor frequência alélica variou de dois, no SNP10, cujo loco contém cinco EST; a 15 no SNP7, cuja região de detecção foi formada a partir de 25 EST.

Apesar do número de sequências que formam os *contigs* ser um importante parâmetro, a distribuição alélica é o principal indicador da qualidade do SNP detectado, sendo que quanto maior for a frequência alélica mínima, maior será a probabilidade de um SNP representar um polimorfismo real. Assim, SNP detectados

a partir de um *contig* formado por pelo menos quatro sequências, possuindo menor frequência alélica de no mínimo dois, apresentam relativamente uma alta taxa de validação (Wang et al., 2011).

Com base nas substituições nucleotídicas, os SNP foram classificados em transversões (purina ↔ pirimidina) ou transições (purina ↔ purina ou pirimidina ↔ pirimidina). Puderam-se observar seis transversões e quatro transições. Considerando-se o genoma completo, apesar de haver maior possibilidade de ocorrência de transversões, dados gerados a partir de EST de mamíferos indicam um enorme viés de transições. Uma das razões biológicas para esse viés é a alta taxa de desaminação da 5-metil citosina a timina em dinucleotídeos CpG (Vignal et al., 2002). Consequentemente, altas frequências de SNP como TC e AG são geradas. Foram observados, na literatura consultada, valores de 1,4; 2,36 e 2,44 para a razão transição/transversão no genoma de humanos (Vignal et al., 2002), galinhas (Vignal et al., 2002) e suínos (Nie et al., 2011), respectivamente.

Apesar de a maioria dos SNP serem detectados em espaços intergênicos, sem função determinada, também podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória. O *contig* 5 refere-se à proteína dermoquina (DMKN), cuja função relaciona-se à diferenciação de queratinócitos (Matsui, 2004). O gene DMKN está localizado no BTA18, sendo que nenhum QTL para resistência a carrapatos foi mapeado no referido cromossomo por Machado et al. (2010).

Foram encontrados, na literatura consultada, relatos sobre o aumento da expressão de DMKN em doenças inflamatórias (Naso et al., 2007), no entanto, no capítulo dois do presente trabalho, a expressão do referido gene manteve-se constante entre amostras de pele de bovinos coletadas antes da infestação por carrapatos e também às 24 e 48 horas após a infestação. Os contrastes foram formados entre animais resistentes e susceptíveis ao carrapato e dentro de um mesmo grupo fenotípico, de acordo com os tempos de coleta do tecido.

## CONCLUSÕES

As EST derivadas de duas bibliotecas de pele de bovinos Holandês x Gir foram sistematicamente mineradas para a detecção de SSR e SNP. Apesar das bibliotecas não terem sido desenvolvidas para tal propósito, não sendo enriquecidas

por meio de métodos que promovam a clonagem preferencial de fragmentos, foi possível a detecção das referidas estruturas. Será necessária a validação experimental dos resultados obtidos *in silico*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403–410, 1990.
- BARKER G, BATLEY J, H OS, EDWARDS KJ, EDWARDS D: Redundancy based detection of sequence polymorphisms in expressed sequence tag data using autoSNP. **Bioinformatics**, v. 19, n.3, p. 421-422, 2003.
- BURKE,J.; DAVISON,D.; HIDE,W. d2 cluster: a validated method for clustering EST and full-length cDNA sequences. **Genome Research**.,v. 9, p. 1135–1142, 1999.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p.175-185, 1998.
- COLLINS, A.; LONJOU, C.; MORTON, N.E. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 15173-15177, 1999.
- FAZEKAS, A.J.; STEEVES, R.; NEWMASER, S.G. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. **CanadaBioTechniques**, V. 48, P.277-285, 2010.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, I.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, v.21, n.125, p.8-10, 2002.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2ed. Porto Alegre, 1995.
- GUIMARÃES S.E.F., Análises de marcadores genômicos e detecção de qtls e genes candidatos em melhoramento animal In: Pereira,J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**.3. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2001. p. 383 – 419.
- HUANG, X. AND MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p.868-877, 1999.

- JU, Z.; WELLS, M.C.; MARTINEZ, A.; HAZLEWOOD, L.; WALTER, R.B. An in silico mining for simple sequence repeats from expressed sequence tags of zebrafish, medaka, *Fundulus* and *Xiphophorus*. **In Silico Biology**, v. 5, p. 439-463, 2005.
- KIM, H.; SCHMIDT, C.J.; DECKER, K.S.; EMARA, M.G. A double-screening method to identify reliable candidate non-synonymous SNP from chicken EST data. **Animal Genetics**, v. 34, p. 249-254, 2003.
- LAI, E. Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. **Genome Research**, Vol. 11, p. 927-929, 2001.
- LEE, S.H.; PARK, E.W.; CHO, Y.M.; LEE, J.W.; KIM, H.Y.; LEE, J.H.; OH, S.J.; CHEONG, I.C.; YOON, D.H. Confirming single nucleotide polymorphisms from expressed sequence tag datasets derived from three cattle cDNA libraries. **Korea Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, V. 39, N. 2, p. 183-188, 2006.
- NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; MARTINS, M.F.; PEIXOTO, J.O.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; LOPES, P.S. Expressed sequenced tags profiling of resistant and susceptible Gyr x Holstein cattle infested with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**. Ahead of Print, 2011.
- NIE, Q.; FANG, M.; JIA, X.; ZHANG, W.; ZHOU, X.; HE, X.; ZHANG, X. Analysis of muscle and ovary transcriptome of *Sus scrofa*: assembly, annotation and marker discovery. **DNA Research**, V. 18, P. 343-351, 2011.
- PEREZ, F.; ORTIZ, J.; ZHINAULA, M.; GONZABAY, C.; CALDERON, J.; VOLCKAERT, F.A. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* and *Trachypenaeus biridy*. **Mar. Biotechnol.**, v. 7, p. 554-569, 2005.
- REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO ANIMAL. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009 Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil
- ROHRER, G.A.; FAHRENKRUG, S.C.; NONNEMAN, D.; TAO, N.; WARREN, W.C. Mapping microsatellite markers Identified in porcine EST sequences. **Animal Genetics**, v.33, p. 372-376, 2002.

- ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**, p 365-386, 2000.
- SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S.C.; KAKOL, J.M.; STEIN, L.D.; MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J.C.; MORTIMORE, B.J.; WILLEY, D.L.; HUNT, S.E.; COLE, C.G.; COGGILL, P.C.; RICE, C.M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D.R.; KWOK, P.Y.; MARDIS, E.R.; YEH, R.T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R.H.; MCPHERSON, J.D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; VAN ETTEN, W.J.; REICH, D.; HIGGINNS, J.; DALY, M.J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGE-THOMANN, N.; ZODY, M.C.; LINTON, L.; LANDER, E.S.; ATSHULER, D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, v.409, p.928-933.2001.
- SERAPION, J.; KUCUKTAS, H.; FENG, J.; LIU, Z. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal Mar. Biotechnology**, v.6, p. 364-377; 2004.
- SHINDE, D.; Y. LAI; SUN, F; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. **Nucleic Acids Research**, V. 31, P.974-980, 2003.
- THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare L.*). **TheorAppl Genet.** v.106, p.411–22, 2003.
- VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP another typer of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.
- WANG, S.; LIU, H.; LIU, Z.J. SNP quality assessment. In: LIU, Z.J. **Next generation sequencing and whole genome selection in aquaculture**, 2011. p. 109 - 121.
- YAN, Q.; ZHANG, Y.; LI, H.; WEI, C.; NIU, L.; GUAN, S.; LI, S.; DU, L. Identification of microsatellites in cattle unigenes. **J. Genet. Genomics**, V. 35, P. 261-266, 2008.

ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L. & MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J Comput Biol** 7, 203-214,2000.

## CONCLUSÕES GERAIS

A análise de EST a partir de ferramentas de bioinformática permite a obtenção de valiosas informações acerca da influência gênica sobre fenótipos que estão sob determinada condição ambiental, no momento da extração do mRNA. No entanto, apesar da indiscutível contribuição da bioinformática na identificação de diferenças de expressão gênica e de marcadores moleculares, a necessidade de validação experimental dos dados é indispensável.

No Capítulo I, foi possível a detecção de diferenças de expressão dos genes PCOLCE, MGST3, SOD1, CYB5R1 e CFH, entre amostras de pele de animais resistentes e susceptíveis ao carrapato, no decorrer do tempo. Observou-se uma maior expressão de MGST3, SOD1 e CYB5R1 nos animais susceptíveis nas primeiras 24 horas após a infestação e de CYB5R1, nas primeiras 48 horas. Nos animais resistentes, observou-se maior expressão de PCOLCE e CFH nas primeiras 24 horas após a infestação. Tal regulação gênica indica que a infestação por carrapatos induz um complexo conjunto de respostas imunológicas no hospedeiro.

No Capítulo II, o mapeamento físico de transcritos dentro do intervalo de confiança de QTL para resistência ao carrapato bovino, permitiu a identificação de nove genes com potencial influência sobre a variação fenotípica da resistência ao referido parasita: IL1A, BLA-DQB, DEFB, DEFB1, DEFB4A, DEFB5, DEFB7, C2C4A e CD63. Serão necessários estudos acerca da expressão gênica diferencial entre animais susceptíveis e resistentes ao carrapato para validá-los como candidatos.

No Capítulo III, o conjunto de EST foi sistematicamente minerado para a detecção de SSR e SNP. Apesar das bibliotecas não terem sido desenvolvidas para tal propósito, não sendo enriquecidas por meio de métodos que promovam a clonagem preferencial de fragmentos, foi possível a detecção das referidas estruturas. Será necessária a validação experimental dos resultados obtidos *in silico*. A identificação de EST-SSR e EST-SNP é bastante útil para o desenvolvimento de marcadores moleculares, os quais podem ser utilizados em estudos de mapeamento genômico, genética de populações, testes de paternidade e para a seleção de indivíduos geneticamente superiores (seleção assistida por marcadores - *marked assisted selection* - MAS).

Os resultados obtidos no presente trabalho e apresentados nos diferentes capítulos são relevantes e contribuem para um maior entendimento acerca da genômica envolvida na resistência ao carrapato bovino.