

ROBERT DOMINGUES

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ANIMAIS  
CRUZADOS GIR X HOLANDÊS INFESTADOS COM O  
CARRAPATO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título *Magister  
Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

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

T

D671e  
2011

Domingues, Robert, 1985-

Expressão gênica diferencial em animais cruzados Gir X  
Holandês infestados com carrapato *Rhipicephalus microplus* /  
Robert Domingues. – Viçosa, MG, 2011.  
xii, 103f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 76-96

1. Bovino - Melhoramento genético. 2. Genética molecular.  
3. Bovino - Parasito. 4. *Rhipicephalus microplus*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20821

**ROBERT DOMINGUES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM ANIMAIS CRUZADOS GIR X  
HOLANDÊS INFESTADOS COM O CARRAPATO *RHIPICEPHALUS*  
*MICROPLUS***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
*Magister Scientiae*

APROVADA: 02 de Dezembro de 2011

---

Marco Antônio Machado  
(Co-orientador)

---

Leandro Licursi de Oliveira

---

Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Orientadora)

*“Escolhe um trabalho de que gostes,  
e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”*

Confúcio

À minha gigante-guerreira mãe, Dalva

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma estiveram presentes e foram importantes no desenvolvimento deste trabalho:

À minha orientadora Dr. Simone Eliza Facioni Guimarães, por seus ensinamentos, apoio, confiança e pela oportunidade da realização deste mestrado.

Ao meu co-orientador Dr. Marco Antonio Machado, pelo apoio, amizade, confiança e por seus ensinamentos (científicos e não científicos), exemplo, e pelas injeções de ânimo toda vez que este me faltou.

Ao meu co-orientador Dr. Fabyano Fonseca e Silva, ao Dr. Leandro Licursi de Oliveira e ao Dr. Fernando Flores Cardoso, pelos grandes auxílios nas análises estatísticas e discussões imunológicas e por se mostrarem sempre disponíveis.

Aos funcionários da Embrapa Gado de Leite, especialmente Daniele Reis, Dra. Ana Luisa Azevedo, Dra. Marta Martins, Dra. Márcia Prata, Dra. Carla Lange e Ana Lúcia Campos, pelo convívio e ensinamentos durante todo esse tempo de estágio.

Aos amigos de laboratório: Karluchinha, Isabela Fonseca, Pricilinha, Sabine, Karinuds, Livia, Caroleessa, Philipe, Tamis, Karla, Brenda, Gustavo, Bell, Daisy, Fers, Priciane.... por fazerem das manhãs de segunda-feira às tarde das sextas, dias animadores e empolgantes!

Aos amigos de Viciosa: Marcos, Pippu, Gui, Dudu, Dani, Samuka, Janini, Deisy, Roque, Camila.... E aos amigos do LabTec: Mayara, Carlos, Débora, André, Erika, Lucas, Ana Paula, André Mauric, Marcola, Renata, Bruna, Carolina... pela companhia e amizade.

Aos meus novos amigos e colegas de trabalho da Embrapa Pecuária Sul, especialmente: Alessandro, Amaury, Bernardo, Cláudia, Emanuelle, Lisiane, Manuela, Márcia, Marcos, Rossana e Tânia pela ajuda e por me aturarem na fase final de escrita da dissertação.

À minha família, meu alicerce. Agradeço a minha mãe Dalva, ao meu irmão Ronald e a minha sobrinha Júlia por serem minhas inspirações. Agradeço a minha tia Marlene, e a Riselle, pelo apoio e por acreditarem no meu potencial. Ao meu pai Célio, a minha avó Carmita, por entenderem minha distância e por acreditarem e torcerem por mim.

## **BIOGRAFIA**

ROBERT DOMINGUES, filho de Célio Domingues e Dalva Luzia de Almeida Domingues, nasceu em 30 de maio de 1985 em Cataguases, Minas Gerais, Brasil.

Concluiu o primeiro grau na Escola Estadual Clorindo Burnier e cursou o segundo grau no Colégio Técnico Universitário – CTU/UFJF em Juiz de Fora, MG.

Em março de 2003 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, diplomando-se em dezembro de 2007.

Em março de 2010 iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 02 de dezembro de 2011.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                          |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                                                    | viii |
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                                                                    | x    |
| RESUMO.....                                                                                                                                              | Xi   |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                            | Xii  |
| 1. Introdução Geral.....                                                                                                                                 | 1    |
| 2. Revisão de literatura.....                                                                                                                            | 3    |
| 2.1. O Carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i> .....                                                                                          | 3    |
| 2.2. Controle do carrapato.....                                                                                                                          | 6    |
| 2.3. Mecanismos de alimentação do carrapato.....                                                                                                         | 7    |
| 2.4. Variabilidade genética de resistência ao carrapato.....                                                                                             | 9    |
| 2.5. Resposta imune do hospedeiro.....                                                                                                                   | 10   |
| 2.6. Estudos de expressão gênica.....                                                                                                                    | 12   |
| 2.7. A tecnologia de microarranjos de DNA.....                                                                                                           | 14   |
| 2.7.1. GeneChips.....                                                                                                                                    | 14   |
| 2.7.2. Análise de pré-processamento.....                                                                                                                 | 16   |
| 3. Objetivos.....                                                                                                                                        | 18   |
| 3.1. Objetivo geral.....                                                                                                                                 | 18   |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                          | 18   |
| 4. Experimento 1: Expressão de genes relacionados com resposta imune no sangue periférico de bovinos infestados com <i>Rhipicephalus microplus</i> ..... | 19   |
| 4.1. Introdução.....                                                                                                                                     | 20   |
| 4.2. Objetivos.....                                                                                                                                      | 21   |
| 4.3. Metodologia.....                                                                                                                                    | 21   |
| 4.3.1. Animais experimentais.....                                                                                                                        | 22   |
| 4.3.2. Infestação e coleta das amostras.....                                                                                                             | 25   |
| 4.3.3. Extração de RNA das amostras de sangue.....                                                                                                       | 25   |
| 4.3.4. Transcrição reversa.....                                                                                                                          | 26   |
| 4.3.5. Teste de amplificação dos primers.....                                                                                                            | 26   |
| 4.3.6. Padronização das reações de qRT-PCR.....                                                                                                          | 28   |
| 4.3.7. Amplificação das amostras.....                                                                                                                    | 29   |
| 4.3.8. Agrupamento das amostras e contrastes analisados.....                                                                                             | 30   |



|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.9. Análises estatísticas.....                                                                                                        | 30 |
| 4.4. Resultados.....                                                                                                                     | 31 |
| 4.5. Discussão.....                                                                                                                      | 37 |
| 5. Experimento 2: Genômica funcional na pele de bovinos cruzados (Gir x<br>Holandes) infestados com <i>Rhipicephalus microplus</i> ..... | 40 |
| 5.1. Introdução.....                                                                                                                     | 41 |
| 5.2. Objetivos.....                                                                                                                      | 42 |
| 5.3. Metodologia.....                                                                                                                    | 43 |
| 5.3.1. Animais experimentais, infestação e coleta das amostras.....                                                                      | 43 |
| 5.3.2. Extração de RNA das amostras de pele.....                                                                                         | 43 |
| 5.3.3. Preparo, hibridização e leitura dos chips de microarranjo.....                                                                    | 44 |
| 5.3.4. Análise de qualidade dos chips de microarranjo.....                                                                               | 47 |
| 5.3.5. Análises estatísticas dos dados.....                                                                                              | 53 |
| 5.3.6. Validação do microarranjo por qRT-PCR.....                                                                                        | 53 |
| 5.4. Resultados.....                                                                                                                     | 55 |
| 5.5. Discussão.....                                                                                                                      | 65 |
| 6. Discussão Geral.....                                                                                                                  | 74 |
| 7. Conclusões.....                                                                                                                       | 75 |
| 8. Referências Bibliográficas.....                                                                                                       | 76 |
| Anexo 1.....                                                                                                                             | 97 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....                                                                                                                                                                                                               | 5  |
| Figura 2. Esquema de um probe set, indicando a disposição das sondas PM e MM.....                                                                                                                                                                                                       | 15 |
| Figura 3. Demonstração da disposição das células (cells) nos chips de microarranjo da Affymetrix (GeneChips).....                                                                                                                                                                       | 16 |
| Figura 4. Alguns dos animais experimentais, com destaque para a variação fenotípica.....                                                                                                                                                                                                | 24 |
| Figura 5. Alguns dos animais experimentais momentos antes da infestação artificial.....                                                                                                                                                                                                 | 24 |
| Figura 6. Gráfico da razão de expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                                                                          | 34 |
| Figura 7. Gráfico da razão de expressão gênica nos animais susceptíveis após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                                                                         | 35 |
| Figura 8. Gráfico da razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados.....                                                                                                                                        | 36 |
| Figura 9. Esquema dos passos realizados do preparo da amostra de RNA até a hibridização no chip, utilizando o kit 3' IVT Express.....                                                                                                                                                   | 45 |
| Figura 10. Gráfico demonstrando a intensidade de fluorescência das sondas PM de todos os chips hibridizados. As setas azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.....                                                                                 | 48 |
| Figura 11. Gráfico da estimativa central da densidade de fluorescência das sondas PM de todos os chips hibridizados.....                                                                                                                                                                | 48 |
| Figura 12. Gráfico demonstrando integridade dos genes GAPDH e $\beta$ -actina, fatores de escala, porcentagem de presentes, e valor médio de background para todos os chips hibridizados. As setas em azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade..... | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 13. Box plots da intensidade de fluorescência dos elementos positivos (esquerda) e negativos (direita), de todos os chips hibridizados. As setas em azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade..... | 51 |
| Figura 14. Gráfico heat map dos coeficientes de correlação do ranking de Spearman array-array, de todos os chips hibridizados. As setas em azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.....                 | 52 |
| Figura 15. Gráfico gerado pelo equipamento 2100 Bioanalyzer para a avaliação da integridade do RNA de algumas das amostras de RNA total extraídas.....                                                                                       | 56 |
| Figura 16. Transcritos diferencialmente expressos em cada um dos métodos de pré-processamento, denotando a interseção entre os mesmos.....                                                                                                   | 60 |
| Figura 17. Gráfico da estimação da estabilidade M dos cinco genes testados para melhores controles endógeno, onde, os genes de menores valores de M são os mais indicados.....                                                               | 61 |
| Figura 18. Gráfico da razão de expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                              | 62 |
| Figura 19. Gráfico da razão de expressão gênica nos animais susceptíveis após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                             | 63 |
| Figura 20. Gráfico da razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados.....                                                                                            | 63 |
| Figura 21. Representação dos principais fatores componentes das cascatas do complemento e coagulação sanguínea.....                                                                                                                          | 73 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Genes estudados no sangue periférico via qRT-PCR.....                                                                                                                                                                             | 27 |
| Tabela 2. Condições escolhidas para cada primer, com quantidade de cDNA e concentração de primers.....                                                                                                                                      | 29 |
| Tabela 3. Ct médio e coeficiente de correlação encontrados para cada gene em cada um dos grupos avaliados.....                                                                                                                              | 33 |
| Tabela 4. Valores de razão da expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                              | 34 |
| Tabela 5. Valores de razão da expressão gênica nos animais susceptíveis após a infestação em relação a antes da infestação.....                                                                                                             | 35 |
| Tabela 6. Valores de razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados.....                                                                                            | 36 |
| Tabela 7. Lista dos genes analisados por qRT-PCR, com a sequência dos primers, o artigo de referência ou o número de acesso a sequência no NCBI, as condições de amplificação utilizadas e as eficiências de amplificação apresentadas..... | 57 |
| Tabela 8. Transcritos diferencialmente expressos por método de pré-processamento em cada um dos contrastes analisados.....                                                                                                                  | 59 |
| Tabela 9. Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de diferença de expressão encontrados nos métodos de pré-processamento e os encontrados por qRT-PCR.....                                                                    | 64 |
| Tabela 10. Ct médio e coeficiente de variação (em porcentagem) de todos os genes estudados por qRT-PCR para todos os grupos analisados.....                                                                                                 | 67 |

## RESUMO

DOMINGUES, Robert, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2011. **Expressão gênica diferencial em animais cruzados Gir x Holandês infestados com o carrapato *Rhipicephalus microplus***. Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Orientadores: Fabyano Fonseca e Silva e Marco Antonio Machado.

Infestações pelo carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* podem levar a consideráveis perdas de produção na bovinocultura. Os métodos atualmente utilizados para o controle do ectoparasitismo não são os ideais, seja por baixa efetividade ou por causarem risco ao ambiente e à saúde humana. Em geral, animais de raças zebuínas são mais resistentes ao carrapato do que os de raças taurinas, porém maiores entendimentos dessas diferenças tornam-se necessários tanto para a elaboração de métodos antiparasitários mais eficientes quanto para auxiliar no melhoramento genético bovino. O objetivo deste estudo foi enumerar diferenças de expressão gênica na pele e no sangue periférico de animais resistentes e susceptíveis frente a infestação com carrapatos. Foram utilizados para este trabalho bovinos extremos em resistência e susceptibilidade ao carrapato provenientes de uma população de animais F2 cruzados (Gir x Holandês) que apresentaram ampla variação fenotípica. As amostras foram coletadas antes da infestação, 24 e 48 horas após a infestação. No sangue periférico foi avaliada a expressão de genes CD25, CXCL8, CXCL10, FOXP3, IL10 e TNF $\alpha$  por qRT-PCR e, na pele foi estudada a expressão gênica global pela utilização da técnica de microarranjos de DNA. Foi observada no sangue maior expressão de genes que indicam maior atividade de linfócitos  $\gamma\delta$  nos animais resistentes e, na pele foi observada maior expressão de genes relacionados com a resposta imune, cascatas de coagulação e do complemento, resposta imune adaptativa e componente das zônulas de oclusão, também nos animais resistentes. Assim, pôde-se supor que parte da resistência ao carrapato está relacionada com o impedimento, por parte do hospedeiro, do fluxo de alimento para o ectoparasita hematófago. Por fim, alguns genes como os codificantes da proteína claudina-1, do fator de coagulação FXIII, da enzima fosfolipase I, dos fatores B, P e de C4BP do sistema complemento, puderam ser considerados genes candidatos a resistência ao carrapato bovino.

## ABSTRACT

DOMINGUES, Robert, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2011. **Differential gene expression in crossbreed Gir x Holstein infected with the tick *Rhipicephalus microplus***. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-Advisers: Fabyano Fonseca e Silva and Marco Antonio Machado.

Infestations by cattle tick *Rhipicephalus microplus* can lead to considerable production losses in cattle. The methods currently used to control these ectoparasites are not the ideal, whether because of low effectiveness or cause risk to the environment and human health. In general, animals of Zebu breeds are more resistant to ticks than taurine breeds, but greater understanding of these differences are necessary both for the development of more efficient methods and to assist in cattle breeding. The objective of this study was to enumerate differences of gene expression in peripheral blood and skin of resistant and susceptible animals infested with ticks. It was used, for this work, bovine extremes in resistance and susceptibility to tick from a population of F2 animals crossbred (Gir x Holstein) that showed a wide phenotypic variation. The samples of blood and skin were collected prior to infestation, 24 and 48 hours after infestation. In peripheral blood it was studied the genes CD25, CXCL8, CXCL10, FOXP3, IL10 e TNF $\alpha$  by qRT-PCR and at skin it was studied the global gene expression by using the technique of DNA microarrays. It was observed in the blood increased expression of genes that indicate an increased activity of  $\gamma\delta$  lymphocytes as regulatory cells in resistant animals, and in the skin it was observed greater expression of genes related to immune response, coagulation and complement cascades, adaptive immune response and component of tight junctions also in resistant animals. Thus, one could assume that part of the resistance to the tick is related to the prevention, by the host, of the flow of food to the hematophagous ectoparasites. Finally, some genes such as those encoding the protein claudin-1, coagulation factor FXIII, phospholipase I enzyme, and factors B, P and C4BP of complement system could be considered candidate genes related to tick resistance.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

De forma geral, os países em desenvolvimento, majoritariamente localizados em regiões tropicais, apresentam desempenhos agropecuários menores que os desempenhos dos países localizados em regiões temperadas (HAMMOND, 1994). A bovinocultura é uma atividade de grande importância no agronegócio brasileiro onde, a produção de leite, por exemplo, atingiu um valor bruto na produção de mais de 19 bilhões de reais em 2008. Neste ano, mesmo possuindo o segundo maior rebanho leiteiro do mundo, o Brasil foi apenas o sexto maior produtor de leite, apresentando produtividade abaixo da média mundial (Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>>. Acesso em 04 nov 2011).

Além de questões econômicas, sociais e culturais, alguns dos entraves a uma maior produção de leite no país têm sido as condições adversas do ambiente a que estão submetidos, que não permitem um desempenho produtivo satisfatório dos animais mais produtivos, principalmente os de origem européia. Dentre estas condições destacam-se a alta temperatura e as infestações por endo e ectoparasitas que têm provocado, além da redução na produtividade, até mesmo a morte dos animais mais susceptíveis (MADER e DAVIS, 2004; O'NEILL *et al.*, 2010).

Os bovinos estão constantemente ameaçados por lesões e enfermidades causadas pelo carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, uma vez que são os hospedeiros preferenciais da fase parasitária do ciclo de vida deste ectoparasita (SOARES *et al.*, 2007). Estudando a produtividade leiteira em animais da raça Holandesa, principal raça utilizada para produção de leite em países de clima temperado, Teodoro *et al.* (1998) estimaram uma perda de 26% (529 kg) na produção de leite por lactação quando compararam vacas Holandesas puras por cruzamento, banhadas e não banhadas com carrapaticida.

O parasitismo, além de gerar perdas em produtividade de leite, atinge também o desenvolvimento do animal, o rendimento de carcaça e a qualidade do couro. Segundo Honer e Gomes (1990), um bovino infestado com carrapatos e parasitado por vermes, se não for tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano, sem considerar as possíveis perdas relacionadas às doenças transmitidas

pelos carrapatos. O couro dos animais altamente infestados não pode ser comercializado como de primeira qualidade uma vez que as reações inflamatórias provocadas no local de fixação do carrapato causam danos consideráveis (SEIFERT *et al.*, 1968; HORN e ARTECHE, 1985).

Além das perdas com carne, leite e couro, as infestações por carrapatos aumentam os gastos dos produtores com os produtos químicos para combater o parasita. O combate a esses parasitas, normalmente é feito com produtos químicos que, na grande maioria, deixam resíduos na carne, no leite e nas fezes, trazendo vários riscos para a saúde humana e contaminando o meio-ambiente, causando vários prejuízos para este (FLOAT *et al.*, 1997). O uso de carrapaticidas não conseguiu, efetivamente, modificar a realidade dessa parasitose que permanece com alta prevalência e incidência (ROCHA, 1996).

Há algum tempo, a existência de variação genética para características como a resistência ao carrapato em bovinos foi amplamente relatada (VILLARES, 1941; UTECH *et al.*, 1978; TEODORO *et al.*, 1984 e LEMOS, 1986). Em geral, as raças zebuínas são mais resistentes ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que as raças taurinas, embora existam consideráveis variações em resistência entre e dentro de raças (WHARTON e UTECH, 1970; SEIFERT, 1971). Desta forma, para a produção de leite, têm sido indicados e utilizados em países tropicais, como Brasil e Austrália, animais produzidos por cruzamento entre raças taurinas (principalmente a raça Holandesa) e zebuínas com intuito de apresentarem maior produtividade e resistência aos fatores tropicais como os carrapatos. Mesmo assim, Furlong *et al.* (1996) verificaram em fêmeas mestiças Holandês-Zebu uma queda da produção de leite por vaca de 23%, quando estas estavam com uma média de 105 carrapatos/vaca. Assim, a utilização de outras formas que impeçam altas taxas de parasitose é necessária.

O entendimento da variação genética e dos mecanismos fisiológicos entre as raças que levam a diferenças fenotípicas associadas à resistência ao carrapato servirá de grande auxílio tanto na produção de métodos antiparasitários efetivos, como vacinas, como na elaboração de programas de melhoramento genético que visem a obtenção de animais mais resistentes ao parasita (REGITANO e PRAYAGA, 2010).



A variação genética para resistência ao carrapato resulta de diferenças em uma variedade de mecanismos que não são completamente compreendidos, mas o envolvimento de genes relacionados ao sistema imunológico em muitos desses mecanismos é inegável. Recentemente, resultados de perfis de expressão gênica obtidos após o desafio com carrapatos em animais resistentes e susceptíveis ao carrapato tem sido uma boa ferramenta na prospecção de genes candidatos à resistência ao carrapato (REGITANO e PRAYAGA, 2010).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo enumerar diferenças na expressão gênica entre animais, provenientes de uma população F2 derivada do cruzamento entre raças zebuína e taurina (Gir x Holandês), com variação em resistência ao carrapato, frente a infestação artificial controlada.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Carrapatos formam um grupo bem sucedido de artrópodes hematófagos obrigatórios, que estão amplamente distribuídos em quase todo o planeta e estão adaptados a se alimentarem do sangue de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (KEIRANS e DUREN, 2005). Esses ácaros estão classificados na ordem Ixodida que compreende aproximadamente 879 espécies divididas em três famílias (GUGLIELMONE et al., 2009). Dentre estes, a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, também conhecida como carrapato bovino, é o principal ectoparasito hematófago que acomete os bovinos, sendo também um dos mais importantes transmissores de patógenos para o gado (DE CASTRO, 1997). Esta espécie é originária provavelmente da Ásia e distribui-se geograficamente por locais de clima quente e úmido, condições que favorecem o desenvolvimento do seu ciclo de vida (HOOGSTRAAL e WASSEF, 1985). No território nacional, encontra-se amplamente distribuído, variando suas concentrações de acordo com as condições climáticas e tipos raciais de bovinos presentes em cada região (GONZÁLES, 1995).

Atualmente encontra-se classificado sistematicamente da seguinte forma:

Filo – Arthropoda, Von Siebold & Slannius, 1845;

Subfilo – Chelicerata, Heymons, 1901;

Classe – Aracnida, Lamarck, 1802;

Subclasse – Acari, Leach, 1817;

Superordem – Parasitiformes, Renter, 1909;

Ordem - Ixodida, Leach, 1815;

Família – Ixodidae, Murray, 1887;

Gênero – Rhipicephalus, Canestrini, 1888;

Subgênero – Boophilus, Canestrini, 1887;

Espécie – Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Canestrini 1888;

O carrapato *R. microplus* é um parasita monoxeno, isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida. Seu ciclo de vida (Figura 1) apresenta duas fases complementares: a de vida livre e de vida parasitária. A fase de vida livre sofre maiores interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. Por outro lado, a fase de vida parasitária sofre menos interferências climáticas e é praticamente constante em todas as regiões (GONZÁLES, 1975). O ciclo do *R. microplus* foi minuciosamente descrito por Furlong (1993), e pode ser resumido da seguinte forma:

A fase de vida livre inicia-se com a queda de fêmeas ingurgitadas (teleóginas) e culmina quando as larvas eclodidas encontram o hospedeiro. A teleóquina ao desprender-se do animal parasitado, cai no solo procurando locais abrigados de incidência direta de luz solar para sua ovoposição. Em condições ideais de temperatura (em torno de 27°C) a pré-postura leva cerca de três dias. Normalmente uma teleóquina coloca cerca de 3000 a 4000 ovos estando a ovoposição concluída após aproximadamente 12 a 14 dias. A fêmea morre logo após a postura. A eclosão das larvas dura de 22 a 30 dias e, após dois a três dias, para o fortalecimento de suas cutículas, estas se tornam larvas infestantes. O período de maior atividade das larvas na vegetação ocorre nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, quando a temperatura é mais amena.

A fase parasitária começa com a subida da larva infestante no hospedeiro. Estas procuram uma área no animal para a fixação, e permanecem no animal quando se fixam em locais abrigados das defesas mecânicas do hospedeiro, tais

como, base da cauda, barbela, peito e parte posterior das coxas. Junto ao local de fixação aparecem zonas de hiperemia e inflamação. A larva, após a troca de cutícula (metalarva), dá origem à ninfa (ATHANASSOF, 1953). Esta se alimenta de sangue, sofre uma muda (metaninfa), ao redor do 15.º dia e transforma-se em adulto imaturo, neandro (macho) e neógina (fêmea). A fêmea, após o acasalamento, começa a alimentação até o ingurgitamento total. O processo de ingurgitamento e queda da fêmea são bastante rápidos, podendo ocorrer durante a noite, o que possibilita à fêmea ingurgitada se desprender do animal nas primeiras horas do dia. A fase parasitária de uma fêmea dura em média de 18 a 26 dias (FURLONG, 1993).

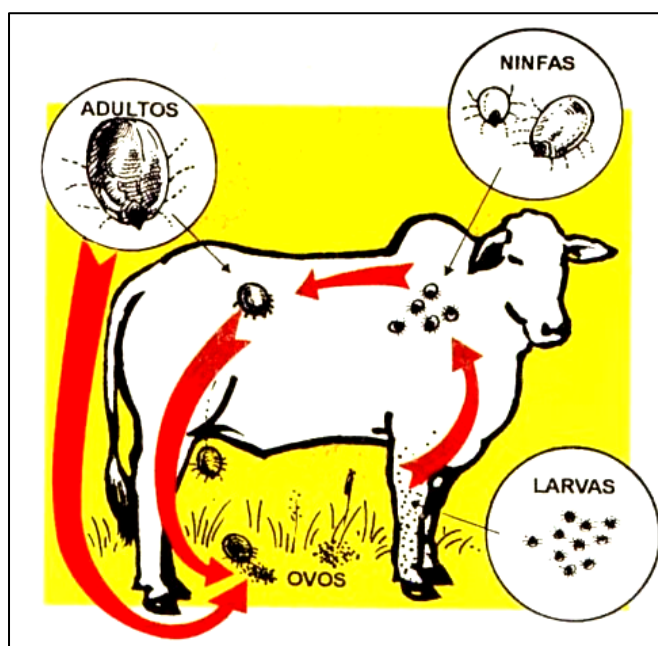


Figura 1: Ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

## 2.2. Controle do carrapato

Dentre os métodos de controle ao carrapato normalmente indicados e/ou realizados, destacam-se o controle químico, biológico, imunológico e através do melhoramento genético do hospedeiro (FRAZZON *et al.*, 2000).

O método de controle para o carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999). Ao longo destas décadas, foram utilizados, sequencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas e piretróides (HÄUJERMAN *et al.*, 1992). Apesar de atualmente ser o único método eficaz, tem sido muito questionado por ser dispendioso, por poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos, e por seus resíduos permanecerem em produtos de origem animal (KUNZ e KEMP, 1994; FLOATE *et al.*, 1997). Além disso, a troca dos princípios ativos tem sido uma necessidade devido ao surgimento de populações resistentes (CRAMPTON *et al.*, 1999), favorecido principalmente pela intensidade de uso e pela aplicação incorreta dos produtos (LEITE, 1996). A resistência para organofosforados tem sido reportada desde 1963, quando foi descrito, na Austrália, um caso de resistência para Dioxation, Carbofenothion, Diazinon e Carbamil (SEDDON, 1967).

De acordo com Gonzales (1995), fatores ambientais não favoráveis podem reduzir consideravelmente o número de larvas viáveis e, conseqüentemente, os índices de infestação dos bovinos. O tipo de vegetação utilizada é um fator capaz de influenciar no tamanho das populações de carrapato, seja por não propiciar abrigo as fêmeas em postura, por serem tóxicas e repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta. Como exemplo podem ser citadas as gramíneas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et al.*, 1982) e o capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS *et al.*, 1986). Deste modo, a rotatividade de pastagens pode ter relativo sucesso nas práticas de controle do parasita (ELDER *et al.*, 1980). Os carrapatos também são alvos de uma série de predadores e parasitas como formigas carnívoras que devoram fêmeas no solo (GONZÁLES, 1995) e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, respectivamente. Estes organismos

possuem alta eficiência no tratamento contra o carrapato (ALONSO-DÍAS *et al.*, 2007).

O controle de ectoparasitas pela vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e representa uma das alternativas mais promissoras para o controle químico. Dentre as vantagens desta forma de controle destacam-se a especificidade à espécie, segurança ambiental e para a saúde humana, fácil administração e um menor custo. Para o desenvolvimento de uma vacina eficiente, são necessários a identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora e o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal (WIKEL, 1996). Dentre as várias proteínas indicadas para este fim destacam-se uma proteína de intestino (Bm86) e a proteína Bm91, encontrada em baixa concentração nas glândulas salivares e intestino de fêmeas adultas. Contudo, as vacinas atualmente disponíveis no mercado embora ofereçam proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações pelo parasito, não asseguram o grau de proteção desejado (WILLADSEN *et al.*, 1996) e, ainda, é amplamente reconhecido que têm um impacto relativamente pequeno sobre a prática de controle de carrapatos devido a razões científicas e comerciais (WILLADSEN, 2006).

### **2.3. Mecanismos de alimentação do carrapato**

A alimentação do sangue de vertebrados terrestres é um comportamento observado em muitas ordens e famílias de artrópodes. De acordo com Ribeiro (1995), estima-se que aproximadamente 15.000 espécies distribuídas em 400 gêneros de artrópodes possuem hábito hematófago.

De modo geral, para obter sucesso na alimentação hematofágica, estes animais desenvolveram mecanismos de impedir a coagulação do sangue, as defesas imunológicas e os processos inflamatórios e de reparo tecidual da pele dos hospedeiros vertebrados, além de ultrapassar a barreira mecânica da pele e encontrar sangue. A secreção salivar dos artrópodes hematófagos facilita a ingestão e digestão do alimento e permitem que o sangue flua sem inconvenientes (RIBEIRO, 1987).

No caso dos carrapatos da família Ixodidae, a superação das barreiras não específicas da pele é inicialmente mecânica e começa pela varredura da pele em busca de um sítio propício para a fixação do carrapato. Utilizando suas quelíceras, os carrapatos cortam a epiderme do hospedeiro para introduzir o hipostômio. Este por sua vez, dilacera os tecidos adjacentes provocando lesão, onde é inoculada a saliva (ARTHUR, 1973). Tais carrapatos alimentam-se por longos períodos de tempo, permanecendo fixados ao hospedeiro por vários dias e até semanas para completar seu ingurgitamento. São extremamente vorazes e não ingerem apenas sangue, mas também linfa e detritos celulares presentes na cavidade alimentar (ARTHUR, 1973; SAUER *et al.*, 2000; MANS e NEITZ, 2004).

Por permanecerem fixados a pele dos hospedeiros por um longo período de tempo, os carrapatos Ixodidae secretam uma substância denominada cimento que, quando endurece, auxilia no ancoramento das peças bucais penetrantes. Nas espécies do gênero *Rhipicephalus*, a deposição do cimento é predominantemente superficial, uma vez que possuem peças bucais curtas (ARTHUR, 1973).

O carrapato bovino *R. microplus*, embora tenham peças bucais curtas, causam danos teciduais consideráveis no hospedeiro (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). O cimento secretado pelas glândulas salivares dessa espécie é inerte e a lesão formada na pele dos bovinos desenvolve-se como resultado das respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro elicitadas pela saliva do carrapato (TATCHELL e MOORHOUSE, 1968; ARTHUR, 1973).

Uma vez obtido acesso ao sangue, a adaptação à hematofagia exigiu soluções moleculares para conter os complexos sistemas responsáveis em manter a hemostasia do hospedeiro como o sistema de coagulação sanguínea e os mecanismos de resposta adaptativa (DOOLITTLE e FENG, 1987; COOPER e ALDER, 2006). As moléculas presentes na saliva dos ectoparasitos são as “ferramentas moleculares” usadas para transpor tais desafios. No caso dos carrapatos, a saliva possui uma ampla diversidade de moléculas com funções de inibir a coagulação sanguínea e processos inflamatórios e modular as respostas imunológicas do hospedeiro (BROSSARD e WIKEL, 2004; TITUS *et al.*, 2006; FRANCISCETTI *et al.*, 2009) atuando algumas vezes em funções redundantes (STEEEN *et al.*, 2006).

## 2.4. Variabilidade genética da resistência ao carrapato

O mecanismo da resistência aos carrapatos é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido. Riek (1962) descreveu dois tipos de mecanismo: a) resistência inata, já presente no animal quando da primeira infestação e b) resistência adquirida, que começa a ser evidenciado após a exposição do animal a algumas infestações por carrapatos. Vários estudos, entre eles os trabalhos de Roberts (1968) e Wagland (1978), têm relatado que o nível de resistência dos animais foi maior depois de repetidas infestações quando comparados com o nível após a primeira infestação, sugerindo a importância da resposta adaptativa na resistência ao carrapato.

Em bovinos, o nível de infestação pode variar, também, de acordo com a raça, sendo que os hospedeiros considerados susceptíveis apresentam uma maior quantidade de parasitas do que hospedeiros considerados resistentes (MATTEOLI *et al.*, 2000). Em geral, raças da subespécie *Bos taurus indicus* (zebuínas) são mais resistentes às doenças parasitárias do que as da subespécie *Bos taurus taurus* (taurinas) (WHARTON e UTECH, 1970). De acordo com Thiesen (1979) e Lemos (1986), o gado zebuino tem convivido há milhares de anos com o carrapato *Rhipicephalus microplus*, ocorrendo provavelmente uma eliminação natural dos animais mais sensíveis, devido à permanência de maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes.

Ao comparar o número de carrapatos encontrados em raças zebuínas com diversas outras raças, Villares (1941) verificou maior resistência dos zebuínos. Apenas 5% do total de carrapatos eram originários de animais Zebus, 7% de raças nacionais ou crioulas e 88% de raças européias. Adicionalmente, Utech, Seifert e Wharton (1978) também observaram, em rebanhos Zebus, grande proporção de animais com alta resistência ao aracnídeo.

Na Austrália, os animais zebuínos vêm sendo utilizados intensamente em cruzamentos com raças européias, devido a sua maior resistência aos carrapatos. As diferenças de resistência entre gados de raças taurinas e os animais provenientes dos cruzamentos *B. taurus taurus* x *B. taurus indicus* foram demonstrados por Byford *et al.* (1976), com os animais oriundos do cruzamento apresentando, em geral, uma resistência de moderada a alta. Resultados

semelhantes foram observados por Utech e Wharton (1982), no Australian Milking Zebu (AMZ).

No Brasil, Teodoro *et al.* (1984) estudaram a resistência de touros mestiços (5/8, 3/4 e 7/8 europeu x zebu) sob infestação artificial com carrapatos, e observaram maior proporção de animais 5/8 resistentes ao carrapato, com os 7/8 apresentando menor resistência. Lemos (1986) estudando a resistência ao carrapato em novilhas de grupos genéticos variando de 1/4 Holandês x Zebu a Holandês PC, também observou maior carga parasitária e, conseqüentemente, menor resistência associada ao aumento do grau de sangue europeu.

A resistência e a susceptibilidade ao carrapato são características de herdabilidade moderadamente elevadas, no entanto, os genes do hospedeiro envolvidos ainda não estão identificados (KASHINO *et al.*, 2005). As estimativas de herdabilidade obtidas por vários autores, variando de 20 a 49% (HEWETSON, 1968; WHARTON e UTECH, 1970; UTECH, 1979; TEODORO *et al.*, 1984 e MADALENA *et al.*, 1985), sugerem que a seleção para resistência a carrapatos pode ser promissora. Utech e Wharton (1982), em um experimento de seleção na raça Australian Illawarra Shorthorn (AIS), obtiveram ganhos genéticos consideráveis para resistência a carrapatos, demonstrando que a seleção pode ser altamente efetiva.

Rendel (1971) sugeriu a combinação, por meio de cruzamentos, das características de resistência ao carrapato do gado zebuino com a alta produtividade de leite e fertilidade do gado taurino. Isto tem ocorrido intensamente nos países tropicais, ficando a Austrália com a maior concentração de trabalhos de seleção nestas populações mestiças.

## **2.5. Resposta imune do hospedeiro**

A alimentação do carrapato induz a resposta do hospedeiro envolvendo células apresentadoras de antígenos (APC), células T, células B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilos e moléculas biorreativas (WIKEL, 1997), demonstrando uma ampla variedade de mecanismos de resposta imune.



Tais respostas imunes, ativadas durante o processo de alimentação dos carrapatos, variam de acordo com a espécie do carrapato e do hospedeiro, e podem ser de três tipos: a) reação de hipersensibilidade tardia: imunidade celular estimulada por alguns antígenos salivares com baixo peso molecular (haptens) que associam às proteínas da pele do hospedeiro e que, durante exposição subsequente, estimulam uma resposta celular; b) hipersensibilidade cutânea: caracterizada por infiltração de basófilos, mediada por células de *Langerhans*, com estimulação de linfócitos B e produção de imunoglobulina da classe G (IgG); c) hipersensibilidade do tipo I: ativação de produção de IgE induzindo uma severa inflamação na pele com prurido e dor (SOARES, 2001). Tais mecanismos imunológicos podem modificar a pele do hospedeiro e, desta forma, o repasto do artrópode é prejudicado.

Algumas relações carrapato-hospedeiro são caracterizadas pela aquisição de resistência depois de repetidas infestações. Essa resistência é caracterizada pela redução na quantidade e no tempo da alimentação, diminuição do número e viabilidade de ovos, além da morte das fêmeas ingurgitadas (WIKEL, 1997). A comparação de hospedeiros susceptíveis e resistentes mostrou que reações cutâneas diferem significativamente no local de injúria. A resposta imune freqüentemente desenvolve com influxo de basófilos, neutrófilos e eosinófilos para a derme e a epiderme, que cercam o local da picada. Tal fato promove hipersensibilidade basófila cutânea caracterizada pela degranulação destas células com a liberação de histamina (ALLEN *et al.*, 1979), possivelmente inibindo a salivação e alimentação do carrapato (PAINE *et al.*, 1983).

Células de *Langerhans* fagocitam moléculas salivares do carrapato na epiderme e migram para os linfonodos apresentando estas moléculas para linfócitos do hospedeiro (ALLEN *et al.*, 1979). Assim, anticorpos são produzidos e, juntamente, com o sistema complemento contribuem para resistência adquirida (WIKEL, 1997). Kashino *et al.* (2005) avaliaram os níveis de anticorpos contra antígenos salivares em bovinos susceptíveis (Holandês) e resistentes (Nelore) e verificaram que após pesadas infestações os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 diminuía nos animais Holandeses, permanecendo inalterados nos animais Nelore, indicando que as infestações com carrapato suprimem a resposta humoral mediada por anticorpos IgG em animais susceptíveis.

Outro grupo de células importantes na resposta imune contra os carrapatos são os linfócitos, considerados elementos chave na regulação e na função efetora do sistema imune, incluindo produção de anticorpos, imunidade mediada por células, regulação da resposta imune e manutenção de memória imunológica (BROSSARD e WIKEL, 2004).

## 2.6. Estudos de expressão gênica

Recentemente, com o advento de metodologias que possibilitam estudos de expressão gênica com maior repetibilidade e confiabilidade, como RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) e microarranjos de DNA (DNA *microarray*), vários grupos de pesquisa têm utilizado tais técnicas tanto para entender melhor o complexo processo de resposta bovina contra o carrapato, quanto para enumerar as diferenças existentes entre animais mais resistentes e susceptíveis ao carrapato, sendo estes estudos uma boa fonte para a prospecção de genes candidatos para a resistência ao carrapato (CASSAR-MALEK *et al.*, 2008; REGITANO e PRAYAGA, 2010).

Estudando a expressão de genes na pele de animais das raças Holandesa e Brahman através de qRT-PCR, Piper *et al.* (2008), verificaram a existência de diferença na resposta ao carrapato entre as raças. Foram comparadas as expressões gênicas na pele em sítios onde havia carrapato fixado com sítios onde não havia carrapato fixado, sendo todas as biopsias realizadas 24 horas após a infestação com *R. microplus*. Neste trabalho foi verificada maior expressão de genes relacionados com processos inflamatórios inatos em animais da raça Holandesa nos sítios de fixação do carrapato.

Bagnall *et al.*, (2009) estudaram a expressão na pele de genes relacionados com a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em bovinos da raça Belmont que apresentaram diferença na resistência ao carrapato. As amostras foram coletadas antes da infestação, 3 e 24 horas após a infestação. Foi verificado que, principalmente nos animais mais resistentes, houve maior expressão de alguns dos genes avaliados 3 horas após a infestação, indicando que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  e seus genes associados desempenham um importante papel na diferença de resposta ao carrapato. Já Nascimento *et al.* (2010),

estudaram a expressão gênica, de genes codificantes de proteínas ligantes ao cálcio que são relacionadas com a resposta imune, em animais cruzados zebuino x taurino (Gir x Holandês) contrastantes quanto a resistência ao carrapato. As amostras foram coletadas 5 dias após a infestação. Foi verificada maior expressão dos genes nos animais susceptíveis, indicando maior resposta de hipersensibilidade nesses animais nesse período de tempo após a infestação. Entretanto, tal hipersensibilidade não pareceu proteger os animais susceptíveis contra a infestação pelo ectoparasita.

Recentemente, aplicando a técnica de microarranjos de DNA para estudo de genômica funcional, alguns trabalhos estudaram a expressão diferencial dos genes bovinos na pele frente à infestação pelo carrapato *R. microplus*. Kongsuwan *et al.* (2008) identificaram 138 genes diferencialmente expressos sendo muitos destes envolvidos com defesa imunológica e com proteínas da matriz extracelular. Enquanto os animais da raça Holandesa apresentaram maior expressão principalmente de genes de resposta imunológica, os animais da raça Brahman expressaram maior expressão principalmente de genes envolvidos com matriz extracelular e níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Neste trabalho a expressão gênica foi analisada 24 horas após a infestação com o carrapato, mas não houve comparação com a expressão antes da infestação. Em outro trabalho do mesmo grupo, publicado por Piper *et al.* (2010), utilizando as mesmas raças como referência em resistência e susceptibilidade, foi verificado o mesmo padrão de expressão diferencial entre as raças. Neste estudo a expressão gênica da pele dos animais infestados foi comparada com a expressão na pele de animais que não haviam tido contato com o carrapato (animais *naïve*) das mesmas raças.

É importante lembrar que a resistência do hospedeiro é considerada predominantemente um carácter adquirido devido a um maior nível de resistência em *Bos taurus indicus* somente tornar-se aparente depois de um longo período de susceptibilidade a infestação primária (WHARTON *et al.*, 1970). Em contrapartida, como verificado por Piper *et al.* (2008), os animais susceptíveis passam a apresentar maior contagem de carrapato após infestações sucessivas.

Levando em consideração tal afirmativa, Wang *et al.* (2007) estudaram a expressão gênica da pele nos momentos antes e 24 horas após a infestação por carrapatos. Tais animais eram provenientes do cruzamento Hereford x Shorthorn, ambas as raças taurinas, e não eram *naïve* antes da infestação. Foram encontrados

vários mecanismos potencialmente envolvidos com a resistência ao desafio por carrapatos, incluindo a supressão da resposta inflamatória, a restrição do fluxo sanguíneo e a indução de resposta imune por anticorpos.

No único trabalho até o momento de expressão gênica global em leucócitos da circulação periférica entre animais de raça zebuína e taurina, Piper *et al.* (2009) concluíram que gados zebuínos desenvolveram uma resposta mediada por células T enquanto gados taurinos demonstraram resposta inflamatória inata. Mais trabalhos são necessários para um maior entendimento da expressão gênica em leucócitos presentes na circulação periférica. Neste trabalho foi demonstrada significativa diferença nos perfis celulares, humorais e de expressão gênica entre o sangue periférico de animais resistentes e susceptíveis ao carrapato.

## **2.7. A tecnologia de microarranjos de DNA**

### **2.7.1. GeneChips**

A idéia de usar arranjos de ácidos nucleicos com o propósito de analisar simultaneamente a expressão do maior número possível de genes começou a ser aplicada no final da década de 70, com o advento da técnica conhecida como *Dot-Blot* (KAFATOS *et al.*, 1979). Contudo, foi somente na metade da década de 90 que esta tecnologia adquiriu as características atuais (SCHENA *et al.*, 1995). A tecnologia de *microarray* é o resultado da convergência de variadas técnicas e metodologias provenientes da biologia molecular, genética, química combinatória, robótica e bioinformática.

Atualmente, a plataforma *single-channel* ou *one-color* da Affymetrix é um exemplo de *microarray* com hibridizações independentes de canal único, sendo atualmente a mais amplamente adotada em laboratórios acadêmicos e entidades comerciais. Nela, cada amostra é hibridizada em um chip diferente, para posterior comparação entre chips de amostras diferentes. Os chips de arranjos de sonda, também chamados de *GeneChips* (Affymetrix, USA) são fabricados utilizando uma

tecnologia que combina fotolitografia e química combinatorial. Centenas de milhares de sondas oligonucleotídicas diferentes são sintetizadas em cada arranjo.

Os transcritos são representados por *probe sets*, os quais correspondem a 11 pares de sondas. Cada *probe set* pode reconhecer diferentes transcritos de um mesmo gene ou transcritos correspondentes a genes diferentes. Os pares de sondas são constituídos de sondas Perfect Match (PM) e Mismatch (MM). A sequência de PM e MM é a mesma, exceto pela mudança de um nucleotídeo na 13<sup>a</sup> posição na sequência de MM (LIPSHUTZ *et al.*, 1999), o que a torna capaz de se ligar de forma não específica a outros transcritos, permitindo estimar a ocorrência desse evento no cálculo final da expressão do gene em questão (Figura 2). Cada sonda está localizada em uma região denominada célula (*cell*). Cada célula de sonda contém milhões de cópias de um determinado oligonucleotídeo (Figura 3).

A *Affymetrix* adota esta metodologia na construção de seus GeneChips para minimizar os efeitos do fenômeno da hibridização cruzada que ocorre entre as sondas e transcritos de diferentes genes que possuam sequências parecidas. A relação entre a intensidade de sinal das sondas PM e MM indica se um gene está sendo expresso ("ligado") ou não ("desligado") na célula ou tecido em uma determinada situação experimental. Este sinal tende a ser proporcional à abundância do RNA na amostra, até certa concentração de transcritos.

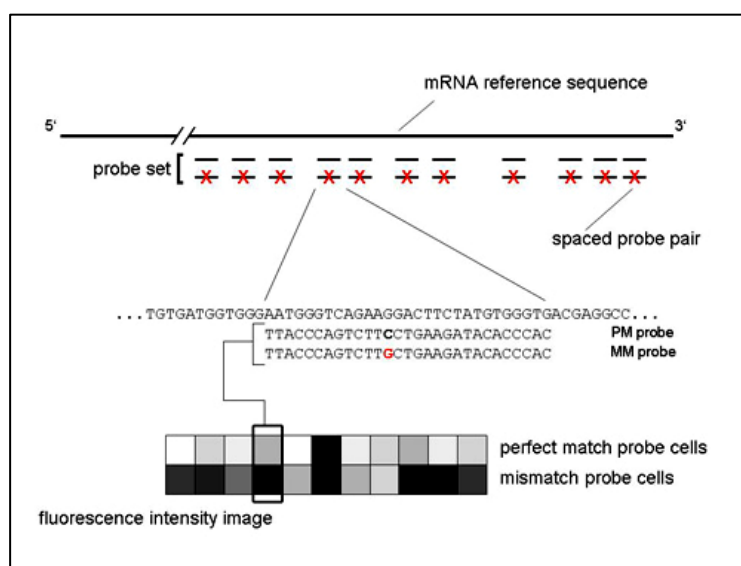


Figura 2: Esquema de um *probe set*, indicando a disposição das sondas PM e MM.

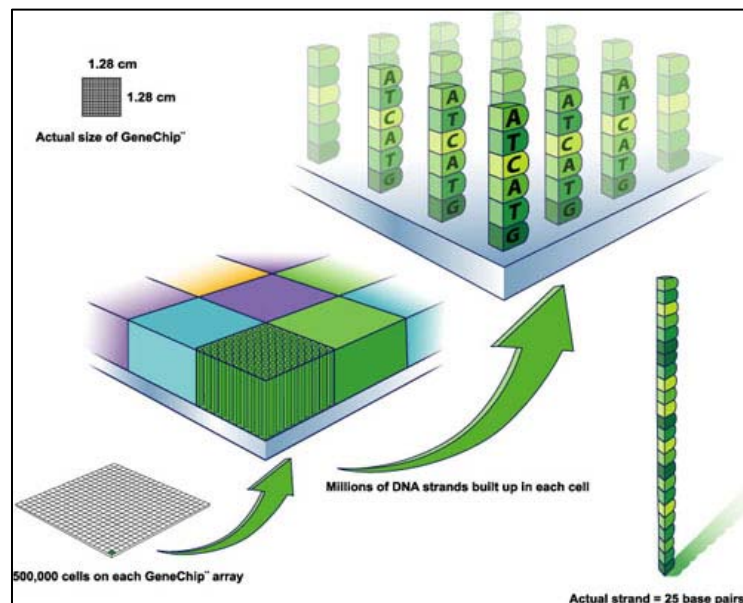


Figura 3: Demonstração da disposição das células (*cells*) nos chips de microarranjo da Affymetrix (*GeneChips*).

### 2.7.2. Análise de pré-processamento

Após a hibridização dos *GeneChips*, torna-se necessário a correção da variação de fluorescência apresentada entre os eles, para que seja possível a comparação entre as amostras. O pré-processamento ou análise primária visa eliminar fontes indesejáveis de variação de modo que as estimativas de expressão obtida reflitam mudanças verdadeiras nos transcritos de forma tão precisa e acurada possível. As fontes de variação originam-se nas diferentes fases do processo de fabricação dos *microarrays* (variação entre lotes de *GeneChips*), do experimento biológico (isolamento do RNA, heterogeneidade de tecidos, variação inter-individual) e do ensaio de *microarray* (transcrição reversa do mRNA, eficiência na marcação das sondas), entre outras (STEKEL, 2003; KORENBERG, 2007; GÖHLMANN e TALLOEN, 2009). Esta análise primária é realizada em 3 passos:

- Correção de *background*: É o passo principal para a remoção de contribuições não biológicas ao sinal medido. Típicos exemplos de sinais não específicos são os sinais de fundo das lavagens incompletas e ligações inespecíficas de transcritos (SEO e HOFFMAN, 2006).

-Normalização: é um processo de correção e ajuste geral dos dados, onde são considerados ajustes para diferenças entre os chips (em termos de média ou mediana e variância), efeito de marcação e outros possíveis erros sistemáticos. Alguns procedimentos de normalização baseiam-se em somente alguns genes presentes nos chips (como gene controles com expressão supostamente constante nos diversos grupos de amostras), outros se baseiam em todos os genes e utilizam procedimentos estatísticos robustos, com a suposição de que a maioria dos genes não é diferencialmente expressa entre os grupos experimentais (GÖHLMANN e TALLOEN, 2009).

- Sumarização: é a etapa onde os valores de intensidade observados para cada conjunto de sondas representativas dos genes (*probe set*) são combinados numa única medida resumo para determinar o nível de expressão do gene. Algumas técnicas (como MAS 5.0, GC-RMA e PLIER) utilizam a média das diferenças entre a intensidade das sondas PM e a intensidade das sondas MM para produzir o valor de expressão, outras consideram somente o valor da intensidade das sondas PM (como MBEI, RMA e sRMA). As técnicas citadas são algoritmos contidos em programas específicos para análise de dados de *microarray*, como revisto em Seo e Hoffman, (2006).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão gênica de bovinos cruzados com variação de resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Identificar genes que tenham a expressão gênica modificada (ativação ou repressão) durante as primeiras 48 horas após a infestação com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;
- Validar os genes diferencialmente expressos no experimento de *microarray* por qRT-PCR;
- Determinar os níveis de expressão no sangue e na pele de genes selecionados por estarem possivelmente relacionados à resposta de resistência/susceptibilidade ao carrapato;
- Compreender a diferença nos mecanismos de resposta contra a infestação por carrapato entre animais susceptíveis e resistentes.
- Enumerar genes como candidatos a resistência ao carrapato.



- 

#### **4. Experimento 1:**

**Expressão de genes relacionados com resposta imune no sangue  
periférico de bovinos infestados com *Rhipicephalus microplus***

## 4.1. Introdução

O carrapato de gado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas severas em empreendimentos de gado e leite nos trópicos (JONSSON, 2006). Os principais impactos econômicos dos carrapatos são os custos envolvidos com o controle parasitário, juntamente com as perdas na fertilidade, peso corporal e produção de leite. Os carrapatos também são vetores dos hemoparasitas *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* que causam a tristeza parasitária bovina (REGITANO e PRAYAGA, 2010).

Atualmente, as estratégias de controle ao carrapato são baseadas em acaricidas químicos (GEORGE *et al.*, 2004). Porém, devido a problemas relatados de resistência aos acaricidas (LEITE *et al.*, 1995), resíduos químicos na carne e no leite (ALVINERIE *et al.*, 1999), e altos custos de acaricidas (SAMISH, 2000), métodos alternativos estão sendo estudados para permitir um controle mais eficiente (SONESHINE *et al.*, 2006). Para o desenvolvimento destes, maior conhecimento sobre a relação parasito-hospedeiro é necessário para o desenvolvimento dos novos métodos de controle do carrapato (RECK JR *et al.* 2009).

Geralmente, animais de raça zebuína são mais resistentes ao carrapato que animais da raça taurina, embora consideráveis variações em resistência ocorram entre e dentro das raças. (SEIFERT, 1971). A variação genética para resistência ao carrapato resulta de diferenças em uma variedade de mecanismos que não são completamente compreendidos, mas o envolvimento de genes relacionados ao sistema imunológico em muitos desses mecanismos é inegável (REGITANO e PRAYAGA, 2010).

Apesar da imunidade inata decorrente das diferenças entre raças zebuínas e taurinas formar a base de resistência do animal ao parasita, a resistência do hospedeiro é considerada como um caracter predominantemente adquirido uma vez que o alto nível de resistência, vista em animais da subespécie *Bos t. indicus*, se torne aparente somente seguindo um período de inicial susceptibilidade à infestação primária (WANGLAND, 1978).

Recentemente, pesquisadores têm utilizado estudos de expressão gênica com intuito de entender melhor os processos de resposta imunológica que resultam

em diferentes níveis de resistência ao carrapato. A grande maioria destes trabalhos foi realizada em biópsias de pele no local da infestação (WANG *et al.*, 2007; KONGSUWAN *et al.*, 2008; PIPER *et al.*, 2008; BAGNALL *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2010; PIPER *et al.*, 2010), e até o presente momento, apenas um avaliou a expressão gênica no sangue periférico dos bovinos (PIPER *et al.*, 2009) encontrando diferenças significativas entre os animais resistentes e susceptíveis ao carrapato. Porém, a falta de amostras antes da infestação artificial dificultou o entendimento do processo de resposta ao carrapato.

## **4.2. Objetivos**

- Estudar o perfil da expressão de genes relacionados a resposta imune, no sangue periférico de bovinos infestados com o carrapato *Rhipicephalus microplus*.
- Comparar e diferenciar a expressão destes genes entre bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato.

## **4.3. Metodologia**

A partir de amostras de sangue periférico de bovinos infestados com carrapatos foi realizada análise de expressão de genes relacionados com a resposta imune por qRT-PCR. Este experimento consistiu em: escolha dos animais experimentais, infestação artificial, coleta de amostras de sangue periférico, extração de RNA, transcrição reversa, teste de amplificação dos primers, padronização das reações de qRT-PCR com cálculo de eficiência, amplificação das amostras e análises estatísticas.

### 4.3.1. Animais Experimentais

Os animais experimentais foram provenientes dos cruzamentos entre animais F1 produzidos por meio do cruzamento de bovinos da raça Holandesa com bovinos da raça Gir. Para tanto, foram utilizadas 28 fêmeas Gir (em trabalho de superovulação e transferência de embriões) inseminadas de quatro touros da raça Holandesa, produzindo um total de 150 animais F1. Destes, apenas 4 machos foram escolhidos, baseados no vigor, para serem acasalados com sessenta e oito fêmeas F1 constituindo quatro famílias, evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas. No total foram obtidos 357 indivíduos F2. Toda a população F2 foi desenvolvida no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado em Santa Mônica, Valença, Rio de Janeiro.

Os animais F2 foram submetidos a infestações artificiais com larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para a avaliação da resistência a carrapato. As infestações foram feitas preferencialmente durante a primavera, verão e outono, épocas em que a confiabilidade e a repetibilidade das contagens são maiores (UTECH *et al.*, 1978). Em cada infestação, cerca de 10.000 larvas, preparadas no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, foram inseridas em um colar adaptado sendo este colocado na região cervical do animal, de modo que as larvas atingissem ambos os lados do corpo. No vigésimo primeiro dia após a infestação, dia modal de queda dos carrapatos (WHARTON e UTECH, 1970), foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro, de um lado do animal, multiplicando-se o resultado por dois para se obter o número total de carrapatos por animal. As contagens foram realizadas pela manhã, até aproximadamente 9 horas, quando a maioria dos carrapatos se desprende dos animais. Os animais foram avaliados em grupos contemporâneos, com idade entre 10 a 14 meses, em torno de 20 a 30 animais por grupo e mantidos a pasto, desde a infestação até a contagem.

Os dados das contagens do número de carrapatos por animal foram transformados para a escala logarítmica utilizando o seguinte procedimento: Contagem transformada (Ctr) =  $\text{Log}_{10} (\text{contagem}+1)$ . Algumas características independentes que podem interferir no número de carrapatos por animal foram

consideradas, são elas: cor da pelagem, espessura da capa, comprimento do pêlo, densidade do pêlo, sexo, idade, ordem da infestação, ano da infestação e grupo de animais. Deste modo, foi predito para cada animal, o valor genético ( $u$ ), que representa a diferença genética média da Ctr do animal em relação aos demais animais avaliados. O valor genético foi obtido a partir de um modelo que considera, além do efeito do animal, os efeitos das demais características independentes. O valor genético foi utilizado para remover o efeito destas características na contagem de carrapatos (Ctr), sendo obtido pela solução do sistema de equações abaixo:

$$\begin{pmatrix} \beta \\ u \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} X'y \\ Z'y \end{pmatrix}$$

onde:

$\beta$  é o vetor de efeitos fixos no modelo (cor da pelagem, espessura da capa, comprimento do pêlo, densidade do pêlo, sexo, idade, ordem da infestação, ano da infestação e grupo de animais);  $u$  é um vetor contendo os valores genéticos de Ctr para cada animal avaliado;  $X$  é uma matriz de incidência dos efeitos fixos;  $Z$  é a matriz de incidência dos efeitos aleatórios;  $\sigma_e^2$  é a variância residual;  $\sigma_a^2$  é a variância genética aditiva e  $y$  é um vetor da contagem de carrapatos transformada.

A solução das equações foi obtida pelo sistema MTDFREML (*multiple trait derivative free restricted maximum likelihood*) (BOLDMAN *et al.*, 1993).

Os animais foram ordenados de acordo com o valor genético e, então, 6 animais dentre os com menores valores genéticos (resistentes) e 7 animais dentre os com maiores valores genéticos (susceptíveis) foram utilizados nos estudos de expressão gênica descritos neste e no próximo capítulo (Figuras 4 e 5).

Michelmore *et al.* (1991) propuseram a utilização do método de *bulked segregant analysis*, onde a partir de uma população segregante, indivíduos são agrupados de acordo com o fenótipo da característica de interesse. Assim, tais grupos são geneticamente dissimilares para os genes envolvidos na característica e, aparentemente heterozigotos para todos os outros genes ou regiões genômicas. O presente estudo utilizou tal método por propiciar diferenças de expressão majoritariamente apenas relacionadas com a resposta ao carrapato e, evitar assim, confusão com características inerentes às raças.



Figura 4: Alguns dos animais experimentais, com destaque para a variação fenotípica.

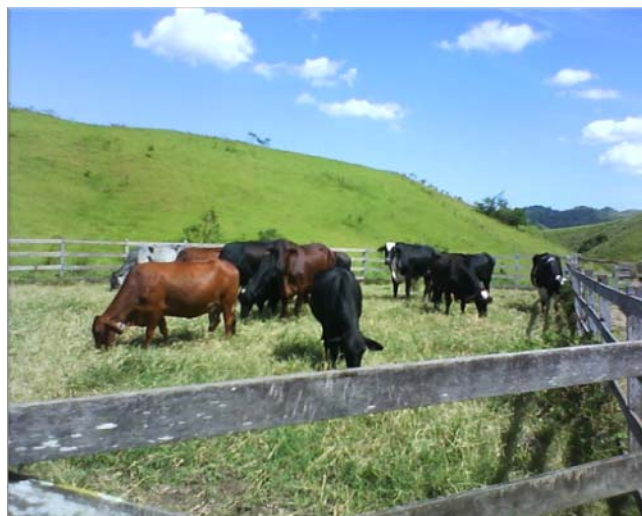


Figura 5: Alguns dos animais experimentais momentos antes da infestação artificial.

### 4.3.2. Infestação e Coleta das Amostras

Os animais selecionados sofreram previamente desinfestação por dois banhos de carrapaticida e sarnicida U.C.B. (Laboratório U.C.B.) a 21 e 14 dias antes da infestação, sendo desde então mantidos em baias individuais com piso de cimento e rasqueados uma vez ao dia até o dia da infestação.

Cerca de 20.000 larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram colocadas sobre a região do lombo dos animais. Amostras de sangue e pele foram coletadas antes da infestação, 24 e 48 horas após a infestação.

O sangue periférico foi retirado por punção na veia caudal em tubo Vacutainer de 5 ml com EDTA. As amostras foram mantidas a 4 – 8°C para a separação em camadas por decantação. Este processo durou em média 48h e, logo após, a camada de células brancas foi submetida à extração de RNA.

### 4.3.3. Extração de RNA das amostras de sangue

A camada de células brancas foi retirada por pipetagem das amostras de sangue total decantadas. Como não foi possível isolar somente as células brancas, o material retirado foi pré-purificado e homogeneizado com o kit QIAshredder (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A extração e purificação do RNA total foi feita com o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante.

A quantificação e avaliação da pureza das amostras foram realizadas no nanoespectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Para o cálculo de quantificação foi utilizado o valor de absorbância em 260nm (A260) e, para o controle de pureza foram observadas as razões A260/A230 e A260/A280.

Usando o aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent) foi possível avaliar a integridade do RNA total e comprovar a ausência de DNA genômico na amostra. Neste equipamento o RNA total extraído é submetido a eletroforese capilar onde é

possível ver e analisar a presença e integridade das duas moléculas de RNA ribossômico (mais abundantes em qualquer célula). O software, então, avalia a qualidade e integridade do RNA por meio de uma nota denominada RIN (RNA Integrity Number) que varia de 0 a 10. Os chips utilizados nas análises foram os pertencentes aos kits *Agilent RNA 6000 Nano* e *Agilent RNA 6000 Pico*, dependendo da concentração da amostra. As amostras de boa qualidade foram guardadas a -80°C até o uso.

#### **4.3.4. Transcrição reversa**

A primeira fita de cDNA foi sintetizada com o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados 6µL da solução de RNA total já quantificado e avaliado quanto a pureza e integridade. A reação de síntese de cDNA foi conduzida por 50 minutos a 50°C seguidos de 5 minutos a 85°C, para inativação da transcriptase reversa, e resfriamento a 4°C. O cDNA produzido permaneceu armazenado a -80°C até o uso nas reações de RT-PCR.

#### **4.3.5. Teste de amplificação dos primers**

Os primers (Tabela 1) foram testados por amplificação por RT-PCR com temperatura de anelamento dos *primers* de 60°C, temperatura *default* para as reações de qRT-PCR no termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 8% a 400V por 2 horas. Foram analisadas a especificidade da reação e a presença de dímeros de *primers*. Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes foram confeccionados conforme dados da literatura ou desenhados usando o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) a partir de sequências obtidas do



banco de dados do GenBank<sup>1</sup>. Como controles endógenos foram utilizados os genes GAPDH e HPRT (Tabela 1).

Os genes estudados nestes capítulo foram escolhidos devido à possibilidade de ação de mecanismos moduladores da resposta imune, o que acarretaria menor resposta inflamatória e, conseqüentemente, menor disponibilidade de sangue como alimento para o carrapato.

Tabela 1: Genes estudados no sangue periférico via qRT-PCR

| Nome <sup>a</sup> | Amplicon | Primers                                                                        | Referência                       |
|-------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| CD25              | 209bp    | F: 5' TGCTAAGAGCATCCCGACTT 3'<br>R: 5' TAGCTTGGAGGACTGGGCTA 3'                 | PIPER <i>et al.</i> , 2009       |
| CXCL8             | 113bp    | F: 5' CACTGTGAAAAATTCAGAAATCATTGTTA 3'<br>R: 5' CTTACACCAAATACCTGCACAACCTTC 3' | LEUTENEGGER <i>et al.</i> , 2000 |
| CXCL10            | 177bp    | F: 5' AGTGGAAAGCCCCTGCAGTAAA 3'<br>R: 5' AGTCCCAGCCTTGCTACTGACA 3'             | KONGSUWAN <i>et al.</i> , 2008   |
| FoxP3             | 74bp     | F: 5' AAGAGCCCAGGGACAACCTTTC 3'<br>R: 5' GGGTTCAAGGAGGAAGAGGAA 3'              | SEO <i>et al.</i> , 2007         |
| IL10              | 94bp     | F: 5' CCAAGCCTTGTCGGAAATGA 3'<br>R: 5' GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA 3'               | LEUTENEGGER <i>et al.</i> , 2000 |
| TNF $\alpha$      | 103bp    | F: 5' TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGT 3'<br>R: 5' CCATGAGGGCATTGGCATAC 3'            | LEUTENEGGER <i>et al.</i> , 2000 |
| GAPDH             | 119bp    | F: 5' GGCGTGAACACGAGAAGTATAA 3'<br>R: 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT 3'                | LEUTENEGGER <i>et al.</i> , 2000 |
| HPRT              | 290bp    | F: 5' GCCGACCTGTTGGATTACAT 3'<br>R: 5' ACACTTCGAGGGGTCCTTTT 3'                 | TAO <i>et al.</i> , 2004         |

<sup>a</sup> CD25, alpha chain of the IL2 receptor (IL2R $\alpha$ ); CXCL8, interleukin 8; IL10, interleukin 10; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha, GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Nov 2011)

#### 4.3.6. Padronização das reações de qRT-PCR

Os dados de expressão gênica por qRT-PCR são expressos como valores de *cycle threshold* (Ct), onde este indica o número de ciclos da PCR no qual o sinal de fluorescência alcança o limiar da curva de amplificação (BUSTIN, 2000). Como para quantificar a expressão dos genes foi utilizado o método de  $\Delta C_t$  (GIULIETTI *et al.*, 2001; WONG e MEDRANO, 2005) e, neste método é levada em consideração a eficiência de amplificação de cada gene, tornou-se necessário padronizar a quantidade de cDNA e a concentração de cada *primer* na reação, com a finalidade de obter especificidade, repetibilidade e uma boa eficiência de amplificação. Assim, utilizando um *pool* de todas as amostras, foi realizada amplificação dos genes por qRT-PCR com quatro diluições seriadas de cDNA em duas concentrações diferentes de *primer*.

Para determinar tais eficiências, diferentes diluições de cDNA são amplificadas, em duplicata, para todos os genes alvo e os de referência endógena, a fim de se obter uma curva padrão e determinar o coeficiente de inclinação da reta para cada gene. A eficiência para cada par de *primer* é calculada utilizando a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$$

onde,  $E$  é a eficiência da reação.

Frente aos resultados de amplificação e eficiência obtidos nas condições testadas, para cada gene foi escolhida a melhor condição de concentração de *primer* (Tabela 2) de modo a proporcionar eficiências mais próximas entre os genes alvo e o de controle endógeno, tal como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os cálculos de eficiência da reação foram realizados utilizando o programa *Relative Expression Software Tool* 2009 (REST 2009), descrito por Pfaffl *et al.* (2002).

Para cada gene, foi escolhida ainda uma quantidade inicial de cDNA, dentre as quatro diluições seriadas testadas (para a concentração já escolhida de *primer*). É importante que a amplificação atinja o nível ótimo de eficiência durante a fase exponencial de amplificação, ou seja, a cada ciclo dobra-se o produto da amplificação, apresentando assim valor de eficiência próximo a 2. Foram escolhidas as condições que apresentaram a eficiência média (da duplicata) mais próxima de 2, sendo esta calculada pelo software LinRegPCR 12.10 (RUIJTER *et al.*, 2009).

Tabela 2: Condições escolhidas para cada primer, com quantidade de cDNA e concentração de primers.

| Gene   | cDNA (ng) | primer(uM) | TD (°C) | Ef REST | Ef LinReg | Ct médio | CV(%) |
|--------|-----------|------------|---------|---------|-----------|----------|-------|
| CD25   | 4         | 0,1        | 81,58   | 0,947   | 1,954     | 31,01    | 4,60  |
| CXCL8  | 4         | 0,2        | 76,72   | 0,990   | 1,956     | 30,85    | 5,43  |
| CXCL10 | 4         | 0,1        | 76,10   | 0,974   | 1,987     | 28,37    | 3,79  |
| FoxP3  | 4         | 0,2        | 80,91   | 0,948   | 1,996     | 30,37    | 9,72  |
| IL10   | 4         | 0,1        | 80,14   | 0,996   | 1,838     | 30,04    | 7,88  |
| TNFa   | 4         | 0,2        | 82,75   | 0,980   | 1,930     | 27,78    | 6,08  |
| GAPDH  | 4         | 0,1        | 82,37   | 0,944   | 1,930     | 21,36    | 3,23  |
| HPRT   | 4         | 0,1        | 78,86   | 0,958   | 1,974     | 27,82    | 2,70  |

TD , Temperatura de dissociação; Ef REST, eficiência calculada pelo programa REST; Ef LinReg, eficiência calculada pelo programa LinRegPCR; CV (%), coeficiente de correlação médio do gene (em porcentagem)

#### 4.3.7. Amplificação das amostras

As reações foram feitas em duplicata e respeitaram as condições de quantidade de *primer* e de cDNA escolhidas na padronização para cada gene. Cada reação consistiu em 20µl contendo a quantidade de cDNA de acordo com a condição escolhida, a concentração escolhida dos primers *forward* e *reverse*, 10µl de *iTaq SYBR Green Supermix With ROX* (Bio-Rad) e água nuclease free para completar o volume final. As condições de amplificação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C). Ao final de cada reação foi produzida a curva de dissociação (*melting point*) para assegurar que cada reação produziu um único fragmento. Todas as reações ocorreram no termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystems), e os dados foram gerados pelo *software ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*. O coeficiente de variação (CV) entre as duplicatas foi calculado e aquelas com valores de CV acima de 5% foram repetidas.

#### **4.3.8. Agrupamento de amostras e contrastes analisados**

As amostras foram agrupadas de acordo com o tempo em relação à infestação com carrapato e o perfil fenotípico dos animais. Desta forma, foram criados seis grupos assim definidos:

R0, R24 e R48: Amostras dos animais com menor valor genético para contagem de carrapatos, ou seja, mais resistentes, nos tempos zero (antes da infestação), 24 (24 horas após a infestação) e 48 (48 horas após a infestação), respectivamente.

S0, S24 e S48: Amostras dos animais com maior valor genético para contagem de carrapatos, ou seja, mais susceptíveis, nos tempos zero (antes da infestação), 24 (24 horas após a infestação) e 48 (48 horas após a infestação), respectivamente.

Nos experimentos descritos neste e no próximo capítulo, as diferenças de expressão gênica foram avaliadas em contrastes entre dois grupos de mesmos animais, com tempos diferentes em relação à infestação, e, entre grupos com o mesmo tempo em relação ao momento da infestação, mas com animais considerados resistentes e susceptíveis ao carrapato. Assim, foram gerados nove contrastes nomeados a seguir, onde o valor de diferença de expressão a ser apresentado é do segundo grupo em relação ao primeiro: R0xR24, R0xR48, R24xR48, S0xS24, S0xS48, S24xS48, R0xS0, R24xS24 e R48xS48.

#### **4.3.9. Análises Estatísticas**

Os valores de Ct obtidos ao fim das reações de PCR em Tempo Real foram analisados pelo programa REST 2009 para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos. Este programa permite a análise de expressão diferencial com correção para a eficiência para cada gene e com normalização para mais de um controle endógeno.

Para cada gene de interesse, é calculada a expressão relativa média entre amostras de dois grupos (um tratamento e outro controle) por vez. Para isso, primeiramente, foram selecionadas randomicamente (10000 vezes) uma amostra de cada grupo e, então foi calculado um valor intermediário de concentração absoluta (VICA) para o gene de interesse e para cada gene de controle endógeno:

$$VICA = \frac{Ct\text{ médio Controle}}{Ct\text{ médio Tratamento}}$$

Então, a expressão relativa é calculada pela divisão do VICA do gene de interesse pela média geométrica entre os VICA dos genes de controle endógeno:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{VICA_{GI}}{\sqrt{VICA_{CE1} * VICA_{CE2}}}$$

Onde,  $VICA_{GI}$  é o valor intermediário de concentração absoluta do gene de interesse e  $VICA_{CE1}$  e  $VICA_{CE2}$  são os valores intermediários de concentração absoluta dos genes de controle endógeno utilizados.

São assim produzidos 10000 valores de expressão relativa para cada gene de interesse na comparação dos dois grupos. Esses valores são ordenados por ordem crescente, para determinar os intervalos de confiança. O intervalo de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ), por exemplo, é definido como entre o 250º valor ( $\frac{\alpha}{2} \times 10000$ ) e o 9750º valor  $(1 - \frac{\alpha}{2}) \times 10000$ . O valor de expressão diferencial é a mediana dos valores ordenados. Em cada um dos contrastes analisados, foram considerados significativos os genes que apresentaram diferença de expressão com valor  $p < 0,05$  (PFFAFL *et al.*, 2002).

O modelo utilizado pelo programa REST tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição, de se adequar a dados cuja variância pode ser grande, quando não é possível a aplicação de testes paramétricos, e de levar em consideração a eficiência de amplificação de cada gene.

#### 4.4. Resultados

A amostra de sangue coletada por animal/tempo (aproximadamente oito mL) foi satisfatória para a obtenção de quantidade necessária de RNA para a realização do experimento. Em média foram obtidos 1 µg de RNA total apresentando boa

qualidade em pureza e integridade. O valor médio da razão das absorbâncias a 260/280nm das amostras foi de 2,04 e o número de integridade do RNA (RIN) das amostras variou de 6,5 a 8,7, tendo como média 7,6.

Para cada gene estudado foi encontrada uma concentração de primer na qual as eficiências da reação foram próximas entre os genes alvo e os de controle endógeno e não houve amplificação inespecífica e formação de dímero de primers, comprovado pela visualização do gráfico de dissociação do produto amplificado de cada gene, onde foi observado apenas um pico na temperatura de dissociação (TD) esperada.

Em geral, dentro de cada grupo os genes apresentaram coeficientes de variação menores que 10%, exceto para FOXP3 no grupo de animais susceptíveis 24 horas após a infestação (Tabela 3). Levando em consideração todas as amostras, os menores coeficientes de variação foram encontrados nos genes de controle endógeno, tal como esperado.

Analisando a expressão gênica nos animais resistentes com o decorrer do tempo (Tabela 4 e Figura 6), nenhum gene teve sua expressão significativamente alterada 24 horas após a infestação quando comparada a antes da infestação. Às 48 horas após a infestação, os genes IL10, FoxP3, CD25 e CXCL10 apresentaram aumento significativo da expressão tanto em relação a antes da infestação quanto 24 horas após a infestação. Os genes CXCL8 e TNF $\alpha$  não apresentaram diferença de expressão entre os tempos no grupo de animais resistentes.

Tabela 3: Ct médio e coeficiente de correlação encontrados para cada gene em cada um dos grupos avaliados.

| Gene         | Grupo        | Ct Médio |       |       | CV(%) |       |      |
|--------------|--------------|----------|-------|-------|-------|-------|------|
|              |              | 0h       | 24h   | 48h   | 0h    | 24h   | 48h  |
| CD25         | Resistentes  | 32,12    | 31,08 | 29,38 | 1,68  | 1,39  | 3,17 |
|              | Susceptíveis | 31,44    | 31,17 | 31,30 | 3,17  | 6,03  | 7,00 |
| CXCL8        | Resistentes  | 31,85    | 31,56 | 30,89 | 3,26  | 2,88  | 9,92 |
|              | Susceptíveis | 29,62    | 30,68 | 31,74 | 2,61  | 4,88  | 9,99 |
| CXCL10       | Resistentes  | 28,95    | 28,01 | 27,11 | 1,70  | 1,50  | 5,11 |
|              | Susceptíveis | 29,16    | 28,04 | 28,89 | 1,46  | 1,88  | 4,40 |
| FOXP3        | Resistentes  | 32,22    | 32,56 | 26,13 | 9,24  | 3,08  | 2,66 |
|              | Susceptíveis | 30,58    | 29,38 | 30,01 | 8,04  | 11,41 | 7,28 |
| IL10         | Resistentes  | 32,10    | 31,22 | 26,48 | 4,24  | 2,26  | 5,20 |
|              | Susceptíveis | 31,02    | 29,10 | 28,98 | 5,52  | 6,35  | 9,55 |
| TNF $\alpha$ | Resistentes  | 28,62    | 27,28 | 27,29 | 6,63  | 2,14  | 7,17 |
|              | Susceptíveis | 27,83    | 28,04 | 27,36 | 2,68  | 8,07  | 8,77 |
| GAPDH        | Resistentes  | 21,36    | 20,74 | 21,56 | 3,83  | 1,83  | 2,14 |
|              | Susceptíveis | 21,36    | 21,52 | 21,66 | 2,03  | 4,55  | 3,01 |
| HPRT         | Resistentes  | 28,14    | 27,25 | 28,09 | 2,77  | 2,74  | 3,95 |
|              | Susceptíveis | 27,91    | 27,95 | 27,48 | 1,63  | 3,11  | 1,01 |

CV (%), coeficiente de variação (em porcentagem)

Tabela 4: Valores de razão da expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação.

| Genes  | 24h   | 48h      |
|--------|-------|----------|
| CD25   | 1,085 | **5,997  |
| CXCL8  | 0,673 | 1,866    |
| IL10   | 1,194 | **31,615 |
| FoxP3  | 0,585 | **35,476 |
| CXCL10 | 1,05  | *3,375   |
| TNFa   | 1,547 | 2,439    |

\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

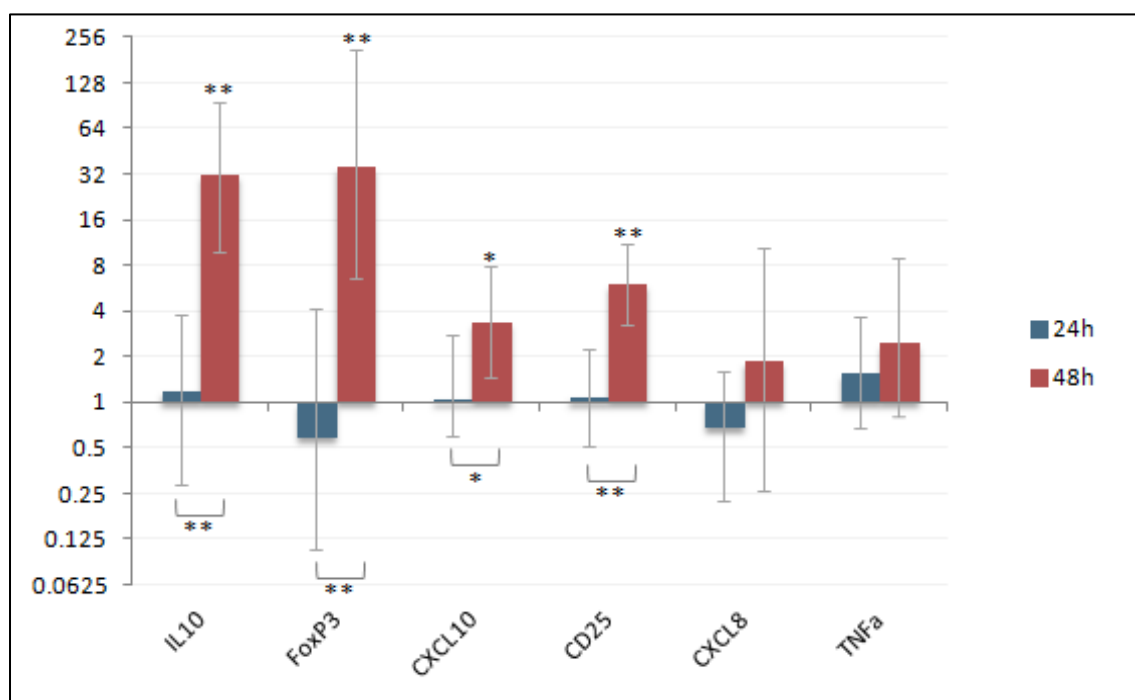


Figura 6: Gráfico da razão de expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

No grupo de animais susceptíveis, apenas os genes CXCL8 e CXCL10 apresentaram diferença de expressão significativa com o decorrer do tempo (Tabela 5 e Figura 7). O primeiro apresentou maior expressão às 24 horas após a infestação em relação a antes da infestação e o segundo foi menos expresso tanto às 24 quanto às 48 horas após a infestação em relação a antes da infestação.



Tabela 5: Valores de razão da expressão gênica nos animais susceptíveis após a infestação em relação a antes da infestação.

| Genes  | 24h    | 48h    |
|--------|--------|--------|
| CD25   | 1,226  | 0,847  |
| CXCL8  | *0,495 | *0,173 |
| IL10   | 3,42   | 3,975  |
| FoxP3  | 2,167  | 1,65   |
| CXCL10 | *2,196 | 0,895  |
| TNFa   | 0,967  | 1,56   |

\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

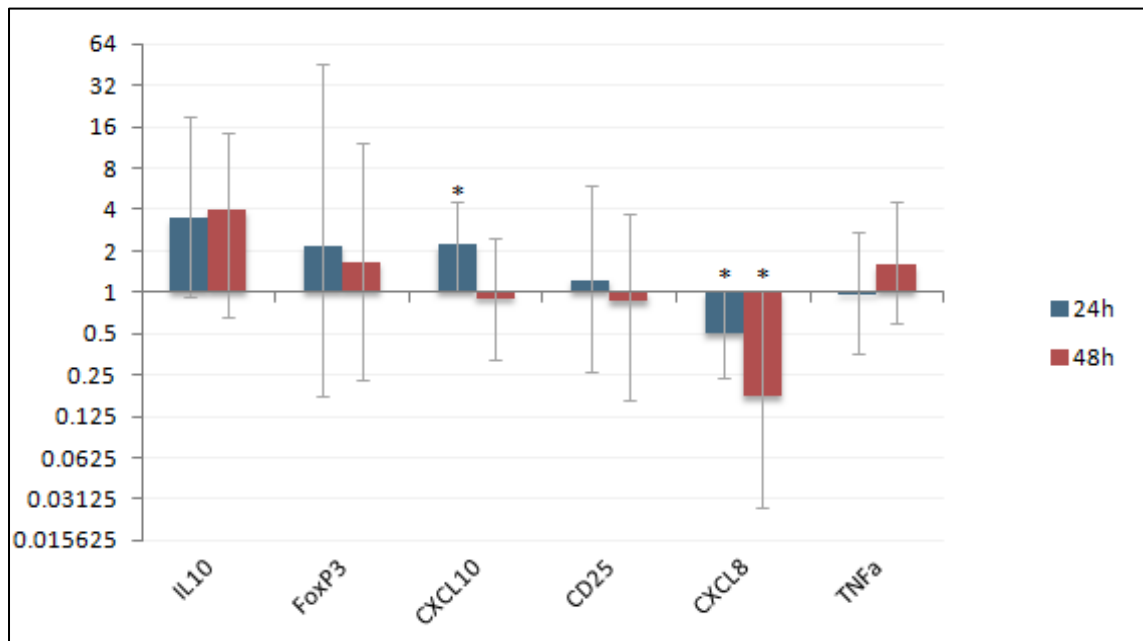


Figura 7: Gráfico da razão de expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação. \*,  $p < 0,05$ .

Comparando a expressão entre os grupos de animais resistentes e susceptíveis nos mesmos tempos, nos susceptíveis foi observada significativa maior expressão de CXCL8 antes da infestação e de IL10, FoxP3 e CXCL8 às 24 horas após a infestação, enquanto que nos resistentes foi observada maior expressão de FoxP3, CXCL10 e IL2R $\alpha$  às 48 horas após a infestação (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6: Valores de razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados.

| Genes  | 0h      | 24h     | 48h    |
|--------|---------|---------|--------|
| CD25   | 1,351   | 1,246   | *0,191 |
| CXCL8  | **3,989 | **5,926 | 0,369  |
| IL10   | 1,901   | *5,447  | 0,239  |
| FoxP3  | 2,534   | *9,381  | *0,118 |
| CXCL10 | 0,747   | 0,711   | *0,198 |
| TNFa   | 1,591   | 0,994   | 1,017  |

\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

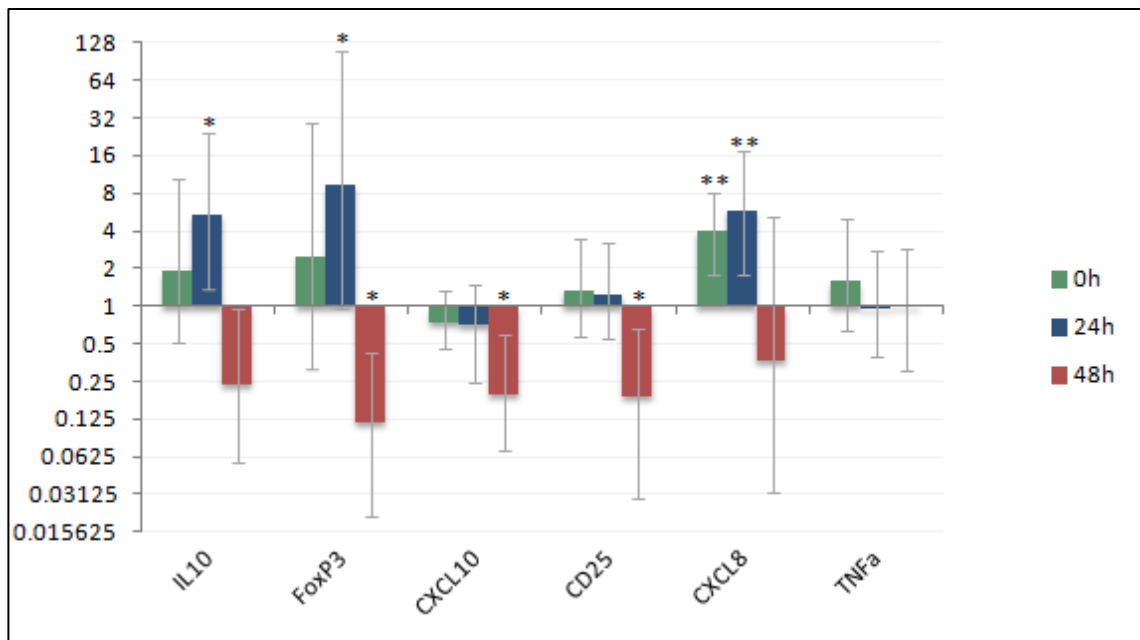


Figura 8: Gráfico da razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

## 4.5. Discussão

Este é o primeiro trabalho que usa estudos de expressão gênica no sangue periférico de gado cruzado, com contrastantes graus de resistência, para analisar a resposta imunológica frente à infestação com o carrapato *R. microplus*.

Dentre os genes estudados, o marcador CD25 é expresso em células ativadas, incluindo células T, células B, monócitos e em células T regulatórias (BELKAID, 2007). A maior expressão desse marcador, nos animais resistentes, indica maior quantidade de algum tipo de célula marcada CD25+ no sangue destes às 48 horas após a infestação. Piper *et al.* (2009) também observaram maior expressão de CD25 no sangue dos animais resistentes após a infestação. Constantinoiu *et al.* (2010) notaram que, após sucessivas infestações, havia maior quantidade de células CD25+ na pele dos animais resistentes. Porém, não foi identificado qual fenótipo celular, que apresenta tal marcador de superfície, foi responsável por tal variação.

Uma das células que apresenta este marcador de superfície são os linfócitos T  $\gamma\delta$ . Piper *et al.* (2009) observaram maior quantidade de células T  $\gamma\delta$  no sangue dos animais resistentes. Analisando a pele dos animais, Constantinoiu *et al.* (2010) também observaram maior proporção desse fenótipo celular nos animais resistentes. Em ambos os casos, este maior número de células T  $\gamma\delta$  ativadas é que pode ter aumentado o número de células CD25+ (marcador de células T ativadas) também encontrado nos animais resistentes. Como revisto por Guzmán *et al.* (2011), os linfócitos T  $\gamma\delta$  bovinos possuem características tanto da imunidade inata quanto da adquirida e, ainda, podem desempenhar função regulatória do sistema imune.

Constantinoiu *et al.* (2010) notaram uma diminuição na quantidade de células marcadas com CD25 ao decorrer do tempo após sucessivas infestações, o que os fez sugerirem a possibilidade deste fato estar relacionado com a ação de linfócitos T regulatórios. Geralmente, tais linfócitos possuem o fator de transcrição FOXP3 intracelular e desempenham função de supressão da resposta imune e controle da homeostase por ação da interleucina 10 (IL-10) dentre outras citocinas (ZHENG *et al.*, 2004). Porém, nos bovinos, aparentemente, são os monócitos e os linfócitos T  $\gamma\delta$  que possuem a função de regulação da resposta a partir da expressão de IL-10

(HOEK *et al.*, 2009), diferente do observado em humanos, onde os linfócitos T CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ é que desempenham tal função (HORI *et al.*, 2003).

Com intuito de estudar a ação regulatória dos linfócitos T  $\gamma\delta$ , foi analisada a expressão diferencial de IL-10 no sangue dos animais neste experimento. Interessantemente, como pode ser observado na Figura 6, o padrão de expressão de CD25 foi o mesmo de IL10 sugerindo que nos animais resistentes há maior ação de linfócitos T  $\gamma\delta$  que desempenham a função de regulação da resposta imune.

Uma quimiocina importante no tráfego de linfócitos T  $\gamma\delta$  é CXCL10, principal ligante do receptor CXCR3, presente em grande quantidade em linfócitos T  $\gamma\delta$  do *subset* circulante em humanos (POGGI *et al.*, 2007). A maior expressão dessa quimiocina no sangue dos animais resistentes, como vista no presente trabalho, indica maior tráfego desse tipo celular nesses animais.

Um fato interessante é a alteração na expressão do marcador FOXP3 notada aqui. Surpreendentemente a alteração da expressão desse marcador seguiu um padrão muito semelhante ao ocorrido com o gene da IL-10. Hoek *et al.* (2009) verificaram que, em bovinos, as células CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+ não são anérgicas, havendo então possibilidade de multiplicação desse fenótipo celular nos bovinos resistentes. Este fenótipo celular, apesar de já descrito em bovinos, tem função desconhecida, e, então, serão necessários novos ensaios para a definição das interleucinas produzidas pelas células FOXP3+ em bovinos, bem como a definição das funções biológicas das mesmas para, então, serem pressupostas as ações dessas frente à infestação com carrapato.

Piper *et al.* (2009) identificaram maior população de células CD14+ (marcador celular de granulócitos, principalmente neutrófilos) no sangue de animais susceptíveis 24 horas após a infestação. Aqui, o gene da interleucina 8 (CXCL8), quimiocina responsável pela atração e ativação de neutrófilos, apresentou maior expressão nos animais susceptíveis antes da infestação e 24 horas após a infestação quando comparados ao grupo de animais resistentes. A maior expressão dessa quimiocina indica a possibilidade de que os animais susceptíveis ainda estavam respondendo frente a saliva de carrapatos de infestações anteriores.

Pôde ser observado também que, apenas nos animais susceptíveis, a expressão de CXCL8 sofreu uma redução após a infestação com o carrapato, até tornar-se sem diferença significativa perante os animais resistentes 48 horas após a

infestação. Wang *et al.* (2007) estudando apenas animais taurinos, perceberam diminuição da expressão de CXCL8 na pele dos animais susceptíveis após a infestação. Hajnická *et al.* (2001) observaram a ação anti CXCL8 no extrato da glândula salivar (SGE) de diversas espécies de carrapato. O bloqueio de CXCL8 confere uma vantagem de sobrevivência para o carrapato (BROSSARD e WIKEL, 2004), e, aparentemente, tal bloqueio é mais bem controlado nos animais resistentes. Outra explicação possível para o decaimento da expressão de CXCL8 no sangue periférico nos animais susceptíveis pode ser tendência de infiltração das células atraídas por essa quimiocina para o local de picada do carrapato. Constantinoiu *et al.* (2010) verificaram infiltração maciça de granulócitos (mais provavelmente neutrófilos) para a pele nos animais susceptíveis.

Como revisto por Brossard e Wikel (2004), as salivas de várias espécies de carrapato possuem a habilidade de inibir a expressão do fator de necrose tumoral alpha (TNF $\alpha$ ) dentre outras citocinas. Não foi observada, neste experimento, alteração na expressão de TNF $\alpha$  no sangue dos animais, o que pode indicar que esta citocina pró-inflamatória não tenha sido importante no processo de resposta imune nesta infestação.

É possível que, nos animais resistentes, uma regulação de uma resposta imune, realizada pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  por ação principalmente de IL10 impeça um fenômeno inflamatório exacerbado que aumente o influxo de líquidos para o local da picada do parasito, diminuindo assim sua fonte de alimentação.

## **5. Experimento 2:**

**Genômica funcional na pele de bovinos cruzados (Gir x Holandes)  
infestados com *Rhipicephalus microplus***

## 5.1. Introdução

O carrapato de gado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas severas em empreendimentos de gado e leite nos trópicos (JONSSON, 2006). Os principais impactos econômicos dos carrapatos são os custos envolvidos com o controle parasitário, juntamente com as perdas na fertilidade, peso corporal e produção de leite.

Atualmente, as estratégias de controle ao carrapato são baseadas em acaricidas químicos (GEORGE *et al.*, 2004). Porém, métodos alternativos estão sendo estudados para permitir um controle mais eficiente (SONESHINE *et al.*, 2006). Para o desenvolvimento destes, maior conhecimento sobre a relação parasito-hospedeiro é necessário para o desenvolvimento dos novos métodos de controle do carrapato (RECK JR *et al.* 2009).

Geralmente, animais de raça zebuína são mais resistentes ao carrapato que animais da raça taurina, embora consideráveis variações em resistência ocorram entre e dentro das raças. (SEIFERT, 1971). A variação genética para resistência ao carrapato resulta de diferenças em uma variedade de mecanismos que não são completamente compreendidos, mas o envolvimento de genes relacionados ao sistema imunológico em muitos desses mecanismos é inegável (REGITANO e PRAYAGA, 2010).

Com intuito de entender melhor os processos de resposta imunológica na pele dos bovinos que resultam em diferentes níveis de resistência ao carrapato, pesquisadores têm utilizado técnicas de estudo de expressão gênica através da construção de bibliotecas de cDNA, RT-PCR em tempo real e hibridização em chips de microarranjo.

De forma geral, para estudar a modificação na expressão gênica na pele dos bovinos após a infestação, os estudos, até o momento, basearam na comparação entre a expressão gênica existente no local da fixação do carrapato, principalmente 24 horas após o evento, com a expressão em local não infestado (PIPER *et al.*, 2008) ou na mesma região do corpo momentos antes da infestação (BAGNALL *et al.*, 2009).

Para tentar diferenciar a resposta dos animais resistentes e susceptíveis, são utilizados animais com diferentes níveis de resistência ao carrapato. Seja comparando animais zebuínos com taurinos (PIPER *et al.*, 2010) ou comparando animais extremos dentro da mesma raça (WANG *et al.*, 2007).

Este capítulo se diferencia dos outros trabalhos publicados por usar animais extremos de resistência e susceptibilidade ao carrapato dentro de uma população de bovinos F2 provenientes de cruzamento entre uma raça taurina (holandesa) e zebuína (Gir). Assim, evita-se encontrar diferença de expressão em genes não relacionados com a resposta ao carrapato e sim com características inerentes às raças, e, também, possibilita entender as diferenças entre raças naturalmente resistentes e susceptíveis ao carrapato bovino.

## 5.2. Objetivos

- Estudar a mudança na expressão gênica global na pele de bovinos ao decorrer das primeiras 48 horas após infestação artificial com o carrapato *Rhipicephalus microplus*.
- Comparar a expressão gênica entre bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato.
- Enumerar genes candidatos a estarem relacionados com a resistência ao carrapato bovino.



## 5.3. Metodologia

### 5.3.1. Animais experimentais, infestação e coleta das amostras.

Os animais experimentais utilizados foram os mesmos utilizados no experimento do capítulo anterior, e estes sofreram novo processo de desinfestação e infestação artificial com carrapatos *Rhipicephalus microplus* da mesma forma realizada anteriormente.

Para a realização deste experimento foram realizadas biópsias de pele antes da infestação, 24 e 48 horas após a infestação. As biópsias de pele, de oito mm de diâmetro, foram realizadas na região da garupa do animal. Para a conservação do RNA intacto, as biópsias 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.

A partir das amostras de pele dos animais foi realizada a análise do transcriptoma de pele de animais submetidos à infestação com *Rhipicephalus microplus* por *microarray*. Este experimento consistiu nos passos extração de RNA das amostras de pele, preparo, hibridização e leitura dos chips de *microarray*, análise da qualidade dos chips, análise estatística e validação da expressão diferencial de alguns genes por qRT-PCR.

Também foi analisada por qRT-PCR a expressão de alguns genes candidatos, possivelmente relacionados com a resposta imune e resistência ao carrapato.

### 5.3.2. Extração de RNA das amostras de pele

A amostra de tecido (pele) foi removida do RNAlater e o excesso de líquido drenado. Dela foi retirado e descartado o couro e, com o restante da amostra, o RNA

total foi extraído utilizando protocolo com trituração e homogeneização das amostras em TRIzol® (Invitrogen™), com o auxílio do equipamento *Tissue Ruptor* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), e purificação do RNA com o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante.

A quantidade, pureza e integridade das amostras de RNA foram avaliadas por nanoespectrofotometria e eletroforese capilar da mesma forma com que foram as amostras de RNA total de sangue periférico do capítulo anterior.

### **5.3.3. Preparo, hibridização e leitura dos chips**

Alíquotas de RNA total quantificado e avaliado quanto à integridade foram enviadas em gelo seco a empresa especializada contratada para a confecção dos *arrays*.

Todo o experimento de microarranjo foi realizado com plataformas e kits da Affymetrix. O chip utilizado na hibridização foi o *GeneChip® Bovine Genome Array* (Affymetrix, Inc), o qual é adequado para analisar a expressão de cerca de 23.000 transcritos bovinos.

Do preparo das amostras até a leitura dos chips de microarranjo, foram realizados os seguintes passos (Figura 9):

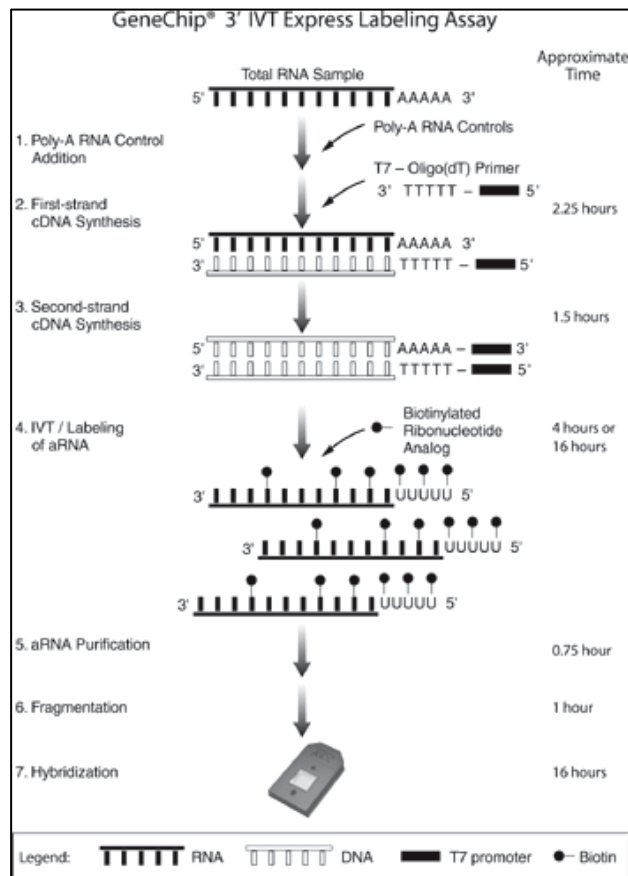


Figura 9: Esquema dos passos realizados do preparo da amostra de RNA até a hibridização no chip, utilizando o kit 3' IVT Express.

a) Amplificação: A amplificação foi realizada utilizando o kit 3' IVT Express (Affymetrix). Foram usados 50ng de RNA total, ao qual foram adicionados 2uL de *poly-A* RNA. A síntese de cDNA primeira fita foi realizada a 42°C por 2 horas após a adição de 5uL da mistura de tampão e enzimas para síntese de primeira fita (*First-Strand Master Mix*). A segunda fita de cDNA foi sintetizada durante 1 hora a 16°C após adição de 20uL da mistura de tampão e enzimas para a segunda fita (*Second-strand Master Mix*). Então, a reação foi submetida à temperatura de 65°C por 10 minutos e, em seguida, a transcrição *in vitro* (onde ocorre a amplificação da quantidade de RNA inicial) e a marcação do RNA amplificado (RNAa) com biotina foi realizada adicionando 30uL de mistura de nucleotídeos biotinilados (*IVT Biotin*

*Label*), tampão de marcação (*IVT Labeling Buffer*) e enzimas (*IVT Enzyme Mix*), sendo que a reação foi incubada a 40°C por 16 horas.

b) Purificação do RNA amplificado: O RNAa foi purificado utilizando uma placa magnética (*Applied Biosystems*). Foram utilizados 60uL de RNAa ao qual foram adicionados 60uL de tampão contendo as partículas magnéticas para a purificação do RNAa (*aRNA Binding Mix*). Após os 120uL terem sido transferidos para uma placa plástica de 96 poços, 120uL de etanol absoluto foram misturados a cada amostra e, em seguida, a placa foi colocada em contato com a placa magnética por 5 minutos. O sobrenadante foi removido de cada poço, cuidadosamente, evitando a remoção do RNAa capturado no fundo do poço devido a ação magnética. Após duas lavagens com o tampão apropriado (*aRNA Wash Solution*), o RNAa foi eluído utilizando 50uL de tampão de eluição (*aRNA Wash Solution*), previamente aquecido a 50°C por 10 minutos.

c) Fragmentação e hibridização das amostras: A fragmentação das amostras foi realizada pela adição de 8uL de tampão de fragmentação 5X(*5X Array Fragmentation Buffer*) a 32uL do RNAa purificado (cerca de 15ug). Este volume total de 40uL foi incubado a 94°C por 35 minutos. Foram utilizados 33,3uL de RNAa fragmentado no preparo para a hibridização, ao qual foram adicionados 4,2uL de *Oligo B2*, 12,5uL de *20X Hybridization Controls*, 125uL de *2X Hybridization Mix*, 25uL de DMSO e 50uL de água nuclease free totalizando em volume final 250uL. Todo o volume das amostras (250uL) foi aplicado sobre os *Genechip Bovine Genome Arrays* e a hibridização ocorreu por 16horas à 45°C e 60rpm no forno de hibridização *GeneChip Hybridization Oven*.

d) Lavagem dos GeneChips: Em seguida à reação de hibridização, os *GeneChips* foram colocados no aparelho *Fuidcs Station 450*, no qual foram submetidos à lavagem e incubados em solução contendo estreptavidina conjugada com ficoeritrina (*Streptavidin-Phycoerythrin* – SAPE), fluorocromo utilizado para posterior captura e digitalização da intensidade de sinal. Primeiramente, os *arrays* foram submetidos a 10 ciclos de lavagem a 25°C com tampão não estrigente (6X *SSPE*, 0,01% *Tween-20*) e 8 ciclos de lavagem a 50°C com tampão estrigente

(100mM MES, 0,1M [Na<sup>+</sup>], 0,01% *Tween-20*). Em seguida, foram deixados por 10 minutos a 25°C em solução SAPE (*Streptavidin - Phcoerythrin*), constituída de 600uL de *Stain Buffer* (2X); 48uL de BSA (50mg/mL); SAPE (1mg/mL) e 540ul de água deionizada. Após nova lavagem de 10 ciclos com tampão não estrigente a 30°C, os *GeneChips* foram incubados por 10 minutos em solução contendo anticorpo (300uL de *Stain Buffer* 2X; 24uL de BSA (50mg/mL); 6uL de *Goat IgG Stock* 10mg/mL; 3,6uL de anticorpo biotilado 0,5mg/mL e 266,4uL de água deionizada) e submetidos à segunda etapa de incubação em solução SAPE por 10 minutos a 25°C. A lavagem final consistiu em 35 ciclos a 35°C utilizando o tampão não estrigente.

e) Obtenção dos dados: A captura das imagens correspondentes à intensidade de sinal da hibridização foi realizada pelo aparelho *GeneChip Scanner 3000 7G*, operado com o auxílio do software *GeneChip® Command Console*. O software *Expression Console*<sup>TM</sup> (Affymetrix) foi utilizado para a determinação da qualidade da hibridização.

#### **5.3.4. Análise de qualidade dos chips de *microarray***

Todas as medidas de controle de qualidade, pré-processamento e análises estatísticas foram feitas usando a linguagem estatística computacional R utilizando o projeto *Bioconductor* (GAUTIER et al., 2004). As medidas de controle de qualidade utilizadas foram as pertencentes aos pacotes *affy*, *simpleaffy* e *affQCReport*.

A função *QCReport*, do pacote *affQCReport*, com auxílio dos funções dos pacotes *affy* e *simpleaffy*, possibilita a geração de vários gráficos de controle de qualidade, sendo estes importantes para a escolha dos chips a serem considerados nas análises de expressão gênica:

O primeiro gráfico é um boxplot de todas as intensidades de sinal PM (*perfect match*) nos chips (Figura 10) e o segundo consiste de estimação da densidade central dessas intensidades (Figura 11). Esses dois métodos, definidos no pacote *affy* são úteis para acessar a qualidade do sinal geral dos arrays e, qualquer array

com uma intensidade ou formato da densidade diferentes dos demais deve ser considerado com qualidade suspeita.

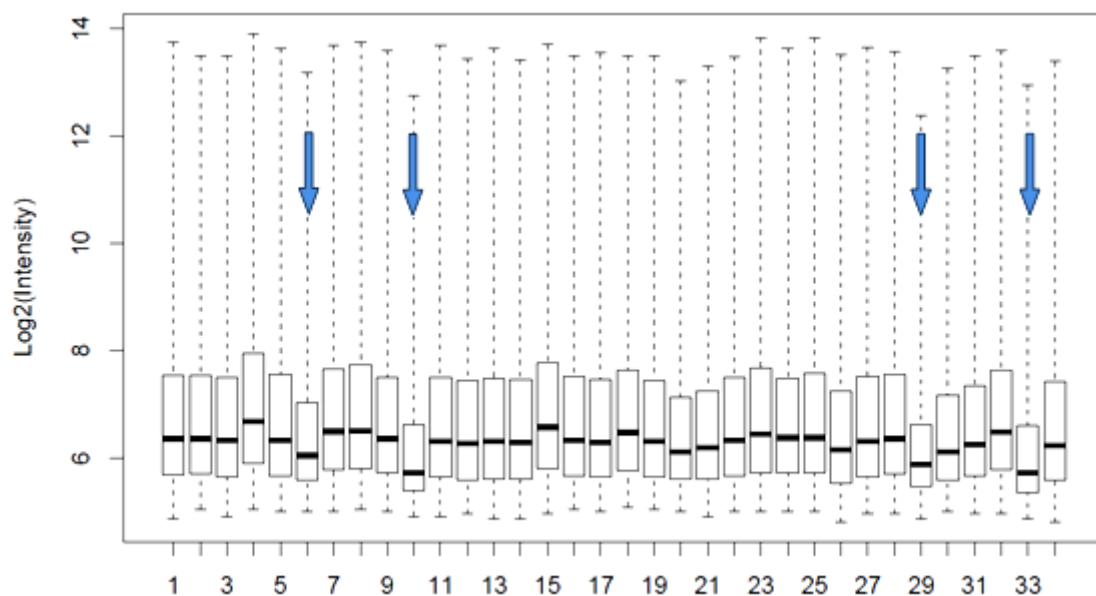


Figura 10: Gráfico demonstrando a intensidade de fluorescência das sondas PM de todos os chips hibridizados. As setas azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.

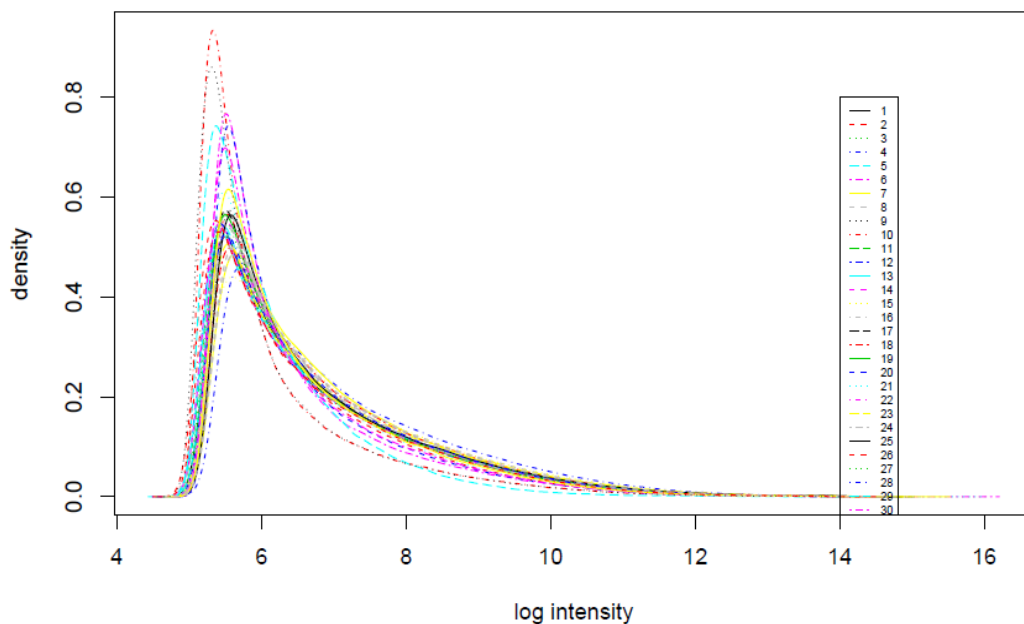


Figura 11: Gráfico da estimação central da densidade de fluorescência das sondas PM de todos os chips hibridizados.

Um outro gráfico gerado, de grande importância para o controle da qualidade dos chips, consiste na plotagem da razão 3':5' (razão da intensidade de sinal entre sondas das extremidades 3' e 5' do RNA) para os genes GAPDH (círculos) e  $\beta$ -actina (triângulos), fatores de escala, porcentagem de presentes e valor médio de *background* (Figura 12). O valor da razão 3':5' para o gene GAPDH deve ser próximo de 1, e para o gene  $\beta$ -actina, por ser um gene maior, é recomendado que esteja abaixo de 3. Valores dentro do indicado são desenhados em azul, e acima do indicado são desenhados em vermelho. Os fatores de escala são plotados como uma linha a partir da linha central da imagem. Uma linha para a esquerda corresponde a um *down-scaling* e, à direita, a um *up-scaling*. É recomendável que estes valores estejam dentro de 3 vezes a média para todos os chips, caso algum *array* esteja fora desse valor, todas as linhas são plotadas em vermelho, caso contrário são plotadas em azul. Por fim, ao lado do nome dos chips são escritos as porcentagens de presentes (acima) e os valores de *background* (abaixo). Caso ocorra diferença maior que 10% na porcentagem de presentes entre os chips, ou valores de *background* maiores que 150, o valor de todos os chips são escritos em vermelho, respectivamente.

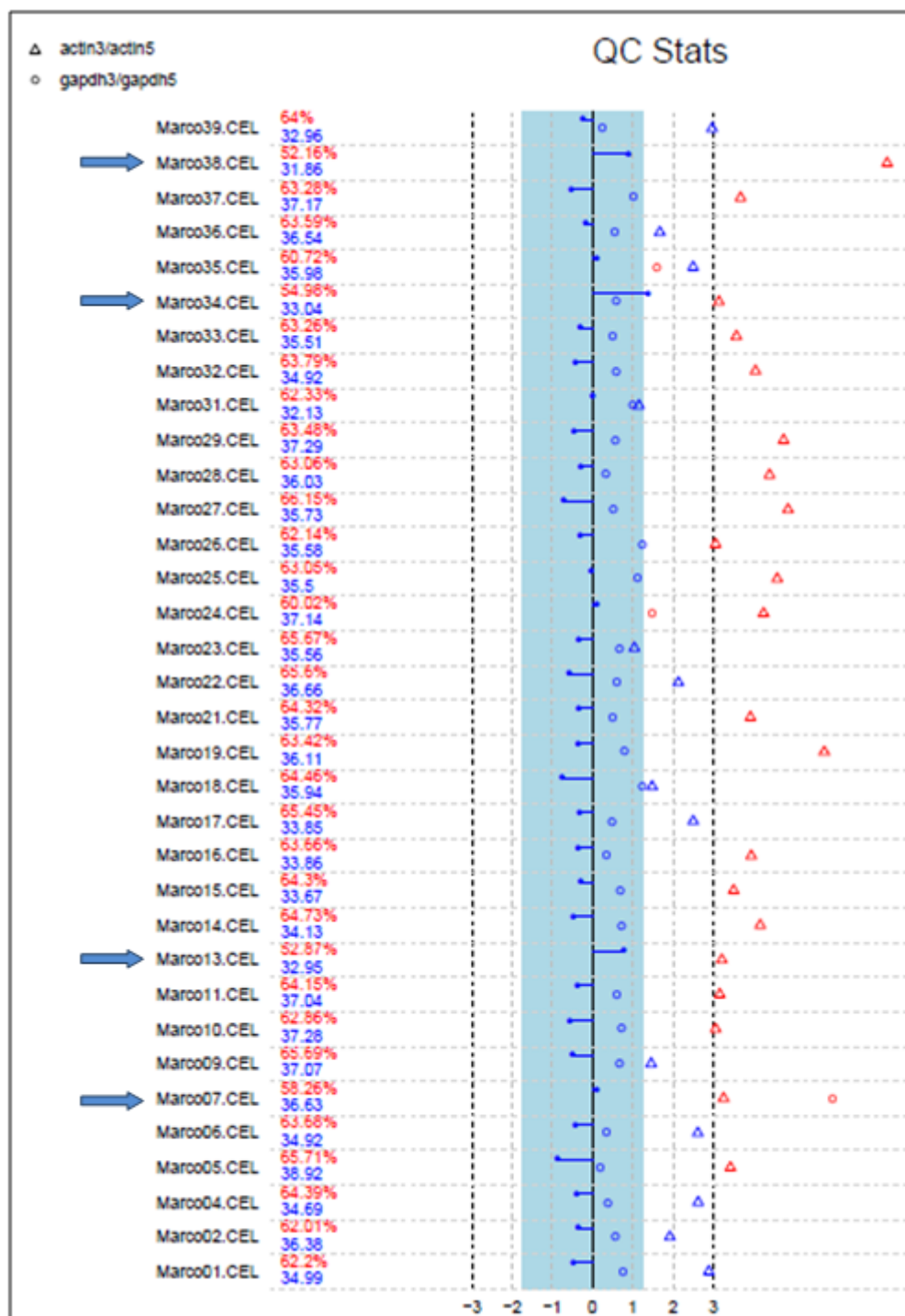


Figura 12: Gráfico demonstrando integridade dos genes GAPDH e  $\beta$ -actina, fatores de escala, porcentagem de presentes e valor médio de *background* para todos os chips hibridizados. As setas azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.



Para todos os *arrays*, as intensidades de todas os elementos de bordas são coletados. Elementos com uma intensidade maior que 1,2 vezes da média para o grupo são considerados como controle positivos. Elementos com um sinal menor que 0,8 vezes a média são considerados controles negativos. Como esse método de separação em controles positivos e negativos é utilizado, não é requerido o detalhamento exato do arranjo desses elementos no *array*. Elementos de borda que não possam ser considerados positivos nem negativos, não são usados nos próximos cálculos. Dois outros gráficos são gerados com base nesses elementos de controle positivos e negativos (Figura 13). Eles consistem em box plots da intensidade dos elementos positivos e negativos, respectivamente. As médias e os desvios padrão das intensidades de cada *array* devem ser comparados. Grandes variações nos controles positivos podem indicar uma hibridização não uniforme ou problemas na fabricação do *array*. Variações nos controles negativos indicam flutuações de *background*.

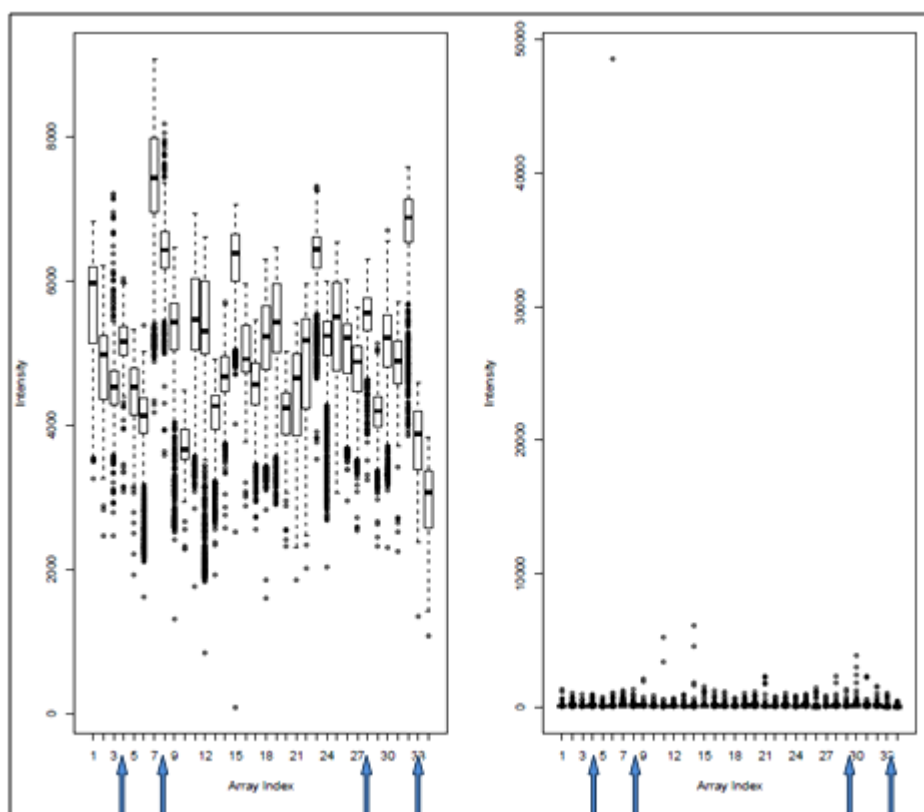


Figura 13: *Box plots* da intensidade de fluorescência dos elementos positivos (esquerda) e negativos (direita), de todos os chips hibridizados. As setas azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.

Por fim, é gerado um gráfico *heat map* dos coeficientes de correlação do ranking de Spearman de *array-array* (Figura 14). Este gráfico é útil para detectar *outliers* e falhas de hibridização. Dados de tecidos biológicos e/ou tratamento experimentais similares tendem a possuir coeficientes altos.

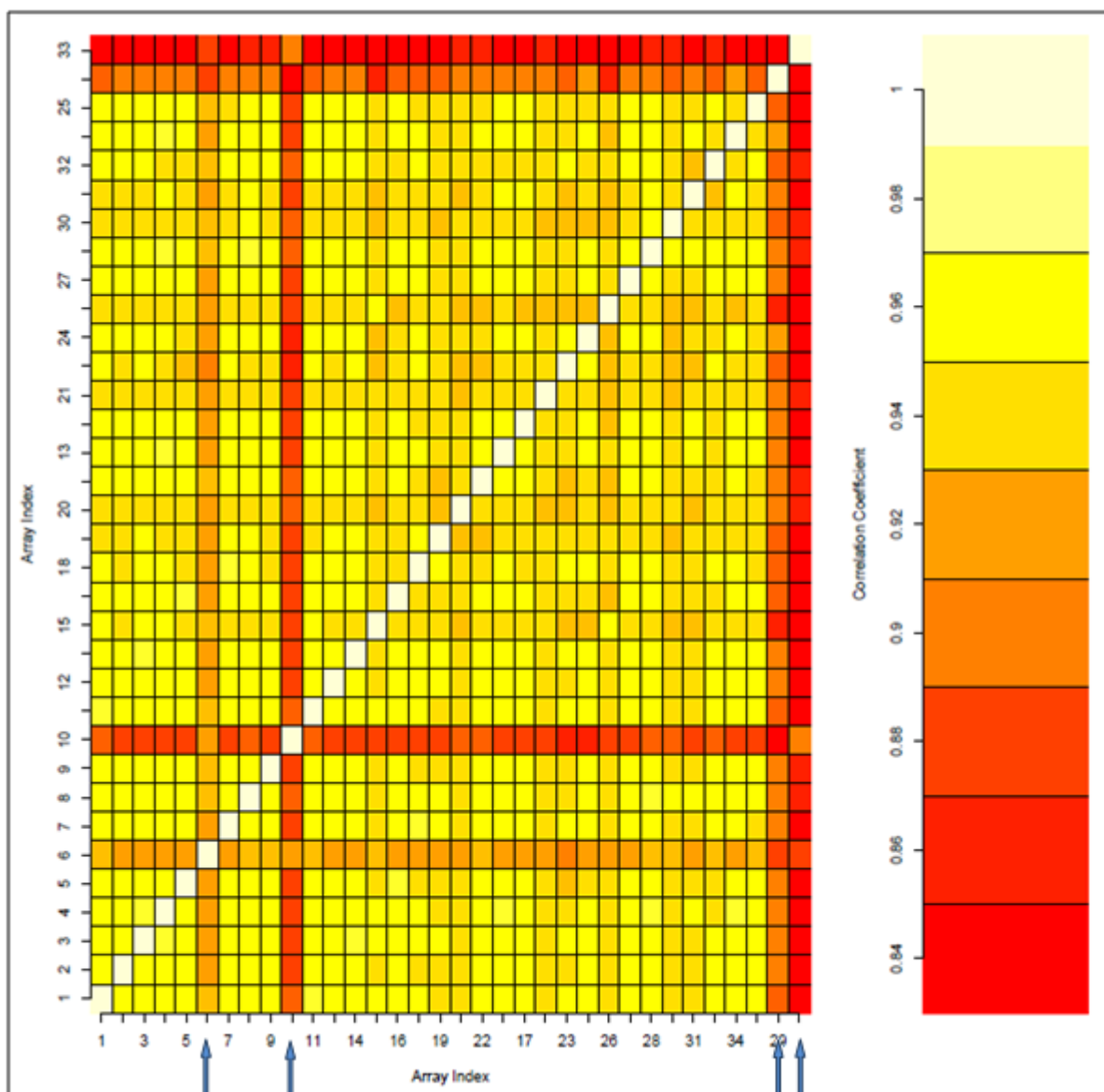


Figura 14: Gráfico *heat map* dos coeficientes de correlação do ranking de Spearman *array-array*, de todos os chips hibridizados. As setas azuis indicam os chips eliminados após a realização do controle de qualidade.

### 5.3.5. Análise estatística dos dados de *microarray*

Para cada um dos nove contrastes analisados, com os *arrays* pertencentes a este, foi realizado o pré-processamento dos dados e análise de diferença de expressão, gerando uma lista de genes diferencialmente expressos (DEGs).

Primeiramente, os dados sofreram pré-processamento (transformação, correção de *background* e sumarização) por três diferentes métodos: MAS5.0, RMA e GCRMA.

Cada um dos três diferentes métodos de pré-processamento utilizados gerou, após análise de regressão linear utilizando o pacote *limma*, uma lista dos genes com seus respectivos valores de diferença de expressão e valor p. Dentro de cada lista, somente foi considerado significativo os genes que tiveram valor de expressão diferencial de pelo menos 2 (para mais ou para menos) e apresentaram valor  $p < 0,01$ . Uma vez selecionados os genes com diferença de expressão significativa para cada um dos métodos, somente foi considerado genes diferencialmente expressos (DEGs) no contraste, aqueles que estavam presentes em pelo menos duas das três listas geradas.

Os DEGs foram anotados de acordo com a respectiva função descrita no *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), onde foram analisados e agrupados no contexto de ontologia gênica por processo biológico (*Gene Ontology – Biological Process*) e implicação nas vias metabólicas na *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (*KEGG pathway*).

### 5.3.6. Validação do microarranjo por qRT-PCR

Seis genes que apresentaram diferença significativa de expressão (DEGs) no experimento de microarranjo foram selecionados para a validação da técnica de microarranjo por qRT-PCR. Adicionalmente, foi estudada em todos os 9 contrastes, a expressão diferencial de seis genes que apresentaram diferença de expressão no

capítulo anterior ou apresentaram diferença de expressão na pele mas não foram selecionados como DEGs por apresentarem diferença de expressão menor que 2 ou por apresentarem valor  $p$  não altamente significativos ( $0,01 < p < 0,05$ ).

Para as reações de qRT-PCR, foram realizados os mesmos processos de transcrição reversa, teste de amplificação dos primers, padronização das reações de qRT-PCR com cálculo de eficiência, amplificação das amostras e análises estatísticas usados no experimento de expressão gênica no sangue. As *primers* e as condições de amplificação de cada um dos genes estão descritos na tabela 7.

Como diferencial neste experimento, devido a maior quantidade de RNA extraído, foi possível testar alguns genes comumente utilizados como controles endógenos (de expressão constitutiva) para selecionar aqueles que seriam utilizados para a normalização dos dados.

Os genes de referência ou controle endógenos comumente utilizados são, principalmente, os codificadores de proteínas responsáveis pela manutenção das estruturas e metabolismo básicos da célula e, não devem variar sua expressão nos tecidos, células, mudanças no meio ambiente e sob os diferentes tratamentos em um experimento. Porém, a estabilidade desses genes pode variar consideravelmente e diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de escolher o gene mais adequado para cada experimento (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2004; PFAFFL *et al.*, 2004). Chernoveva *et al.* (2010), indicaram que para compensar a variação experimental deve ser usada a média geométrica da expressão de pelo menos dois genes com a menor variabilidade dentre os genes candidatos a possuírem expressão constitutiva.

*GeNorm* é uma ferramenta aplicada no Microsoft Excel, sendo a mais utilizada entre as ferramentas disponíveis (VANDESOMPELE *et al.*, 2009). Este programa determina os genes de expressão constitutiva (*housekeeping genes*) mais estáveis de um conjunto de genes testados. Para todos os genes, é calculada a variação aos pares, analisando a variação da expressão dois a dois de todas as possíveis combinações gênicas. A estabilidade do gene é dada por um valor de estabilidade  $M$ , o qual é inversamente proporcional a variação de expressão do gene avaliado (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Para escolha dos melhores controles endógenos, foram testados os genes GAPDH (LEUTENEGGER *et al.*, 2000),  $\beta$ -actina (ROBINSON *et al.*, 2007),

Ubiquitina (SWANSON *et al.*, 2004), RPLP0 (ROBINSON *et al.*, 2007) e HPRT (COUSSENS e NOBIS, 2002). Os dois melhores controles endógenos (GAPDH e HPRT) foram selecionados de acordo com o perfil das curvas de amplificação e dissociação, além de serem analisados no software *geNorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Como forma de avaliar a validação da técnica de microarranjo por qRT-PCR, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ( $\rho$ ) entre os valores de razão de expressão (*fold change*) obtidos no experimento de microarranjo e os obtidos por qRT-PCR. Este coeficiente mede o grau da correlação entre duas variáveis de escala métrica e os valores deste coeficiente variam entre -1 e 1. Valores próximos a 1 indicam correlação positiva entre as duas variáveis. Foram calculadas as correlações entre os valores de razão de expressão obtidos em cada um dos métodos de pré-processamento dos dados de microarranjo e os valores obtidos por qRT-PCR. Ainda, foram calculados valores médios de razão de expressão para cada um dos DGEs encontrados nos contrastes e, com estes valores médios também foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson com os dados de qRT-PCR.

## 5.4. Resultados

De modo geral, a partir do protocolo utilizado para a extração do RNA total das biópsias de pele, foram obtidas amostras de RNA com quantidade satisfatória para a realização dos experimentos, com boa qualidade de pureza e integridade (Figura 15). Das 39 amostras extraídas, 34 possibilitaram a hibridização nos chips de microarray, tendo as outras cinco qualidade e quantidade de RNA inferiores às demais.

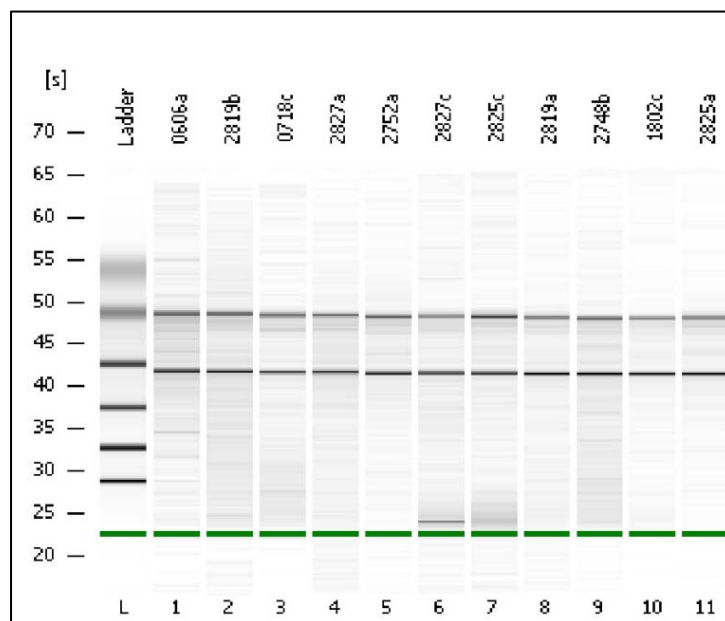


Figura 15: Gráfico gerado pelo equipamento 2100 Bioanalyzer para a avaliação da integridade de algumas das amostras de RNA total extraídas.

Dentre os 34 chips hibridizados, 4 foram eliminados das análises por apresentarem parâmetros de qualidade destoantes dos demais (indicados por setas azuis nas figuras 10, 12, 13 e 14). Os 30 chips restantes, utilizados nas análises estatísticas, apresentaram padrão uniforme de integridade do RNA, valor de *background*, intensidade média de fluorescência e correlação entre os chips.

Tabela 7: Lista dos genes analisados por qRT-PCR, com a sequência dos primers, o artigo de referência ou o número de acesso a sequência no NCBI, as condições de amplificação utilizadas e as eficiências de amplificação apresentadas.

| Nome <sup>a</sup> | Primers                                                           | Referência / N° Acesso           | cDNA (ng) | primer(μM) | Ef REST | Ef LinReg |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|------------|---------|-----------|
| CCL 16            | F: 5' GGCAACCTTGTGGTCTGAAT 3'<br>R: 5' TGTGCTGAGCGTTAAGGATG 3'    | XM_868834                        | 2         | 0,2        | 1,059   | 1,966     |
| CD25              | F: 5' TGCTAAGAGCATCCCGACTT 3'<br>R: 5' TAGCTTGGAGGACTGGGCTA 3'    | Piper <i>et al.</i> , 2009       | 4         | 0,2        | 1,126   | 1,987     |
| CFB               | F: 5' CACCCTGCAGACTCAAGACA 3'<br>R: 5' CAGAGCCCCGAAGAGTGTAG 3'    | NM_001040526                     | 4         | 0,1        | 1,014   | 1,956     |
| CFP               | F: 5' CGCCCAAGCATTAAACAGAT 3'<br>R: 5' GTACTCCACTCCGACCAGGA 3'    | NM_001076178                     | 2         | 0,2        | 1,013   | 1,925     |
| CLDN              | F: 5' CCGTTGGCATGAAGTGTATG 3'<br>R: 5' AAGGCAGAGAGAAGCAGCAG 3'    | AB178476                         | 4         | 0,2        | 1,072   | 1,990     |
| CXCL10            | F: 5' AGTGGAAGCCCCTGCAGTAAA 3'<br>R: 5' AGTCCCAGCCTTGCTACTGACA 3' | Kongsuwan <i>et al.</i> , 2008   | 4         | 0,2        | 0,864   | 1,949     |
| CXCL16            | F: 5' CCTCTGGAAGGAGCACTGTC 3'<br>R: 5' ATGAAAACGATGGCCAAGAG 3'    | NM_001046095                     | 2         | 0,2        | 0,982   | 1,928     |
| FoxP3             | F: 5' AAGAGCCCAGGGACAACCTTTC 3'<br>R: 5' GGGTTCAAGGAGGAAGAGGAA 3' | Seo <i>et al.</i> , 2007         | 4         | 0,1        | 1,282   | 1,993     |
| GAPDH             | F: 5' GCGGTGAACCACGAGAAGTATAA 3'<br>R: 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT 3'  | Leutenegger <i>et al.</i> , 2000 | 2         | 0,2        | 0,983   | 1,971     |
| HPRT              | F: 5' GCCGACCTGTTGGATTACAT 3'<br>R: 5' AACTTCGAGGGGTCCTTTT 3'     | Tao <i>et al.</i> , 2004         | 4         | 0,2        | 0,949   | 1,957     |
| IL10              | F: 5' CCAAGCCTTGTCGGAAATGA 3'<br>R: 5' GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA 3'  | Moussay <i>et al.</i> , 2006     | 8         | 0,1        | 1,07    | 1,964     |

|                |                                                                 |                               |   |     |       |       |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|---|-----|-------|-------|
| IL10Rb         | F: 5' CTACTGCTCGGCTGCTTCTT 3'<br>R: 5' TTCAGCTTGCAGCTTTCAGA 3'  | BC123561                      | 2 | 0,2 | 0,786 | 1,884 |
| Regakine       | F: 5' CGAGATTTCAAGGAGCCAGA 3'<br>R: 5' CTTGTCACCGGTCCTTTCAT 3'  | NM_001034220                  | 4 | 0,2 | 1,031 | 1,988 |
| RPLP0          | F: 5' CAACCCTGAAGTGCTTGACAT 3'<br>R: 5' AGGCAGATGGATCAGCCA 3'   | Robinson <i>et al.</i> , 2007 | 4 | 0,1 | 0,883 | 1,896 |
| TLR-2          | F: 5' GGCAACAGAGACCTGCAGAG 3'<br>R: 5' ACTTTCATCGGTGAATTGCAC 3' | McGuire <i>et al.</i> , 2006  | 4 | 0,2 | 0,804 | 1,912 |
| Ubiquitina     | F: 5' GGCAAGACCATCACCTGGAA 3'<br>R: 5' GCCACCCCTCAGACGAAGGA 3'  | Swanson <i>et al.</i> , 2004  | 2 | 0,2 | 0,990 | 1,954 |
| $\beta$ Actina | F: 5' AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT 3'<br>R: 5' ATCCAACCGACTGCTGTCA 3' | Robinson <i>et al.</i> , 2007 | 2 | 0,2 | 0,957 | 1,934 |

<sup>a</sup> CCL16, C-C motif chemokine ligand 16; CD25, alpha chain of the IL2 receptor (IL2R $\alpha$ ); CFB, complement factor B; CFP, complement factor P (Properdin); CLDN, claudin-1; CXCL10, C-X-C motif chemokine ligand 10; CXCL16, C-X-C motif chemokine ligand 16; FoxP3, forkhead box P3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IL10, interleukin 10; IL10Rb, interleukin 10 receptor  $\beta$  (Phycoerythrin); Regakine, regakine-1; RPLP0, 60S acidic ribosomal protein P0; TLR-2, Toll-like receptor 2, Ubiquitina, ubiquitin;  $\beta$  Actina,  $\beta$ -actin. Ef REST, eficiência calculada pelo programa REST; Ef LinReg, eficiência calculada pelo programa LinRegPCR;



Tabela 8: Transcritos diferencialmente expressos por método de pré-processamento em cada um dos contrastes analisados.

| Método <sup>a</sup>           | R0xR24 | R0xR48 | R24xR48 | S0xS24 | S0xS48 | S24xS48 | R0xS0 | R24xS24 | R48xS48 | Total |
|-------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|-------|---------|---------|-------|
| <b>RMA</b>                    | 8      | 35     | 22      | 4      | 3      | 1       | 28    | 13      | 58      | 172   |
| <b>GCRMA</b>                  | 7      | 47     | 31      | 2      | 2      | 0       | 29    | 10      | 35      | 163   |
| <b>MAS5.0</b>                 | 115    | 150    | 108     | 107    | 125    | 86      | 190   | 99      | 180     | 1160  |
| <b>Interseção<sup>b</sup></b> | 6      | 26     | 19      | 2      | 0      | 1       | 25    | 11      | 34      | 124   |

<sup>a</sup> Método de pré-processamento utilizado. <sup>b</sup> Transcritos que foram identificados como diferencialmente expressos em pelo menos dois dos três métodos utilizados.

A tabela 8 mostra, para cada um dos contrastes analisados, o número de transcritos detectados como diferencialmente expressos com base em cada um dos três métodos de pré-processamento utilizados. Pode-se notar que o método que apresentou mais transcritos diferencialmente expressos, em todos os contrastes, foi o MAS5.0.

Analisando os transcritos considerados com diferença de expressão significativa no experimento, presentes na interseção de pelo menos dois dos três métodos de pré-processamento, foram encontrados 124 sondas (Anexo 1), sendo 59 detectadas nos três métodos (Figura 16). Destas, 114 correspondem a diferentes transcritos e 81 são referentes a genes já conhecidos.

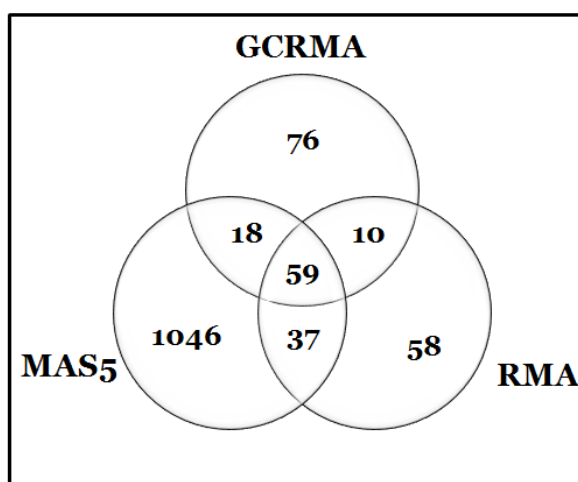


Figura 16: Transcritos diferencialmente expressos em cada um dos métodos de pré-processamento, denotando a interseção entre os mesmos.

A grande maioria dos transcritos diferencialmente expressos foi encontrada em contrastes que relacionam os animais resistentes, seja comparando entre os tempos em relação ao momento da infestação ou comparando com o grupo de animais susceptíveis (Tabela 8).

Os principais processos biológicos e vias metabólicas representados entre os genes diferencialmente expressos nos animais resistentes ao decorrer do tempo foram: cascatas de complemento e coagulação ( $p = 3,90E-07$ ) e resposta à injúria ( $p = 2,10E-$

05). Já nos animais susceptíveis, não foi possível relacionar os processos devido ao pequeno número de genes diferencialmente expressos encontrados.

Quando relacionados os genes diferencialmente expressos nos contrastes analisados que compararam os grupos de animais resistentes com os grupos de animais susceptíveis nos mesmos tempos, os principais processos biológicos, vias metabólicas e componentes celulares representados foram: resposta imune ( $p = 9,60E-10$ ), resposta inflamatória ( $p = 9,10E-07$ ), regulação positiva de resposta imune adaptativa ( $p = 2,60E-05$ ) e região extracelular ( $p = 5,50E-04$ ).

Como pode ser observado na figura 17, dentre os genes testados para a escolha dos melhores controles endógenos, os genes HPRT e GAPDH foram os que apresentaram menor valor M, sendo então utilizados para a normalização dos dados de qRT-PCR.

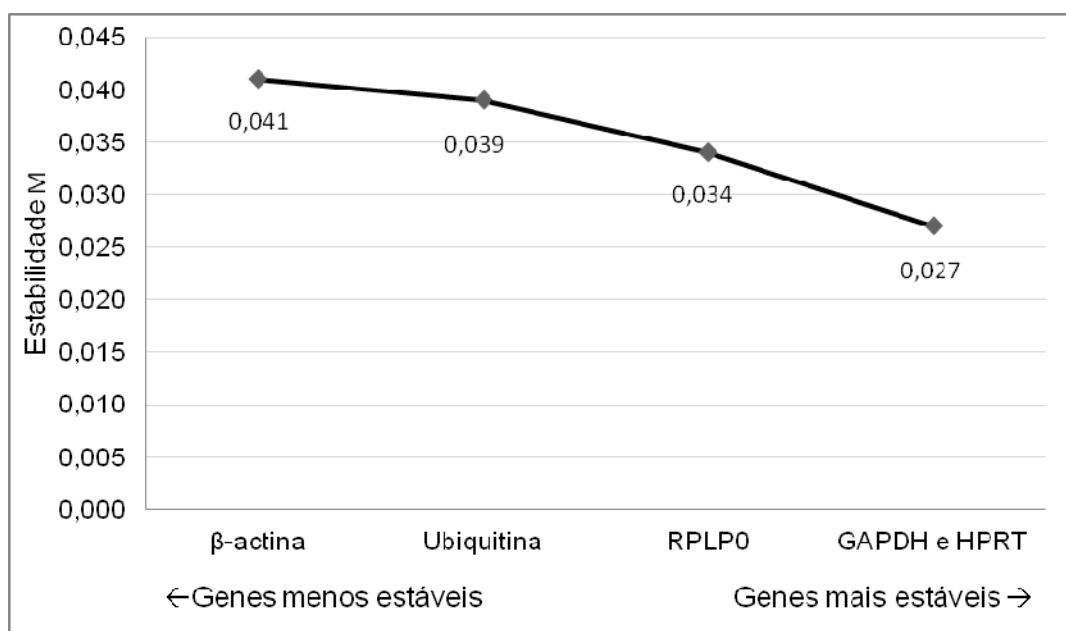


Figura 17: Gráfico da estimação da estabilidade M dos cinco genes testados para melhores controles endógeno, onde, os genes de menores valores de M são os mais indicados.

Analisando a expressão dos genes utilizados na validação do *microarray* por qRT-PCR, todos apresentaram diferença significativa de expressão de acordo aquelas encontradas nas análises de *microarray* (Figuras 18, 19 e 20). Devido a técnica de qRT-PCR ser mais sensível à diferenças de expressão, alguns genes foram diferencialmente expressos em contrastes além daqueles encontrados nas análises de *microarray*.

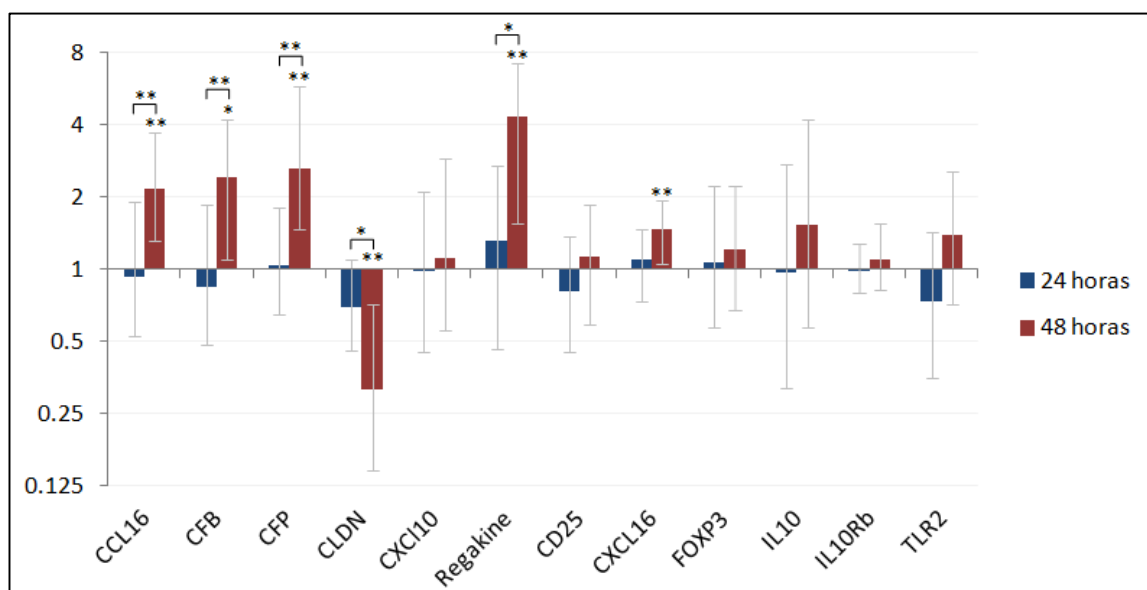


Figura 18: Gráfico da razão de expressão gênica nos animais resistentes após a infestação em relação a antes da infestação. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

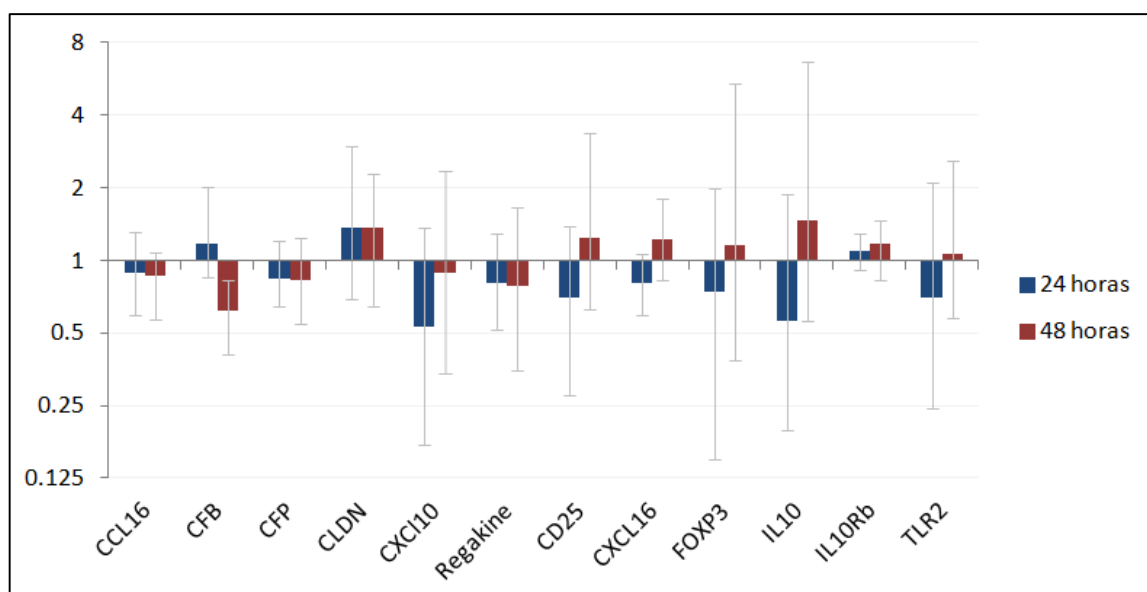


Figura 19: Gráfico da razão de expressão gênica nos animais susceptíveis após a infestação em relação a antes da infestação.

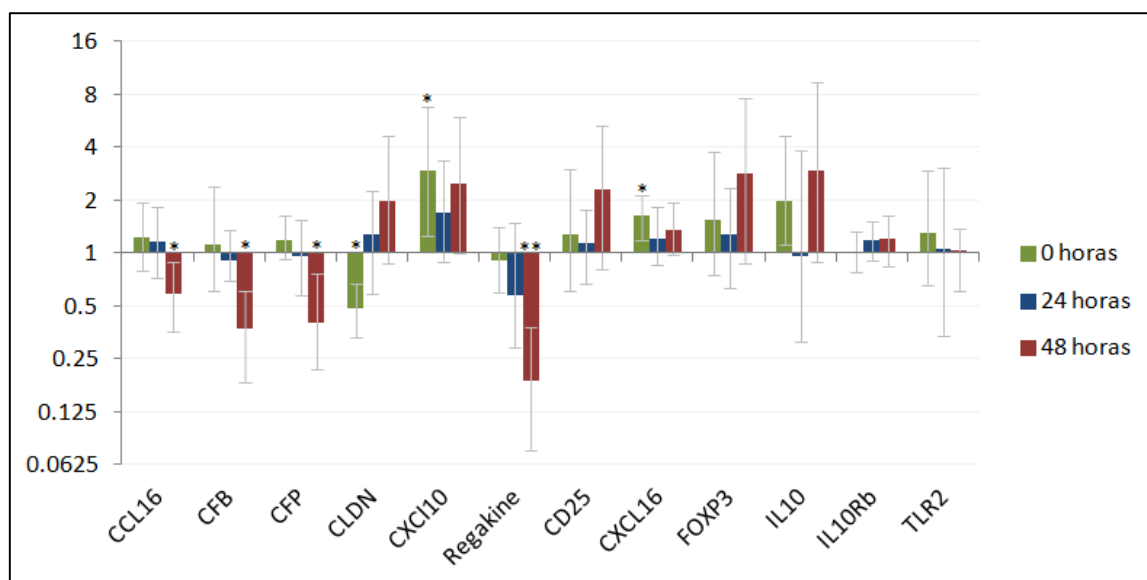


Figura 20: Gráfico da razão da expressão gênica dos animais susceptíveis em relação aos animais resistentes nos diferentes tempos analisados. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

Avaliando a correlação entre os valores de razão de expressão encontrados nos diferentes métodos de pré-processamento de microarranjo e os encontrados nas análises de qRT-PCR pelo coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 9), foi observado alta correlação entre os valores médios dos três métodos e os valores de qRT-PCR ( $\rho = 0,915$ ). Dentre os três métodos, os valores obtidos por MAS5.0 apresentou maior coeficiente de correlação ( $\rho = 0,939$ ), indicando que este deve ser usado para a obtenção de valores de razão de expressão mais confiáveis.

Tabela 9: Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de diferença de expressão encontrados nos métodos de pré-processamento e os encontrados por qRT-PCR.

| <b>Método</b> | <b>Coeficiente de correlação</b> |
|---------------|----------------------------------|
| <b>RMA</b>    | 0,928                            |
| <b>GCRMA</b>  | 0,883                            |
| <b>MAS5.0</b> | 0,939                            |
| <b>Média</b>  | 0,915                            |

Quanto aos demais genes estudados por qRT-PCR, apenas CXCL16 apresentou diferença de expressão significativa, sendo esta nos contrastes R0xR48 e R0xS0. As diferenças de expressão neste gene não foram listadas nos resultados das análises de microarranjo devido ao valor de diferença de expressão não ter sido maior que dois, mesmo tendo apresentado valores p menores que 0,01.

## 5.5. Discussão

Embora todos os genes testados como controle endógeno terem apresentado baixos valores M quando comparados a diversos trabalhos recentes (MINNER e POUMAY, 2009; GUO *et al.*, 2010; BOUGARN *et al.*, 2011), é indicado para trabalhos futuros envolvendo tecidos de pele de bovinos infestados com carrapato o uso dos genes GAPDH e HPRT, uma vez que apresentaram os menores valores de estabilidade M neste experimento.

Frente a grande variedade de formas de análise de dados provenientes de técnicas de qRT-PCR e microarranjo, se torna importante que em ambas técnicas seja utilizado o maior número de informações disponíveis e plausíveis para que aumente a confiabilidade dos resultados. Em estudos biológicos, as análises de algoritmos de pré-processamento dos dados de microarranjo são normalmente validadas por qRT-PCR (QIN *et al.*, 2006). Como demonstrado em Millenaar *et al.* (2006), o coeficiente de correlação entre as medidas de razão de expressão do microarranjo e os valores de  $\Delta C_t$  (devidamente transformados) é uma boa medida de conformidade. Neste trabalho, foram encontrados altos valores de coeficiente de correlação de Pearson entre os dados (Tabela 9), sendo maiores do que os encontrados por Mieczkowski *et al.* (2010), que analisaram a correlação entre os valores obtidos pelos métodos mais utilizados de pré-processamento de dados de microarray e os valores obtidos por qRT-PCR, de resultados provenientes de diversos trabalhos recentemente realizados.

Dentre os três métodos de pré-processamento utilizados neste estudo, os valores de razão de expressão obtidos pelo método MAS5.0 proposto pela própria Affymetrix em 2002 (Affymetrix Inc.), foi o que apresentou maior correlação com os dados provenientes da técnica de qRT-PCR. Assim, indica-se o uso dos valores de diferença de expressão provenientes das análises deste método. Porém, por ser um método de menor estringência, como observado em Lee *et al.* (2010), é indicado para a enumeração dos genes diferencialmente expressos de forma significativa o método de interseção, tal como utilizado neste experimento, que foi proposto por Rowe *et al.* (2008) e que também foi utilizado nos recentes estudos de expressão gênica em

bovinos frente a infestação por carrapatos (KONGSUWAN *et al.*, 2008; PIPER *et al.*, 2009, PIPER *et al.*, 2010).

De forma geral, foi observado nas amostras de pele dos animais resistentes diferença de expressão de uma grande quantidade de genes relacionados a resposta imunológica durante as 48 horas após a infestação. Tais genes estão relacionados com uma ampla variedade de formas de resposta contra o carrapato. Como revisto por Wikel (1996) e Brossard e Wikel (1997) a infestação por carrapatos induzem um complexo conjunto de respostas imunes no hospedeiro envolvendo células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos T e B, anticorpos, citocinas, complemento, basófilos, mastócitos, eosinófilos e uma série de moléculas bioativas. Essas complexas interações podem ser vistas como um equilíbrio entre defesas do hospedeiro contra o parasita e estratégias de inibição da alimentação do carrapato e transmissão de patógenos.

Já nos animais susceptíveis, não foi possível observar mudança significativa em grande quantidade de genes ao decorrer do tempo, inviabilizando a identificação de processos biológicos e vias metabólicas ativadas ou reprimidas durante o processo. É possível que, neste experimento não tenha ocorrido, nos animais susceptíveis, montagem de resposta contra o carrapato durante as primeiras 48 horas após a infestação. Outra possibilidade é que uma possível maior variação genética e fenotípica neste grupo de animais tenha ocasionado maior variação de formas de resposta imune, aumentando assim o desvio de expressão dos genes e causando diminuição na significância das mudanças no padrão de expressão destes. Observando a tabela 10, pode ser notado que nos genes analisados por qRT-PCR, genes estes que, quando apresentaram diferença de expressão nos contrastes avaliados, apresentaram diferença de expressão na maioria das vezes entre os animais resistentes, os maiores coeficientes de variação foram obtidos nos grupos de animais susceptíveis, o que sugere maior variação de mecanismos de resposta nesses animais.



Tabela 10: Ct médio e coeficiente de variação (em porcentagem) de todos os genes estudados por qRT-PCR para todos os grupos analisados.

| Gene   | Grupo        | Ct Médio |       |       | Coeficiente de Variação (%) |      |      |
|--------|--------------|----------|-------|-------|-----------------------------|------|------|
|        |              | 0h       | 24h   | 48h   | 0h                          | 24h  | 48h  |
| CCL16  | Resistentes  | 26,49    | 26,57 | 25,24 | 2,82                        | 1,66 | 2,26 |
|        | Susceptíveis | 26,28    | 26,09 | 26,13 | 1,71                        | 2,36 | 3,30 |
| CD25   | Resistentes  | 29,66    | 29,94 | 29,49 | 1,91                        | 1,32 | 1,34 |
|        | Susceptíveis | 29,51    | 29,61 | 28,77 | 2,62                        | 1,85 | 3,80 |
| CFB    | Resistentes  | 28,76    | 28,99 | 27,10 | 2,18                        | 2,50 | 3,61 |
|        | Susceptíveis | 28,71    | 28,00 | 29,23 | 2,62                        | 2,75 | 3,56 |
| CFP    | Resistentes  | 28,03    | 27,96 | 26,32 | 3,19                        | 2,51 | 2,36 |
|        | Susceptíveis | 27,82    | 27,82 | 28,04 | 1,08                        | 0,77 | 3,35 |
| CLDN   | Resistentes  | 23,24    | 23,71 | 24,49 | 3,82                        | 3,88 | 4,76 |
|        | Susceptíveis | 23,45    | 23,34 | 24,25 | 4,83                        | 4,96 | 5,72 |
| CXCL16 | Resistentes  | 27,14    | 26,99 | 26,55 | 1,82                        | 1,42 | 0,59 |
|        | Susceptíveis | 26,63    | 26,42 | 26,69 | 1,81                        | 1,12 | 1,91 |
| CXCL10 | Resistentes  | 29,23    | 29,25 | 28,60 | 2,30                        | 2,28 | 3,27 |
|        | Susceptíveis | 27,70    | 28,18 | 27,52 | 2,15                        | 4,27 | 4,59 |
| FOXP3  | Resistentes  | 28,97    | 28,89 | 28,70 | 1,43                        | 1,58 | 1,19 |
|        | Susceptíveis | 28,52    | 28,41 | 27,81 | 1,78                        | 1,76 | 3,89 |
| GAPDH  | Resistentes  | 20,69    | 20,60 | 20,22 | 2,97                        | 1,70 | 0,92 |
|        | Susceptíveis | 20,57    | 20,33 | 21,02 | 2,72                        | 3,02 | 3,59 |
| HPRT   | Resistentes  | 23,93    | 24,26 | 24,32 | 2,00                        | 1,96 | 2,35 |
|        | Susceptíveis | 24,18    | 23,88 | 24,48 | 1,67                        | 2,89 | 3,75 |
| IL10   | Resistentes  | 32,51    | 32,56 | 32,03 | 2,36                        | 2,80 | 2,33 |
|        | Susceptíveis | 31,66    | 32,43 | 30,39 | 1,23                        | 5,18 | 5,45 |
| IL10Rb | Resistentes  | 28,89    | 28,88 | 28,35 | 3,49                        | 1,22 | 1,73 |
|        | Susceptíveis | 28,81    | 28,24 | 28,99 | 2,62                        | 1,63 | 3,64 |
| REGAK  | Resistentes  | 27,05    | 26,65 | 24,66 | 3,72                        | 3,90 | 4,10 |
|        | Susceptíveis | 27,12    | 27,05 | 27,59 | 2,65                        | 1,34 | 5,30 |
| TLR2   | Resistentes  | 31,67    | 32,18 | 31,09 | 2,13                        | 2,55 | 2,41 |
|        | Susceptíveis | 31,17    | 31,53 | 30,71 | 2,54                        | 6,01 | 6,25 |

Comparando a expressão diferencial na pele entre bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato antes da infestação, foi possível observar a diferença de expressão de uma série de genes. Dentre os genes mais expressos nos animais susceptíveis, podem ser destacados os genes codificantes de: indoleamina 2,3-deoxigenase 1, de CXCL10 e da proteína quinase associada a cadeia zeta (ZAP70). A expressão da enzima indoleamina 2,3 deoxigenase 1 é induzida por INF- $\gamma$ , sendo produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas ativados. Quando expressa por essas células, age inibindo a proliferação de linfócitos T através da degradação de triptofano (HWU *et al.*, 2000; MUNN *et al.*, 2002). A quimiocina CXCL10 (também chamada IP-10) também tem sua expressão induzida por INF- $\gamma$ , e a ela têm sido atribuída diversas funções tais como quioatração de monócitos, macrófagos, linfócitos T, células natural killer, promoção de adesão das células T às células endoteliais (DUFOUR *et al.*, 2002). A proteína ZAP70 é naturalmente expressa células T e nk (*natural killer*), e está associada com o processo intracelular de ativação das células T (SKOV *et al.*, 1997). A maior expressão destes genes nos animais susceptíveis antes da infestação artificial indica que possivelmente ainda havia nesses animais expressão de genes relacionados com resposta imune contra antígenos presentes na saliva do carrapato, provenientes de infestações naturais anteriores a realização do experimento .

Interessantemente, um gene que foi mais expresso nos animais resistentes antes da infestação foi o codificante da proteína claudina-1, sendo esta proteína o principal constituinte das zônulas ou junções de oclusão (FURUSE *et al.*, 2002). As zônulas de oclusão, presentes tanto no epitélio simples quanto no estratificado, são áreas de íntima associação entre duas células adjacentes que formam uma barreira virtualmente impermeável ao fluido (TSUKITA e FURUSE, 2002), podendo servir tanto como barreira contra a entrada da saliva do carrapato, como dificultadoras de acesso às camadas celulares subsequentes, onde são encontradas vênulas, principal fonte de acesso ao alimento do carrapato. De acordo com Gumbiner (1993), em bovinos, o epitélio serve como a primeira barreira frente a parasitas e a resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa à invasão do patógeno.

Kemp *et al.* (1976) verificaram que nos animais resistentes os carrapatos gastam menos tempo em cada sítio de fixação e mais tempo se movimentando sobre a pele, o que pode ser explicado por uma maior dificuldade de acesso ao alimento nesses animais. Em um recente trabalho, Wang *et al.* (2007) descreveram maior expressão de uma série de genes relacionados com estrutura da pele em animais zebuínos quando comparados a taurinos após a infestação. De acordo com Regitano e Prayaga (2010), estes resultados sugerem que algumas das variações genéticas para a resistência ao carrapato podem ser explicadas por genes relacionados com a estrutura da pele. Assim, o gene codificante da claudina-1, torna-se um gene candidato a resistência ao carrapato.

Outro gene mais expresso nos animais resistentes foi o codificante da proteína do complexo maior de histocompatibilidade bovina, classe II, DQ $\alpha$  tipo 1 (BoLA-DQA1). Em bovinos, alguns haplótipos deste gene já foram descritos como relacionados com resistência a progressão de mastite (TAKESHIMA *et al.*, 2008) e a infecção pelo protozoário *Neospora canium* (SCHWAB *et al.*, 2009). Em ovinos, a maior expressão do gene BoLA-DQA1 foi relacionada com a resistência a nematóides (KEANE *et al.*, 2007). Em humanos, polimorfismos na região promotora do gene codificante de HLA-DQA1 (correspondente ao gene bovino BoLA-DQA1) estão associadas a diferença na expressão gênica (MORZYCKA-WROBLEWSKA *et al.*, 1997; FERNANDEZ *et al.*, 2003). É possível que variações na estrutura gênica do gene codificante de BoLA-DQA1 estejam relacionados com a diferença de expressão observada neste experimento, e que esta diferença esteja relacionada com a resistência ao carrapato nesses animais.

Analisando os genes diferencialmente expressos após a infestação com os carrapatos, uma via metabólica representada foi a das cascatas de coagulação (Figura 21). É sabido que na saliva de diversas espécies de carrapato há enzimas que inibem a coagulação sanguínea atuando em vários pontos da cascata de coagulação (BROSSARD e WIKEL, 2004). É plausível imaginar que o hospedeiro combata a ação dessas enzimas através da promoção de vasoconstrição, fatores de agregação plaquetária e aumento de mediadores de coagulação no sangue (KONGSUWAN *et al.*, 2008).

Foi observada maior expressão de genes codificantes de fatores pró coagulatórios nos animais resistentes 48 horas após a infestação, tanto quando comparados a expressão em momentos anteriores nos mesmos animais ou quanto quando comparados com os animais susceptíveis as 48 horas após a infestação.

Um desses fatores, o fator de coagulação FXIII age no final da cascata já que, uma vez ativado, possui ação transglutaminase e, por formação de ligações covalentes forma monômeros ativados de polímeros de fibrina, estabilizando o coágulo de fibrina (LORAND, 2005). Kongsuwan *et al.* (2008) também observaram maior expressão deste fator em animais zebuínos quando comparados a animais taurinos após a infestação. Outro gene mais expresso nos animais resistentes foi o da fibronectina. Além de a glicoproteína fibronectina ser um dos principais constituintes do coágulo sanguíneo quando ligada a fibrina (MOSHER, 1976), aumenta a adesão de plaquetas sanguíneas à fibrina (HANSEN, 1984). Já a Fosfolipase I, outro gene mais expresso nos animais resistentes, é uma enzima que pode ser secretada por plaquetas ativadas e está diretamente relacionada com a síntese do ácido lisofosfatídico durante a coagulação sanguínea (BOLEN *et al.*, 2011). Este ácido graxo é importante para a ativação e agregação plaquetária (HASERUCK *et al.*, 2004).

Como a cascata de coagulação pode ser retroativada, fatores inibidores de certos pontos da cascata se tornam importantes tanto para controlar para que os fenômenos de coagulação não se desenvolvam além do necessário quanto para possibilitar um reparo do tecido danificado (HALKIER e WOOLLEY, 1991). Foi mais expresso nos animais resistentes, um desses fatores, denominado de TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*). Este se liga ao fator Xa regulando o complexo tenase extrínscico e previne produção futura de FXa e FIXa por impedir a formação do complexo FVIIa/TF (BROZE JR., 1995).

O único fator relacionado com a cascata de coagulação mais expresso nos animais susceptíveis foi o gene codificante do Fator V (FV), sendo esta maior expressão observada 24 horas após a infestação. O fator de coagulação FV uma vez ativado (FVa) age em conjunto com FXa, integrantes do complexo tenase, na ativação de protombina em trombina (MANN *et al.*, 2003). Porém, a maior disponibilidade somente deste fator não é suficiente para a maior ativação da coagulação, pois sua

ação depende da coexpressão de outros fatores formadores do complexo tenase (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009).

Nos hospedeiros mais susceptíveis tem sido demonstrado que fortes infestações podem alterar os mecanismos hemostáticos por inibir a agregação plaquetária e a coagulação (RECK JR *et al.*, 2009) além de alterar o nível de proteínas de fase aguda da resposta imunológica (CARVALHO *et al.*, 2008). Carvalho *et al.* (2010), observaram que os animais resistentes diminuem a expressão de fatores anti-coagulantes nos carrapatos mais eficientemente do que os animais susceptíveis, fazendo com que o tempo de coagulação sanguínea nos animais resistentes seja menor. De acordo com os resultados apresentados, pode-se inferir que, nos animais resistentes, a coagulação sanguínea não foi inibida totalmente pelas moléculas anti-coagulatórias presentes na saliva do carrapato e, os genes codificantes de proteínas pró-coagulatórias mais expressos nos animais resistentes tornam-se genes candidatos a estarem relacionados com a resistência ao carrapato, principalmente o gene codificante do fator XIII, uma vez que este age no final da cascata de coagulação.

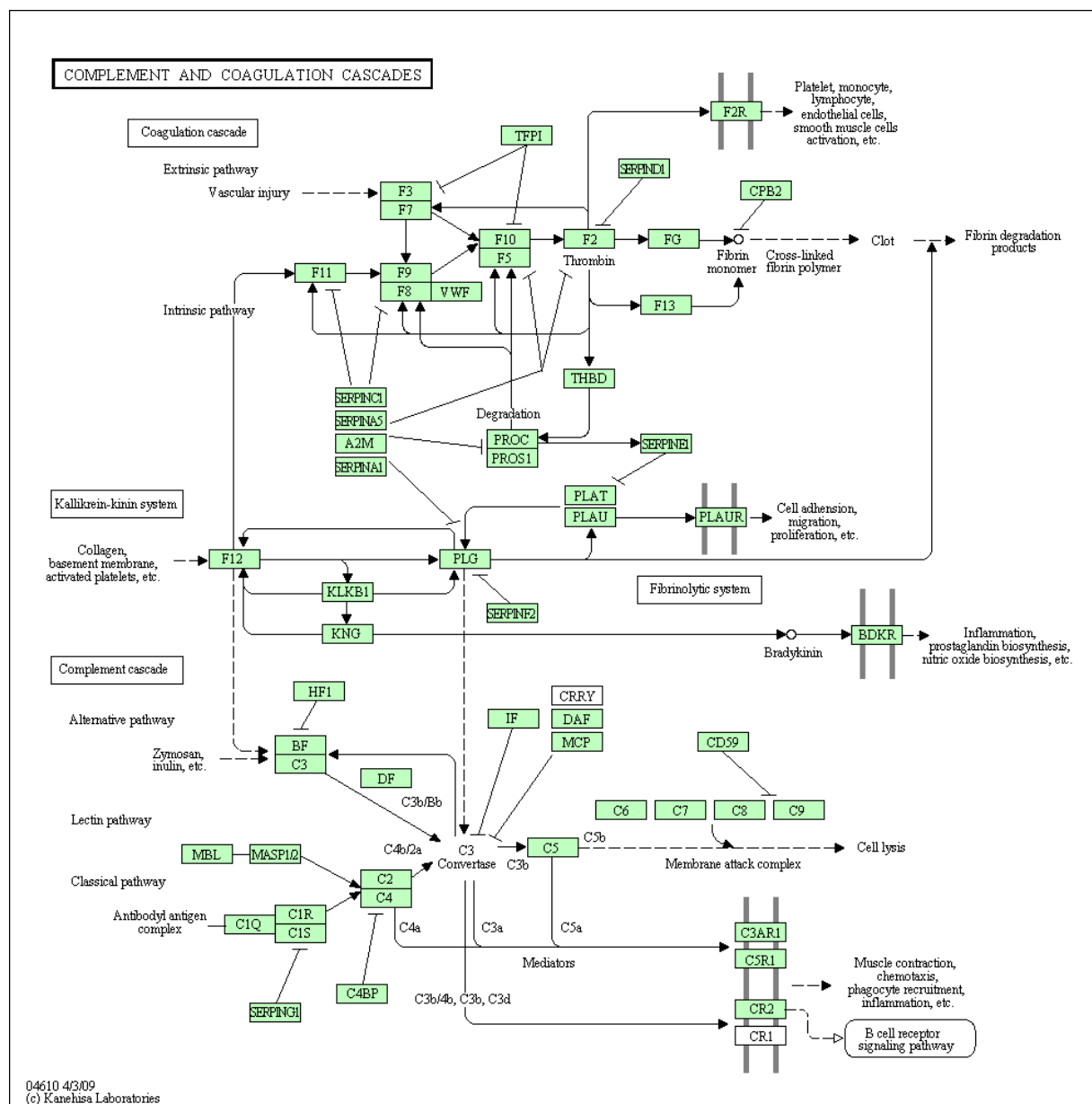
Outra via metabólica representada entre os genes diferencialmente expressos neste experimento foi a do sistema complemento (Figura 21). O sistema complemento compreende uma série de proteínas, as quais podem ser ativadas através das vias clássica, alternativa e da lectina e funcionam como importantes mediadoras de inflamação, quimiotaxia, opsonização e limpeza microbiana (FEARON, 1998; MASTELLOS e LAMBRIS, 2002).

Foi observado neste experimento maior expressão, nos animais resistentes, dos genes codificantes das três cadeias (A, B e C) formadoras do subcomponente C1q, sendo este o principal formador do complexo C1 (formado por uma molécula C1q, duas C1r e duas C1s, totalizando o complexo C1qr<sup>2</sup>s<sup>2</sup>). A este complexo é atribuída a iniciação da via clássica do complemento por sua ligação aos imunocomplexos de antígenos e imunoglobulinas (IgG ou IgM), ou a proteína C reativa (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009). Outros genes mais expressos nos animais resistentes após a infestação relacionados com o sistema complemento foram os codificantes para os fatores B e Properdina (fator P). Como revisto por Lutz e Jelezarova (2006), estes fatores atuam na via alternativa de ativação do complemento e são reconhecidamente amplificadores da

cascata do complemento. O gene da molécula precursora da cadeia  $\alpha$  da proteína ligante a C4b (C4BP) também foi mais expresso nos animais resistentes 48 horas após a infestação. Além de essa proteína inibir a ação de C4, mais especificamente nas vias clássicas e das lectinas, também é considerada um ligante a CD40 em linfócitos B, estabelecendo uma ligação entre o complemento e a ativação de linfócitos B (BRODEUR *et al.*, 2003).

Aparentemente, a maior expressão dos fatores B, P e de C4BP, indicam o favorecimento da via alternativa do complemento. Já está bem documentado que a via alternativa de ativação do complemento está envolvida na resistência adquirida contra a alimentação do carrapato (WIKEL e ALLEN, 1978; WIKEL, 1979, RIBEIRO, 1989; LAWRIE *et al.*, 1999) provavelmente culminando na não fixação e expulsão do carrapato no hospedeiro. Desta forma, estes genes também podem ser considerados relacionados com a resistência ao carrapato e, assim, passam a serem considerados genes candidatos a resistência ao carrapato em bovinos.

Figura 21: Representação dos principais fatores componentes das cascatas do complemento e coagulação sanguínea.



## 6. Discussão geral

Até o momento, os trabalhos de expressão gênica diferencial frente a infestação ao carrapato em animais com diferentes padrões de resistência ao parasita não compararam a diferença de expressão na pele antes da infestação. A comparação da expressão gênica na pele antes da infestação em animais previamente expostos ao carrapato se torna útil para o entendimento do ambiente tecidual e protéico encontrado pelo carrapato no momento da fixação o que possibilita a enumeração de diferenças neste ambiente que podem estar relacionadas com a resistência ao ectoparasita.

Frente a maiores diferenças de expressão, tanto na pele quanto no sangue periférico, terem sido observadas 48 horas após a infestação nos animais resistentes, tempo não estudado em outros trabalhos, passa a ser indicado que, em trabalhos futuros, também seja estudada a expressão de genes 48 horas após a infestação.

Tatchell e Moorhouse (1968) conduzindo um abrangente estudo histológico em seções de pele de animais zebuínos e taurinos aos quais diferentes instares (larva, ninfa e adulto) de *R. microplus* estavam fixados, observaram, nas amostras onde as larvas estavam fixadas, maior resposta imunológica nos animais taurinos. Os autores, então, sugeriram que uma resposta vigorosa realizada pelos animais susceptíveis funcionaria para criar um ambiente mais favorável para o carrapato, através do aumento de fluidos teciduais disponíveis, mediados pelo aumento de permeabilidade vascular.

Os estudos aqui realizados, embora não tenham demonstrado resposta imune nos animais susceptíveis nas primeiras 48 horas mostraram, nos animais resistentes, aspectos que podem inibir a alimentação do carrapato nos primeiros dias após a infestação incluindo maiores barreiras contra o fluxo de fluidos, modulação da resposta imune e favorecimento da coagulação sanguínea.



## 7. Conclusões

Estudando a expressão de genes no sangue dos animais infestados pôde-se observar diferença de expressão dos genes CD25, CXCL8, CXCL10, FOXP3 e IL10, entre os animais resistentes e susceptíveis ao decorrer do tempo. Enquanto nos animais susceptíveis houve repressão da expressão de CXCL8 ao decorrer das primeiras 48 horas após a infestação, nos animais resistentes a maior expressão de CD25, CXCL10, FOXP3 e IL10 após a infestação indica ação de mecanismos reguladores da resposta imune. Tal regulação pode acarretar em uma resposta imune menos exacerbada nesses animais, o que dificultaria o acesso dos carrapatos ao sangue dos bovinos.

O procedimento utilizado na hibridização, leitura e análise dos chips microarray foi validado por qRT-PCR pois foi encontrado alto coeficiente de correlação entre os resultados obtidos nas diferentes técnicas.

Quanto a expressão da pele dos animais infestados, foi observada diferença de expressão de uma série de genes entre os bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato. Dentre estes destacam-se os relacionados com as cascatas de coagulação, amplificação e favorecimento da via alternativa de ativação do sistema complemento, componentes estruturais das junções ocludentes, e algumas vias de resposta imune. De forma geral, pôde-se concluir que o reparo dos danos causados na fixação do carrapato e ativação da coagulação sanguínea estão fortemente relacionados com uma maior resistência ao carrapato, levando a menor quantidade de carrapatos que chegam a vida adulta durante a infestação.

Por fim, alguns genes como os codificantes da proteína claudina-1, do fator de coagulação FXIII, da enzima fosfolipase I, dos fatores B, P e de C4BP da sistema complemento, passam, então a ser considerados genes candidatos a resistência ao carrapato bovino.

## 8. Referências Bibliográficas

Affymetrix Inc: Statistical algorithms description document. *Tech rep*, 2002.

ALLEN JR, KHALIL HM, WIKEL SK. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *Journal of Immunology*: 122, p. 563-565, 1979.

ALONSO-DÍAS MA, GARCÍA L, GALINDO-VELASCO E, LEZAMA-GUTIERREZ E, ANGEL-SAHAGÚM SA, RODRIGUEZ-VIVAS RI, FRAGOSO-SÁNCHEZ H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Boophilus microplus* on naturally infested cattle in Mexican tropics. *Vet Parasitol*: 147, p. 336-340, 2007.

ALVINERIE M, SUTRA JF, GALTIER P, MAGE C. Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. *Research in Veterinary Science*: 67, p. 229–232, 1999.

ANDERSEN CL, JENSEN JF, ORNTOLT TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*: 64, p. 5245-5250, 2004.

ARTHUR DR. Host and tick relationships: a review. *Journal of Wildlife Disease*: 9, p. 74-84, 1973.

ATHANASSOF N. “Manual do Criador de Bovinos” 5 ed. São Paulo. Edições Melhoramentos, 1953.

BAGNALL N, GOUGH J, CADOGAN L, BURNS B, KONGSUWAN K. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation *Parasite Immunology*: 31, p. 177-187, 2009.

BELKAID Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. Rev. Immunol*: 7, p. 875–888, 2007.

BOLDMAN KGLA, KRIESE LD, VAN VLECK KSD. A manual for use of MTDFREML. A set of Programs to obtain estimates of variances and covariances. Lincoln Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 120p., 1993.

BOLEN AL, NAREN AP, YARLAGADDA S, BERANOVA-GIORGIANNI S, CHEN L, NORMAN D, BAKER DL, ROWLAND MM, BEST MD, SANO T, TSUKAHARA T, LILIOM K, IGARASHI Y, TIGYI G. The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A-I links platelet activation to LPA production during blood coagulation. *J Lipid Res*: 52 (2), p. 958-70, 2011.

BOUGARN S, CUNHA P, GILBERT FB, MEURENS F, RAINARD P. Technical note: Validation of candidate reference genes for normalization of quantitative PCR in bovine mammary epithelial cells responding to inflammatory stimuli. *Journal of Dairy Science*: 94 (5), p. 2425-2430, 2011.

BRODEUR SR, ANGELINI F, BACHARIER LB, BLOM AM, MIZOGUCHI E, FUJIWARA H, PLEBANI A, NOTARANGELO LD, DAHLBACK B, TSITSIKOV E, GEHA RS. C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity*: 18 (6), p. 837-48, 2003.

BROSSARD M, WIKEL SK. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Medical and Veterinary Entomology*: 11, p. 270-276, 1997.

BROSSARD M, WIKEL SK. Tick immunobiology. *Parasitology*: 129, p. 161–176, 2004.

BROZE JR. GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med*: 46, p. 103–112, 1995.

BUSTIN, S. A. Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Journal of Molecular Endocrinology*: 25, p. 169–193, 2000.

BYFORD I, COLDITZ P, SIBBICK R. A Tick Resistant Dairy Breed. *Queensland Agricultural Journal*: 102, p. 11-15, 1976.

CARVALHO WA, BECHARA GH, MORE D.D, FERREIRA BR, DA SILVA JS, DE MIRANDA SANTOS IKF. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Exp. Parasitol*: 118, p. 587–591, 2008.

CARVALHO WA, MARUYAMA SR, FRANZIN AM, ABATEPAULO AR, ANDERSON JM, FERREIRA BR, RIBEIRO JM, MORÉ DD, AUGUSTO MENDES MAIA A, VALENZUELA JG, GARCIA GR, DE MIRANDA SANTOS IK. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: clotting time in tick-infested skin varies according to local inflammation and gene expression patterns in tick salivary glands. *Exp Parasitol*: 124 (4), p. 428-435, 2010.

CASSAR-MALEK I, PICARD B, BERNARD C, HOCQUETTE J-F. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Australian Journal of Experimental Agriculture*: 48, p. 701-710, 2008.

CHER DJ, MOSMANN TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *Journal Immunology*: 138, p. 3688-3694, 1987.

CHERVONEVA I, LI Y, SCHULZ S, CROKER S, WILSON C, WALDMAN SA, HYSLOP T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics*: 11 (253), p. 1-15, 2010.

CONSTANTINOIU CC, JACKSON LA, JORGENSEN WK, LEW-TABOR AE, PIPER EK, MAYER DG, VENUS B, JONSSON NN. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *International Journal for Parasitology*: 40, p. 865–875, 2010.

COOPER MD, ALDER MN. The evolution of adaptive immune system. *Cell*: 124 (4), p. 815-822, 2006.

COUSSENS PM, NOBIS W. Bioinformatics and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 86 (3-4), p. 229-244, 2002.

CRAMPTON AL, BAXTER GD, BARKER SC. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*: 29, p. 377-384, 1999.

DE CASTRO J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol*: 71 (2-3), p. 77-97, 1997.

DOOLITTLE RE, FENG DF. Reconstructing the evolution of vertebrate blood coagulation from a consideration of the amino acid sequences of clotting proteins. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology LII*, p. 869-874, 1987.

DUFOUR JH, DZIEJMAN M, LIU MT, LEUNG JH, LANE TE, LUSTER AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol*: 168 (7), p. 3195-3204, 2002.

ELDER JK, KEARNAN JF, WATERS KS, DUNWELL GH, EMMERSON FR, KNOTT SG, MORRIS RS. A survey concerning cattle tick control in Queensland. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Aust Vet J*: 56, p. 219-223, 1980.

ELSE KJ, FINKELMAN FD. Intestinal nematode parasites cytokines and efector mechanisms. *International Journal Parasitology*: 28, p. 1145-1158, 1998.

FARIAS NAR, GONZALES JC, SAIBRO JC. Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-de-boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*: 21, p. 1313-1320, 1986.

FEARON DT. The complement system and adaptive immunity. *Seminars in Immunology*: 10, p. 355–361, 1998.

FERNANDEZ S, WASSMUTH R, KNERR I, FRANK C, HAAS JP. Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Immunogenet*: 30(2), p.141-148, 2003.

FLOATE KD, TAYLOR WG, SPOONER RW. Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle dung. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*: 694, p. 246-251, 1997.

FRANCISCHETTI IM, SA-NUNES A, MANS BJ, SANTOS IM, RIBEIRO JM. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*: 14, p. 2051-2088, 2009.

FRAZZON APG, JUNIOR ISV, MASUDA A, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*: 94 (1-2), p. 117-125, 2000.

FURLONG J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG*: 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG J, DERESZ F, DE MATOS LL, BALBI MV. The Effect of Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Infestation on Feed Intake And Milk Yield of Holstein x Zebu Crossbred Cows. In: *XV Congresso Panamericano de Veterinária*, Campo Grande. p. 340, 1996.

FURUSE M, HATA M, FURUSE K, YOSHIDA Y, HARATAKE A, SUGITANI Y, NODA T, KUBO A, TSUKITA S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*: 156 (6), p. 1099–1111, 2002.

GAUTIER L, COPE L, BOLSTAD BM, IRIZARRY RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*: 20(3), p. 307-315, 2004.

GEORGE JE, POUND JM, DAVEY RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*: 129, S353–S366, 2004.

GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, DECALLONNE B, BOUILLON R, MATHIEU C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*: 25, p. 386–401, 2001.

GÖHLMANN H, TALLOEN W. Gene expression studies using Affymetrix microarrays. 1st ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2009.

GONZÁLES JC. O controle do carrapato bovino. *Sulina*, Porto Alegre, 1975.

GONZÁLES JC. O controle do carrapato do boi. *Edição do Autor*, Porto Alegre, 1995.

GUGLIELMONE AA, ROBBINS RG, APANASKEVICH DA, PETNEY TN, ESTRADA-PEÑA A, HORAK IG. Comments on controversial tick (Acari: Ixodida) species names and species described or resurrected from 2003 to 2008. *Exp Appl Acarol*: 48 (4), p. 311-327, 2009.

GUMBINER BM. *Breaking through the tight junction barrier*. J Cell Biol: 123, p. 1631-1633, 1993.

GUO Y, CHEN J, YANG S, FU X, ZHANG Z, CHEN K, HUANG Y, LI Y, XIE Y, MAO Y. *Selection of reliable reference genes for gene expression study in nasopharyngeal carcinoma*. Acta Pharmacologica Sinica: 31, p. 1487–1494, 2010.

GUZMAN E, PRICE SJ, POULSOM HEG, HOPE JC. Bovine gd T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* in press doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.013, 2011.

HAJNICKÁ V, KOCÁKOVÁ P, SLÁVIKOVÁ M, SLOVÁK M, GASPERÍK J, FUCHSBERGER N, NUTTALL PA. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology*: 23 (9), p. 483–489, 2001.

HALKIER T, WOOLLEY P. Mechanisms in blood coagulation fibrinolysis and the complement system. Cambridge University Press, 467 p., 1991.

HAMMOND K. Small holder milk recording for developing countries. In: International committee for animal recording, 29., Ottawa: ICAR, 32, 1994.

HANSEN MS. Fibronectin and coagulation factor XIII increases blood platelet adhesion to fibrin. *Thrombosis Research*: 34 (6), p. 551-556, 1984.

HASERUCK N, ERL W, PANDEY D, TIGYI G, OHIMANN P, RAVANAT C, GACHET C, SIESS W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood*: 103, p. 2585–2592, 2004.



HÄUSERMAN W, FRIEDEL T, HESS EA, STRONG MB. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks. In: *Proceedings of XIX International Congress of Entomology*. Beijing, China, 1992.

HEWETSON RW. Resistance of Cattle to Cattle Tick *Boophilus microplus*. II. The Inheritance of Resistance to Experimental Infestation. *Australian Journal Agricultural Research*: 19, p. 495-505, 1968.

HOEK A, RUTTEN VP, KOOL J, ARKESTEIJN GJ, BOUWSTRA RJ, VAN RHIJN I, KOETS AP. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet Res*: 40 (1), 6, 2009.

HONER MR, GOMES A. O Manejo Integrado de Mosca dos Chifres, Berne e Carrapatos em Gado de Corte. *Circular Técnica nº 22*, Coop. Embrapa Gado de Corte, 1990.

HOOGSTRAAL H, WASSEF HY. *Dermacentor (Indocentor) arosignatus* (Acari; Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo and Southern Phillipines. *J Med Entomol*: 22 (6), p. 644-647, 1985.

HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*: 299, p. 1057–1061, 2003.

HORN SC, ARTECHE CCP. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária*: 23, p. 12-32, 1995.

HWU P, DU MX, LAPOINTE R, DO M, TAYLOR MW, YOUNG HA. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*: 164, p. 3596-3599, 2000.

JANEWAY CA, TAVERS P, WALPORT M, SHOLMCHI, K. *Imunologia: O Sistema Imune na saúde e na doença*, Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

JONGEJAN F, UILENBERG G. The global importance of ticks. *Parasitology*: 129, S3-S14, 2004.

JONSSON NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*: 137, 1-10, 2006.

KAFATOS FC, JONES CW, EFSTRATIADIS A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res*: 7 (6), p. 1541-1552, 1979.

KASHINO SS, RESENDE J, SACCO, MAS, ROCHA C, PROENÇA L, CARVALHO WA, FIRMINO AA, QUEIROZ R, BENAVIDES M, GERSHWIN LJ, DE MIRANDA SANTOS IKF. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestation. *Experimental Parasitology*: 110, p. 12-21, 2005.

KEANE OM, DODDS KG, CRAWFORD AM, MCEWAN JC. Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies Ovar-DQA1 allele frequency differences between nematode-resistant and susceptible selection lines. *Physiol Genomics*: 30(3), p. 253-261, 2007.

KEIRANS JE, DURDEN LA. Ticks systematic and identification. In: GOODMAN JL, DENNIS DT, SONENSHINE DE, Editors, *Tick-borne diseases of humans*, ASM Press, Washington, DC, 401 p., 2005.

KEMP DH, KOUDSTAAL D, ROBERTS JA, KERR JD. *Boophilus microplus* – effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology*: 73, p 123–136, 1976.

KEMPER C, ATKINSON JP, HOURCADE DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol*: 28, p. 131-55, 2010.

KONGSUWAN K, PIPER EK, BAGNALL NH, RYAN K, MOOLHUIJZEN P, BELLGARD M, LEW A, JACKSON L, JONSSON NN. Identification of genes involved with tick infestation in *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Dev. Biol. (Basel)*: 132, p. 77–88, 2008.

KORENBERG MJ. Microarray data analysis: method and applications. 1<sup>a</sup> Ed. New Jersey: Human Press Inc, 2007.

KUNZ SE, KEMP DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech*: 13, p. 1249-1286, 1994.

LAWRIE CH, RANDOLPH SE, NUTTALL PA. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp Parasitol*: 93, p. 207–214, 1999.

LEE SH, GONDRO C, VAN DER WERF J, KIM NK, LIM DJ, PARK EW, OH SJ, GIBSON JP, THOMPSON JM. Use of a bovine genome array to identify new biological pathways for beef marbling in Hanwoo (Korean Cattle). *BMC Genomics*: 11 (623), 2010.

LEITE RC, LABRUNA MB, OLIVEIRA PR, MONTEIRO AMF. In vitro susceptibility of engorged females from different populations of *Boophilus microplus* to comercial acaricides. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*: 4, p. 283–294, 1995.

LEITE, R.C. Carrapaticidas. 1<sup>o</sup> Simpósio sobre controles de carrapatos, p. 17- 36, 1996.

LE MOS AM. A Resistência Genética dos Bovinos e o Controle do Carrapato. *Documento EMBRAPA/CNPGL*: 6, p. 42, 1986.

LEUTENEGGER CM, ALLUWAIMI AM, SMITH WL, PERANI L, CULLOR JS. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*: 77, p. 275-287, 2000.

LIPSHUTZ RJ, FODOR SP, GIGERAS TR, LOCKHART DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*: 21 (1 Suppl), p. 20-24, 1999.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods*: 25(4), p. 402-408, 2001.

LORAND L. Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. *J Thromb Haemost*: 3, p. 1337–1348, 2005.

LUTZ HU, JELEZAROVA E. Complement amplification revisited. *Molecular Immunology*: 43, p. 2–12, 2006.

MADALENA FE, TEODORO RL, LEMOS AM, OLIVEIRA GP. Causes of Variation of Field Burdens of Cattle Ticks (*B. microplus*). *Revista Brasileira Genética*: 8, p. 361-375, 1985.

MADER TL, DAVIS MS. Effect of management strategies on reducing heat stress of feedlot cattle: Feed and water intake. *J. Anim. Sci*: 82, p. 3077-3087, 2004.

MANN KG, BUTENAS S, BRUMMEL K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 23, p. 17–25, 2003.

MANS BJ, NEITZ AW. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol*: 34 (1), p. 1-17, 2004.

MASTELLOS D, LAMBRIS JD. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends in Immunology*: 23, p. 485–491, 2002.

MATTIOLI RC, PANDEY VS, MURRAY M, FITZPATRICK JL. Immunogenetic Influences on Tick Resistance in African Cattle with Particular Reference to Trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and Trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) Cattle. *Acta Tropica*: 75, p. 263–277, 2000.

MICHELMORE R, PARAN I, KESSELI RV. Identification of marker linked to disease resistance gene by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*: 88, p. 9828–9832, 2001.

MIECZKOWSKI J, TYBURCZY ME, DABROWSKI M, POKAROWSKI P. Probe set filtering increases correlation between Affymetrix GeneChip and qRT-PCR expression measurements. *BMC Bioinformatics*: 11, 104, 2010.

MILLENAAR FF, OKYERE J, MAY ST, VAN ZANTEN M, VOESENEK LA, PEETERS AJ. How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics*: 7 (137), 2006.

MINNER F, POUMAY Y. Candidate Housekeeping Genes Require Evaluation before their Selection for Studies of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*: 129, p. 770–773, 2009.

MORZYCKA-WROBLEWSKA E, MUNSHI A, OSTERMAYER M, HARWOOD JI, KAGNOFF MF. Differential expression of HLA-DQA1 alleles associated with promoter polymorphism. *Immunogenetics*: 45(3), p.163-170, 1997.

MOSHER DF. Action of fibrin-stabilising factor on cold-insoluble fibroectin and alpha2-macroglobulin in clotting plasma. *The Journal of Biological Chemistry*: 251 (6), p. 1639-1645, 1976.

MUNN DH, SHARMA MD, LEE JR, JHAVER KG, JOHNSON TS, KESKIN DB, MARSHALL B, CHANDLER P, ANTONIA SJ, BURGESS R, SLINGLUFF JR. CL, MELLOR AL. Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Science*: 297, p. 1867-1870, 2002.

NASCIMENTO CS, MACHADO MA, GUIMARÃES SEF, GUIMARÃES MFM, PEIXOTO JO, FURLONG J, PRATA MCA, VERNEQUE RS, TEODORO RL, LOPES POS. Differential expression of genes in resistant versus susceptible Gyr x Holstein cattle challenged with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research*: 9 (4), p. 1974-1979, 2010.

O'NEILL CJ, SWAIN DL, KADARMIDEEN HN. Evolutionary process of *Bos Taurus* cattle in favourabl versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. *Evolutionary Applications*: 3 (5-6), p. 422-433, 2010.

PAINE SH, KEMP DH, ALLEN JR. *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and others mediators. *Parasitology*, 86: 419-428, 1983.

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. *Nucl. Acids Res*: 30, e36, 2002.

PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, NEUVIANS TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett*: 26, p. 509-515, 2004.

PIPER EK, JACKSON LA, BAGNALL NH, KONGSUWAN KK, LEW AE, JONSSON NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 126, p. 110–119, 2008.

PIPER EK, JACKSON LA, BIELEFELDT-OHMANN H, GONDRO C, LEW-TABOR AE, JONSSON, NN. 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*: 40, p. 431–441, 2010.

PIPER EK, JONSSON NN, GONDRO C, LEW-TABOR AE, MOOLHUIJZEN P, VANCE ME, JACKSON LA. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol*: 16, p. 1074–1086, 2009

POGGI A, ZANCOLLI M. CATELLANI S, BORSELLINO G, BATTISTINI L, ZOCCHI MR. Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*: 1107, p. 68-78, 2007.

PRUETT JH. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International J Parasitol*: 29, p. 25-32, 1999.

QIN LX, BEYER RP, HUDSON FN, LINFORD NJ, MORRIS DE, KERR KF. Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC Bioinformatics*: 7 (23), 2006.

- RECK JR. J, BERGER M, TERRA RMS, MARKS FS, DA SILVA VAZ JR. I, GUIMARÃES JA, TERMIGNONI C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res. Vet. Sci*: 86, p. 56–62, 2009.
- REGITANO LCA, PRAYAGA K. Ticks and tick-borne diseases in cattle. In: BISHOP, S. (Ed.). *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. 3. ed. Midlothian: CABI, 2010.
- RENDEL J. Breeding for Milk Products in the Tropics. *International Dairy Congress*: 2, 452 p, 1971
- RIBEIRO JMC. Role of Saliva in Tick/Host Interaction. *Experimental & Applied Acarology*: 7, p. 15-20, 1989.
- RIBEIRO JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol*: 32, p. 463-478, 1987.
- RIBEIRO JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis*: 4 (3), p. 143-152, 1995.
- RIEK RF. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal Agriculture Research*: 13, p. 532-552, 1962.
- ROBERTS JA. Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Development of ticks on *Bos Taurus*. *Journal of Parasitology*: 54, p. 663-666, 1968.
- ROBINSON TL, SUTHERLAND IA, SUTHERLAND J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 115 (1-2), p. 160-165, 2007.



ROCHA, CMBM. Importância do Carrapato *Boophilus microplus*, Canestrini, 1887 (Acarina, Ixodidae) no Processo Produtivo do Leite. *Revisão*, UFLA, 1996.

ROWE T, GONDRO C, EMERY D, SANGSTER N. Genomic analyses of *Haemonchus contortus* infection in sheep: abomasal fistulation and two *Haemonchus* strains do not substantially confound host gene expression in microarrays. *Vet Parasitol*: 154, p. 71–81, 2008.

ROZEN S, SKALETSKY HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ S, MISENER S. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

RUIJTER JM, RAMAKERS C, HOOGAARS WMH, KARLEN Y, BAKKER O, VAN DEN HOFF MJB, MOORMAN AFM. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucl Acids Res*: 37, e45, 2009.

SAMISH M. Biocontrol of ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 916, p. 172–178, 2000.

SAUER JR, ESSENBERG RC, BOWMAN AS. Salivary gland ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal Insect Physiology*: 46, p. 1069-1078, 2000.

SCHWAB AE, GEARY TG, BAILLARGEON P, SCHWAB AJ, FECTEAU G. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to *Neospora caninum* and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. *Vet Parasitol*: 165(1-2), p.136-140, 2009.

SEDDON HR. Diseases of Domestic Animals in Australia, Part 3, Arthropod Infestations, Ticks and Mites. Commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra. p. 40, 1967.

SEIFERT GW, SPRINGELL PH, TATCHELL RJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adult of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*: 58, p. 415-430, 1968.

SEIFERT GW. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust J Agri Res*: 22, p. 159-168, 1971.

SEO J, HOFFMAN EP. Probe set algorithms: is there a rational best bet? *BMC Bioinformatics*: 7, p. 395, 2006.

SEO KS, LEE SU, PARK YH, DAVIS WC, FOX LK, BOHACH GA. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4+ and CD8+ T cells. *Infect Immun*: 75, p. 260-269, 2007.

SHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*: 270 (5235), p. 467-470, 1995.

SKOV S, BREGENHOLT S, CLAESSEN MH. MHC class I ligation of human T cells activates the ZAP70 and p56lck tyrosine kinases, leads to an alternative phenotype of the TCR/CD3 zeta-chain, and induces apoptosis. *The Journal of Immunology*: 158 (7), p. 3189-3196, 1997.

SOARES CO. Imunidade contra artrópodes parasitas. *Imunodiagnóstico em medicina veterinária*, p. 111-141, 2001.

SOARES JF, SANGIONI LA, VOGEL FSF, DA SILVA CFB. Human parasitism by *B. microplus* (Acari: Ixodidae), Santa Maria, RS, Brazil. *Cienc Rural*: 37 (5), 2007.

SONENSHINE DE, KOCAN KM, de la FUENTE J. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology*: 22, p. 550– 551, 2006.

STEEN NA, BARKER SC, ALEWOOD PF. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon*: 47 (1), p. 1-10, 2006.

STEKEL D. Microarray Bioinformatics. 1<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

SUTHERST RW, JONES RJ, SCHNITZERLING HJ. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*: 295 p. 320-321, 1982.

SWANSON K, GORODETSKY S, GOOD L, DAVIS S, MUSGRAVE D, STELWAGEN K, FARR V, MOLENAAR A. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect Immun*: 72 (12), p. 7311-7314, 2004.

TAKESHIMA S, MATSUMOTO Y, CHEN J, YOSHIDA T, MUKOYAMA H, AIDA Y. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *Tissue Antigens*: 72(6), p. 525-531, 2008.

TAO W, MALLARD B, KARROW N, BRIDLE B. Construction and application of a bovine immune-endocrine cDNA microarray. *Vet Immunol Immunopathol*: 101, p. 1-17, 2004.

TATCHELL RJ, MOORHOUSE DE. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. *Parasitol*: 58, p. 441-459, 1968.

TEODORO RL, LEMOS AM, MADALENA FE. Effects of Ticks *Boophilus microplus* Infestations on Milk Yield of *Bos taurus*/*Bos indicus* crosses. *Proceeding of the 6th World Congress Genetics Applied to Livestock Production*: 27, p. 137-180, 1998.

TEODORO RL, LEMOS AM, MOREIRA DP, MADALENA FE. Resistência Genética dos Bovinos ao Carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de Touros Mestiços sob Infestação Artificial. *Anais da reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia*, p. 54, 1984.

THIESEN WL. Biologia do Carrapato *Boophilus microplus*. *I Seminário Nacional sobre Parasitose dos Bovinos*, p. 207-215, 1979.

TITUS RG, BISHOP JV, MEJIA JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potencial for these factor to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasitte Immunology*: 28, p. 131-141, 2006.

TSUKITA S, FURUSE M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol*: 14(5), p. 531-536, 2002.

UTECH KBW, WHARTON RH. Breeding for Resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman x Australian Illawarra Shorthorn Cattle. *Australian Veterinary Journal*: 58, p. 41-46, 1982.

UTECH KBW, SEIFERT GW, WHARTON RH. Breeding Australian Illawarra Shorthorn Cattle for Resistance to *Boophiplus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. *Australian Journal Agricultural Research*: 29 (2), p. 411-422, 1978.

UTECH, KBW. Prospects of Selection for Tick Resistance in British Breeds of Cattle. The Future of the British Breeds in Tick Areas. *Queensland Agricultural College*: s1, p. 30-38, 1979.

VANDERSONPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*: 3 (7), research0034, 2002.

VANDERSONPELE J, KUBISTA M, PFAFFL MW. Reference gene validation for improved normalization. In: Real-Time PCR: current technology and applications. Caister Academic Press, 2009.

VILLARES JB. Climatologia Zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Boletim Indústria Animal*: 4, p. 60-86, 1941.

WAGLAND BM. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. *Australian Journal Agricultural Research*: 29, p. 401-409, 1978.

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*: 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*: 9, p. 171-182, 1970.

WIKEL SK. Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 28, p. 586–590, 1979.

WIKEL SK, ALLEN JR. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology*: 32, p. 457–465, 1978.

WIKEL SK. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol*: 41, p. 1-22, 1996.

WIKEL SK. Tick host immunology: significance advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*: 13, p. 383-389, 1997.

WILLADSEN P, COBON G, MCKENNA RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol*: 18, p. 241-246, 1996.

WILLADSEN P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol*: 138, p. 161-168, 2006.

WONG ML, MEDRANO JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*: 39, p. 75-85, 2005.

ZHENG SG, WANG JH, GRAY JD, SOUCIER H, HORWITZ DA. Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *The Journal of Immunology*: 172, p. 5213-5221, 2004.

Anexo 1: Lista dos transcritos diferencialmente expressos encontrados nos contrastes analisados. Os valores de expressão são do segundo grupo em relação ao primeiro em cada um dos contrastes.

| Probe                | Gene name                                                                                | RMA  | GCRMA | MAS5.0 | Média |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|-------|
| R0 x R24             |                                                                                          |      |       |        |       |
| BtAffx.29968.1.S1_at | Unknown                                                                                  | 6,61 | -     | 6,91   | 6,76  |
| Bt.19287.1.A1_at     | lymphocyte antigen 6 complex, locus D                                                    | 2,28 | -     | 3,71   | 2,91  |
| Bt.23026.1.A1_at     | tropomyosin 1 (alpha)                                                                    | 2,27 | 2,57  | 2,59   | 2,47  |
| Bt.3448.1.S1_at      | mitogen-activated protein kinase 6                                                       | 2,24 | -     | 2,18   | 2,21  |
| Bt.29017.1.A1_at     | ubiquitin specific peptidase 15                                                          | 2,02 | 2,26  | -      | 2,14  |
| Bt.12300.2.S1_at     | myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult                                            | 0,46 | -     | 0,37   | 0,42  |
| R0 x R48             |                                                                                          |      |       |        |       |
| Bt.23449.1.S1_at     | fatty acyl CoA reductase 2                                                               | 3,72 | -     | 6,13   | 4,77  |
| Bt.6556.1.S1_at      | regakine 1                                                                               | 3,61 | 5,00  | 4,46   | 4,32  |
| Bt.19195.1.A1_at     | coagulation factor XIII, A1 polypeptide                                                  | 3,05 | 4,36  | 3,56   | 3,62  |
| Bt.5889.1.S1_at      | RNA binding motif protein 24                                                             | 3,07 | 3,72  | -      | 3,38  |
| Bt.12136.1.S1_at     | similar to C4b-binding protein alpha chain precursor (C4bp) (Proline-rich protein) (PRP) | 2,94 | 3,64  | 3,21   | 3,25  |
| Bt.28518.1.S1_at     | pancreatic trypsin inhibitor                                                             | 2,72 | 3,39  | 2,89   | 2,99  |
| Bt.24864.2.A1_at     | tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)           | 2,95 | -     | 2,57   | 2,75  |
| Bt.13542.1.S1_at     | complement factor B                                                                      | 2,40 | 2,97  | 2,27   | 2,53  |
| Bt.19845.2.A1_at     | coagulation factor XIII, A1 polypeptide                                                  | 2,34 | 2,85  | 2,36   | 2,51  |
| Bt.23278.1.S1_at     | allograft inflammatory factor 1                                                          | 2,18 | 2,82  | -      | 2,48  |

|                    |                                                                    |      |      |      |      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.24023.1.A1_at   | GATA-6                                                             | 2,17 | 2,73 | -    | 2,43 |
| Bt.9510.2.A1_a_at  | T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4                | 2,21 | 2,60 | -    | 2,40 |
| Bt.21175.1.S1_at   | GDNF family receptor alpha 4                                       | -    | 2,85 | 2,01 | 2,39 |
| Bt.21379.2.S1_at   | Guanine deaminase                                                  | 2,14 | 2,55 | 2,45 | 2,37 |
| Bt.209.3.S1_at     | Lysozyme                                                           | 2,27 | -    | 2,40 | 2,33 |
| Bt.21048.2.S1_at   | Unknown                                                            | 2,44 | 2,19 | 2,32 | 2,32 |
| Bt.21950.1.S1_s_at | chemokine (C-C motif) ligand 16                                    | -    | 2,44 | 2,17 | 2,30 |
| Bt.19028.1.A1_at   | transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6 | -    | 2,45 | 2,12 | 2,28 |
| Bt.12477.1.S1_a_at | tropomyosin 2 (beta)                                               | 2,18 | 2,44 | 2,21 | 2,27 |
| Bt.28518.1.S1_s_at | Spleen trypsin inhibitor                                           | 2,05 | 2,46 | 2,25 | 2,25 |
| Bt.20074.1.S1_a_at | GrpE-like 2                                                        | 2,03 | 2,44 | -    | 2,23 |
| Bt.13701.1.A1_at   | Unknown                                                            | -    | 2,19 | 2,17 | 2,18 |
| Bt.2047.1.S1_at    | Adrenomedullin                                                     | 2,09 | -    | 2,19 | 2,14 |
| Bt.20970.1.A1_at   | kinesin family member 21A                                          | -    | 0,45 | 0,47 | 0,46 |
| Bt.24343.1.A1_at   | claudin 1                                                          | 0,44 | 0,37 | -    | 0,40 |
| Bt.24343.2.S1_at   | claudin 1                                                          | 0,35 | 0,26 | 0,34 | 0,31 |

R24 x R48

|                  |                                                                                          |      |      |      |      |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.7066.1.S1_at  | arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein                                           | 2,55 | 4,97 | 2,73 | 3,26 |
| Bt.9455.1.A1_at  | CD5 molecule-like                                                                        | 2,76 | 3,86 | 3,04 | 3,19 |
| Bt.12136.1.S1_at | similar to C4b-binding protein alpha chain precursor (C4bp) (Proline-rich protein) (PRP) | 2,66 | 3,30 | 3,10 | 3,01 |
| Bt.20836.1.S1_at | mannose receptor, C type 1                                                               | 2,48 | 4,06 | 2,41 | 2,89 |
| Bt.21576.1.S1_at | complement component 1, q subcomponent, C chain                                          | 2,42 | 3,48 | 2,43 | 2,74 |



|                    |                                                                   |      |      |      |      |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.21950.1.S1_at   | chemokine (C-C motif) ligand 16                                   | 2,48 | 3,33 | 2,31 | 2,67 |
| Bt.7033.1.S1_at    | folate receptor 2 (fetal)                                         | 2,16 | 3,66 | 2,25 | 2,61 |
| Bt.20164.1.S1_at   | complement component 1, q subcomponent, B chain                   | 2,26 | 2,79 | 2,72 | 2,58 |
| Bt.1577.1.S1_at    | complement component 1, q subcomponent, A chain                   | 2,37 | 2,97 | 2,43 | 2,58 |
| Bt.12924.1.S1_at   | brain ribonuclease                                                | 2,32 | 2,71 | 2,39 | 2,47 |
| Bt.23089.1.S1_at   | signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1 | 2,33 | 2,74 | 2,24 | 2,43 |
| Bt.9532.1.S1_at    | CD209 molecule                                                    | 2,20 | 2,57 | 2,51 | 2,42 |
| Bt.21950.1.S1_s_at | chemokine (C-C motif) ligand 16                                   | 2,08 | 2,59 | 2,56 | 2,40 |
| Bt.287.1.S1_at     | ribonuclease, RNase A family, k6                                  | 2,30 | -    | 2,43 | 2,37 |
| Bt.18889.1.S1_at   | linker for activation of T cells family, member 2                 | -    | 2,40 | 2,13 | 2,26 |
| Bt.19405.1.A1_at   | purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13                    | 2,15 | -    | 2,06 | 2,10 |
| Bt.2262.1.S1_at    | cysteine and glycine-rich protein 2                               | -    | 2,05 | 2,01 | 2,03 |
| Bt.24343.2.S1_at   | claudin 1                                                         | 0,48 | 0,43 | -    | 0,46 |
| Bt.3448.1.S1_at    | mitogen-activated protein kinase 6                                | 0,41 | 0,27 | 0,39 | 0,35 |
| S0 x S24           |                                                                   |      |      |      |      |
| Bt.23666.1.A1_at   | Coagulation factor V                                              | -    | 2,79 | 2,22 | 2,49 |
| Bt.20905.1.S1_at   | zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa                  | -    | 0,44 | 0,48 | 0,46 |
| S0 x S48           |                                                                   |      |      |      |      |
| S24 x S48          |                                                                   |      |      |      |      |
| Bt.5226.1.S1_at    | secreted frizzled-related protein                                 | 2,11 | -    | 2,15 | 2,13 |

|                    |                                                    | R0 x S0 |      |      |      |
|--------------------|----------------------------------------------------|---------|------|------|------|
| Bt.14371.1.A1_at   | Unknown                                            | 3,66    | 5,36 | 4,40 | 4,42 |
| Bt.24023.1.A1_at   | GATA-6                                             | 3,04    | 5,77 | 3,24 | 3,84 |
| Bt.9659.1.S1_a_at  | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 | 2,66    | -    | 4,51 | 3,46 |
| Bt.19792.1.A1_at   | indoleamine 2,3-dioxygenase 1                      | 3,12    | -    | 3,82 | 3,45 |
| Bt.16966.1.S1_at   | chemokine (C-X-C motif) ligand 10                  | 2,42    | 4,33 | 3,40 | 3,29 |
| Bt.27759.1.A1_at   | indoleamine 2,3-dioxygenase 1                      | 2,86    | 3,73 | 2,47 | 2,98 |
| Bt.5306.2.S1_a_at  | titin-cap (telethonin)                             | -       | 2,87 | 2,15 | 2,49 |
| Bt.16350.2.A1_s_at | guanylate binding protein 5                        | 2,70    | -    | 2,76 | 2,73 |
| Bt.20905.1.S1_at   | zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa   | -       | 3,25 | 2,29 | 2,73 |
| Bt.9693.1.S1_at    | serpin peptidase inhibitor, clade B like           | 2,78    | -    | 2,65 | 2,71 |
| Bt.21048.2.S1_at   | Unknown                                            | 2,08    | -    | 3,20 | 2,58 |
| Bt.5306.1.S1_at    | titin-cap (telethonin)                             | 2,12    | 3,27 | 2,48 | 2,58 |
| Bt.28182.1.A1_at   | regulator of G-protein signaling 5                 | -       | 2,69 | 2,33 | 2,50 |
| Bt.5153.1.S1_at    | SPARC-like 1 (hevin)                               | 2,47    | -    | 2,53 | 2,50 |
| Bt.3139.1.A1_at    | Unknown                                            | 2,33    | 2,85 | 2,32 | 2,49 |
| Bt.27058.1.A1_at   | integrin, alpha 8                                  | 2,35    | 2,47 | -    | 2,41 |
| Bt.23026.1.A1_at   | tropomyosin 1 (alpha)                              | 2,13    | -    | 2,72 | 2,41 |
| Bt.23677.1.A1_at   | retinol dehydrogenase 16                           | 2,11    | -    | 2,51 | 2,30 |
| Bt.8669.1.S1_at    | Unknown                                            | 2,09    | 2,48 | 2,15 | 2,24 |
| Bt.21048.1.S1_at   | Unknown                                            | 2,13    | -    | 2,17 | 2,15 |
| Bt.22103.1.S1_at   | Unknown                                            | -       | 2,23 | 2,04 | 2,13 |
| Bt.18819.1.A1_at   | Unknown                                            | 0,43    | -    | 0,35 | 0,39 |
| Bt.24343.2.S1_at   | claudin 1                                          | 0,35    | 0,26 | 0,34 | 0,31 |

|                  |                 |      |      |      |      |
|------------------|-----------------|------|------|------|------|
| Bt.14563.1.A1_at | Unknown         | 0,25 | 0,18 | 0,25 | 0,22 |
| Bt.4784.1.S1_at  | Lactoperoxidase | 0,27 | -    | 0,08 | 0,14 |

R24 x S24

|                  |                                                              |      |      |      |      |
|------------------|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.21773.1.A1_at | guanylate binding protein 5                                  | 2,32 | 3,47 | 2,40 | 2,68 |
| Bt.16181.1.A1_at | Unknown                                                      | 2,02 | 2,36 | 2,48 | 2,27 |
| Bt.19678.1.A1_at | small nucleolar RNA, C/D box 116 cluster                     | -    | 2,11 | 2,37 | 2,24 |
| Bt.19227.1.S1_at | Unknown                                                      | -    | 2,34 | 2,04 | 2,18 |
| Bt.25090.1.A1_at | flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)           | 0,45 | -    | 0,46 | 0,45 |
| Bt.28910.1.A1_at | Unknown                                                      | 0,41 | -    | 0,36 | 0,38 |
| Bt.22867.1.S1_at | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha, type 1 | 0,49 | 0,44 | 0,25 | 0,38 |
| Bt.2632.1.S1_at  | secreted phosphoprotein 1                                    | 0,37 | -    | 0,36 | 0,37 |
| Bt.24314.1.A1_at | fructose-1,6-bisphosphatase 1                                | 0,35 | -    | 0,34 | 0,34 |
| Bt.13028.1.S1_at | periostin, osteoblast specific factor                        | 0,32 | 0,26 | 0,34 | 0,30 |
| Bt.25576.1.A1_at | SLIT and NTRK-like family, member 1                          | 0,22 | -    | 0,14 | 0,17 |

R48 x S48

|                    |                                                              |      |      |      |      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.13789.1.A1_at   | CD14 molecule                                                | 0,50 | -    | 0,48 | 0,49 |
| Bt.12875.1.S1_at   | epithelial membrane protein 3                                | -    | 0,48 | 0,50 | 0,49 |
| Bt.3794.1.S1_at    | phosphofructokinase, platelet                                | -    | 0,46 | 0,50 | 0,48 |
| Bt.5472.1.S1_at    | lectin, galactoside-binding, soluble, 1                      | 0,49 | 0,44 | 0,49 | 0,47 |
| Bt.25729.1.A1_at   | mast cell antigen 32 -like                                   | 0,48 | -    | 0,45 | 0,46 |
| Bt.22867.1.S1_at   | major histocompatibility complex, class II, DQ alpha, type 1 | 0,43 | 0,49 | -    | 0,46 |
| Bt.21950.1.S1_s_at | chemokine (C-C motif) ligand 16                              | 0,49 | 0,37 | 0,48 | 0,44 |

|                    |                                                                           |      |      |      |      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| Bt.4140.1.S1_at    | cytochrome b-245, alpha polypeptide                                       | 0,49 | 0,37 | 0,48 | 0,44 |
| Bt.5061.1.S1_at    | phosphofructokinase, liver                                                | -    | 0,38 | 0,50 | 0,44 |
| Bt.8140.1.S1_at    | Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide      | 0,44 | -    | 0,40 | 0,42 |
| Bt.23278.1.S1_at   | allograft inflammatory factor 1                                           | 0,46 | 0,34 | 0,47 | 0,42 |
| Bt.23488.1.S1_at   | complement factor properdin                                               | 0,42 | -    | 0,41 | 0,41 |
| Bt.13975.2.A1_at   | phospholipase A1 member A                                                 | 0,44 | -    | 0,39 | 0,41 |
| Bt.11315.1.A1_at   | similar to Dermatan-sulfate epimerase-like protein                        | 0,49 | 0,34 | 0,42 | 0,41 |
| Bt.23418.1.S1_at   | fibronectin 1                                                             | 0,42 | -    | 0,40 | 0,41 |
| Bt.9532.1.S1_at    | CD209 molecule                                                            | 0,44 | 0,37 | 0,35 | 0,39 |
| Bt.24345.1.S1_at   | complement factor B                                                       | 0,49 | 0,29 | 0,40 | 0,39 |
| Bt.21343.2.A1_a_at | glia maturation factor, gamma                                             | 0,40 | 0,32 | 0,43 | 0,38 |
| Bt.24760.1.S1_at   | similar to immunoglobulin-like transcript 5 protein                       | 0,45 | 0,33 | 0,34 | 0,37 |
| Bt.21379.2.S1_at   | Guanine deaminase                                                         | 0,38 | 0,30 | 0,41 | 0,36 |
| Bt.21576.1.S1_at   | complement component 1, q subcomponent, C chain                           | 0,35 | -    | 0,31 | 0,33 |
| Bt.284.1.S1_at     | Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)                     | 0,36 | 0,26 | 0,40 | 0,33 |
| Bt.7066.1.S1_at    | arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein                            | 0,37 | 0,22 | 0,37 | 0,31 |
| Bt.13542.1.S1_at   | complement factor B                                                       | 0,34 | 0,25 | 0,35 | 0,31 |
| Bt.643.1.S1_at     | C-C motif chemokine 23-like                                               | 0,35 | 0,24 | 0,34 | 0,31 |
| Bt.27043.1.A1_at   | Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide      | 0,34 | 0,23 | 0,34 | 0,30 |
| Bt.21950.1.S1_at   | chemokine (C-C motif) ligand 16                                           | 0,32 | 0,24 | 0,30 | 0,28 |
| Bt.8939.1.S1_at    | TYRO protein tyrosine kinase binding protein                              | 0,31 | 0,20 | 0,32 | 0,27 |
| Bt.9510.2.A1_a_at  | T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4                       | 0,43 | 0,41 | 0,09 | 0,25 |
| Bt.18080.3.A1_at   | similar to tescalcin                                                      | 0,31 | -    | 0,18 | 0,24 |
| Bt.12136.1.S1_at   | similar to C4b-binding protein alpha chain precursor (C4bp) (Proline-rich | 0,26 | 0,17 | 0,21 | 0,21 |

|                   |                                                                 |      |      |      |      |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
|                   | protein) (PRP)                                                  |      |      |      |      |
| Bt.20521.2.S1_at  | CD84 molecule                                                   | 0,50 | -    | 0,05 | 0,16 |
| Bt.6556.1.S1_at   | regakine 1                                                      | 0,16 | -    | 0,13 | 0,14 |
| Bt.5324.1.S1_s_at | antigen processing and presentation MHC class I protein complex | 0,07 | 0,01 | 0,02 | 0,03 |

---