Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos

Lilian Giotto Zaros

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2006

Lilian Giotto Zaros
Licenciada em Ciências Biológicas

Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos

Orientador:
Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Zaros, Lilian Giotto
Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos / Lilian Giotto Zaros. - - Piracicaba, 2006.
121 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Expressão gênica 2. Gado zebu 3. Gastrenterites parasitárias de ruminantes 4. Imunologia veterinária 5. Nematóides 6. Resistência genética animal I. Título

CDD 636.2082

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais José Roberto e Dulcinéia

Por guiarem meus caminhos rumo ao conhecimento e ao saber...

Pelo apoio e coragem nas dificuldades surgidas...

Pelo exemplo de amor, cumplicidade e respeito a ser seguido por toda a minha vida !

À minha irmã Aline

Pelos momentos de felicidade, carinho, amizade e amor !

Ao meu noivo Henrique

Por mostrar-me que o verdadeiro amor pode aflorar quando e onde menos se espera....

E especialmente por me fazer feliz !

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela orientação, oportunidade, ensinamentos, por viabilizar, acreditar e confiar neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro F. T. Amarante pela oportunidade em poder aprofundar meus conhecimentos em Parasitologia, pelo consentimento na utilização do Laboratório de Parasitologia da Unesp de Botucatu, pela colaboração e orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires e sua equipe da Fazenda Figueira, representados por Laísse G. de Lima e José Renato Gonçalves, pelo manejo dos animais e auxílio na fase experimental.

Ao Prof. Dr. Irineu U. Packer pela atenção e apoio nas análises estatísticas.

A Patrízia Bricarello pelos valiosos ensinamentos em Imunologia e Parasitologia, pela convivência, carinho e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP que tiveram essencial participação na grande aventura a que nos submetemos para que o abate dos animais experimentais fosse realizado: Thaís Penatti, Clarissa Cassoli, Marcelo Marchesin e Jorge L. F. de Andrade.

A amiga Erika Jorge pelo auxílio na construção das bibliotecas de cDNA.

Ao amigo Mateus Patrício pelo auxílio nas análises de bioinformática.

A amiga Helena J. Alves pelos ensinamentos e compartilhamento de sua experiência em análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

Ao pesquisador Vagner Benedito pelos momentos de discussão sobre os métodos de quantificação da expressão de RNAm, pela paciência e disposição.

Ao mestrando Fábio de Carvalho pelo auxílio e atenção na utilização do Programa REST.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia da Unesp de Botucatu, Maria Ângela Batista Gomes e Valdir Ângelo Paniguel, pelo auxílio durante as análises parasitológicas.

As secretárias do Departamento de Zootecnia, Giovana Maria de Oliveira e Vera Lúcia Graciano pela atenção e carinho nesses anos de estudo.

Ao grande amigo Marcelo Zerillo pelo companheirismo na aprendizagem das técnicas de biologia molecular nos Projetos Genoma. Pelas cantorias de "More than words" durante o preparo das bibliotecas de cDNA. Pela amizade de sempre, mesmo agora estando distante.

A amiga e colega de trabalho Rachel Gomes Balan pelo auxílio na interminável inoculação dos clones das bibliotecas de cDNA, nas mini-preps da vida e principalmente pela amizade e companheirismo durante todos estes anos.

A todos os queridos amigos que já passaram pelo Laboratório de Biotecnologia Animal e com os quais sinto-me honrada e feliz por ter compartilhado parte da minha vida: Amauri Wenceslau, Déborah Ruy, Kátia Nones e Marcelo Zerillo. Aos amigos que ainda continuam por lá e que fazem com que a rotina laboratorial e os momentos difíceis sejam muito mais leves: Helena J. Alves, Raquel L. R. Campos, Marcel Ambo, Millor F. do Rosário, Kerli Ninov, Erik Almeida, Nirlei Silva. A todos agradeço por tudo que vivemos e juntos aprendemos.

A minha grande amiga Luciana Borelli e sua mãe, Teresa Borelli, pelo apoio e incentivo no início desta caminhada, e principalmente pela amizade e carinho.

As queridas amigas Edna, Edite, Eliane e Elisete Rodrigues, pelo incentivo constante e por todo o carinho de sempre.

A maravilhosa família potiguar Rocha de Medeiros pelo exemplo de incentivo e valorização do estudo e do conhecimento, e principalmente pela carinhosa acolhida.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho....

Agradeço!!

SUMÁRIO

RESUMO..... 8
ABSTRACT..... 9
LISTA DE FIGURAS..... 10
LISTA DE TABELAS..... 13
1 INTRODUÇÃO..... 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 16
2.1 Importância econômica..... 16
2.2 Principais nematódeos gastrintestinais e seus efeitos no hospedeiro..... 17
2.3 Estratégias de controle..... 18
2.4 A resposta imune..... 19
2.5 A resposta imune T_H1 e T_H2..... 20
2.6 Citocinas..... 22
2.7 Estratégias para estudar genes de importância na resposta a endoparasitas..... 32
2.7.1 ESTs para identificar genes..... 33
2.7.2 PCR em tempo real para estudo e/ou validação de genes previamente conhecidos 34
2.8 Métodos de quantificação da expressão de RNA mensageiro..... 35
2.9 Aplicações de PCR em tempo real em estudos realizados com bovinos..... 36
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 38
3.1 Análise de ESTs..... 38
3.1.1 Preparo dos animais..... 38
3.1.2 Exames parasitológicos 38
3.1.3 Coleta de tecidos..... 40
3.1.4 Extração de RNA total..... 40
3.1.5 Isolamento do RNA mensageiro..... 40
3.1.6 Construção das bibliotecas de cDNA..... 41
3.1.7 Mini-preparação do DNA plasmidial..... 46
3.1.8 PCR da mini-preparação do DNA plasmidial..... 47
3.1.9 Reação de seqüenciamento..... 47
3.1.10 Purificação da reação de seqüenciamento..... 48

3.1.11 Análise das seqüências..... 48
3.1.12 Análise de polimorfismos..... 52
3.2 Análise da expressão gênica..... 52
3.2.1 Animais..... 52
3.2.2 Extração de RNA total..... 52
3.2.3 Síntese de cDNA..... 53
3.2.4 Desenho dos *primers*..... 53
3.2.5 Confirmação da especificidade dos *primers*..... 55
3.2.6 Eficiência de amplificação..... 55
3.2.7 Escolha do gene controle..... 56
3.2.8 Reações de PCR em tempo real..... 56
3.2.9 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro..... 57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 59
4.1 Exames parasitológicos..... 59
4.2 Extração do RNA total e seleção do RNA mensageiro..... 63
4.3 Construção da biblioteca de cDNA..... 64
4.4 Mini-preparação do DNA plasmidial..... 65
4.5 Avaliação do tamanho dos insertos clonados..... 67
4.6 Análise das ESTs 68
4.6.1 Categorização das ESTs..... 70
4.6.2 *Northern* Digital..... 74
4.7 Análise de polimorfismo..... 80
4.8 Análise da expressão gênica..... 82
4.8.1 Extração de RNA total..... 82
4.8.2 PCR em tempo real..... 83
4.8.3 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro..... 89
5 CONCLUSÕES..... 100
REFERÊNCIAS..... 101
ANEXOS..... 114

RESUMO

Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos

Este trabalho teve por objetivo identificar e estudar a expressão de genes envolvidos na resposta imune a endoparasitas gastrintestinais em bovinos. Contagem periódica de ovos por grama de fezes (OPG) e análises de coproculturas foram realizadas para identificar animais resistentes e susceptíveis a endoparasitas gastrintestinais. A contagem de OPG permitiu identificar estes animais, sendo que o grupo susceptível apresentou uma contagem 20 vezes superior ao grupo resistente ($P<0,001$). Análises de coproculturas permitiram concluir que a infestação em bovinos foi mista, com a predominância dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* e menor incidência de *Oesophagostomum.* Para a identificação dos genes, foi utilizada a metodologia EST (*Expressed Sequence Tag)* e foram construídas duas bibliotecas de clones de cDNA obtidos a partir da mucosa do abomaso, intestino delgado e nódulos linfáticos abomasais de bovinos resistentes (ER1) e susceptíveis (ES1) a nematódeos gastrintestinais. Foram geradas 2496 ESTs de cada biblioteca. Destas, 1664 e 1898 foram válidas para as bibliotecas ER1 e ES1, respectivamente. Dentre as 2323 sequências únicas obtidas foram identificados vários produtos gênicos relacionados à resposta imune, tais como moléculas de classe I e II do MHC, imunoglobulinas, interleucinas, lisozima e pepsinogênio. Para a quantificação da expressão de RNA mensageiro, foi utilizada a metodologia de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real, onde foram analisados 10 genes relacionados à polarização da resposta imune (as interleucinas IL-2, IL-4, IL-8, IL-12p35 e IL-13, as citocinas TNF-α, IFN-γ, MCP-1α e MCP-2 e a glicoproteína mucina 1-MUC1). As análises de expressão gênica realizadas na mucosa do abomaso revelaram aumento nos níveis de RNAm para IL-4 ($P<0,018$), IL-13 ($P<0,002$) e diminuição de TNF-α ($P<0,0001$) nos animais resistentes; nos nódulos linfáticos abomasais houve aumento de IL-4 ($P<0,019$) nos animais resistentes e de IFN-γ ($P<0,007$) nos animais susceptíveis; no intestino delgado houve aumento de IL-4 ($P<0,01$) e IL-13 ($P<0,045$) nos animais resistentes, ao contrário de IL-2 ($P<0,047$), IL-12p35 ($P<0,029$), IFN-γ ($P<0,004$) e MCP-1 ($P<0,03$), cujos níveis de RNAm foram maiores nos animais susceptíveis. No abomaso dos animais resistentes houve menor expressão de pepsinogênio ($P<0,025$) e maior de lisozima ($P<0,042$). Em conclusão, a estratégia utilizada permitiu a identificação de vários genes envolvidos na resposta imune e a descoberta inédita de que *Bos indicus* resistentes a parasitas gastrintestinais apresentam uma resposta T_H2 polarizada, em contraste aos animais susceptíveis, que apresentam uma resposta T_H1.

Palavras-chave: Expressão gênica; Resposta imune; *Bos indicus*; Resistência; Endoparasitas; *Haemonchus* spp.; *Cooperia* spp.; *Oesophagostomun* spp

ABSTRACT

Descovery and study of genes involved in immune response against gastrointestinal nematodes in cattle

The aim of this work was identify genes related to immune response to gastrointestinal nematodes in cattle. The periodic counts of eggs per gram (EPG) of feces and coproculture analysis were done to identify the resistant and susceptible animals. The EPG counts allowed us to identify these animals. It was twenty-fold higher in susceptible group ($P<0.001$). The coproculture analysis allowed us to conclude that the infestation is predominantly characterized by *Cooperia* spp. and *Haemonchus* spp. and a low incidency of *Oesophagostomum.* To identify the genes, it was used the EST (Expressed Sequence Tags) methodology and constructed two cDNA libraries from abomasum, abomasum lymph nodules and small intestine from resistant (ER1) and susceptible (ES1) cattle. It was generated 2496 ESTs from each library. From these, 1664 and 1898 ESTs were valids to ER1 and ES1 libraries, respectively. Among the 2323 unique sequences were identifyed several genes related to immune response, such as MHC class I and II molecules, immunoglobulins, interleukins, lysozyme and pepsinogen. To study the gene expression, it was used the reverse transcription and real-time polymerase chain reaction methodology to quantify the messager RNA expression of 10 genes related to polarization of immune response (the interleukins IL-2, IL-4, IL-8, IL-12p35 e IL-13, the cytokines TNF-α, IFN-γ, MCP-1α and MCP-2 and the glycoprotein mucin 1-MUC1). The gene expression analysis in the abomasum reveled that IL-4 ($P<0,018$) and IL-13 ($P<0,002$) were up-regulated and TNF-α ($P<0,0001$) was down-regulated in resistant group; in the abomasum lymph nodules IL-4 ($P<0,019$) and IFN-γ ($P<0,007$) were both up-regulated in resistant and susceptible group, respectively; in the small intestine IL-4 ($P<0,01$) and IL-13 ($P<0,045$) were up-regulated in resistant group and IL-2 ($P<0,047$), IL-12p35 ($P<0,029$), IFN-γ ($P<0,004$) and MCP-1 ($P<0,03$) were down-regulated in susceptible one. In the abomasum from resistant group, pepsinogen was down-regulated ($P<0,025$) and lysozyme was up-regulated ($P<0,042$). In conclusion, the strategy used allowed us to identify several genes involved in immune response and the inedit discovery that *Bos indicus* resistant to gastrointestinal nematodes present a T_H2-type response, in contrast to susceptible animals that present a T_H1-type response.

Keywords: Gene expression; Immune response; *Bos indicus*; Resistance; Endoparasite; *Haemonchus* spp.; *Cooperia* spp.; *Oesophagostomun* spp

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo das etapas envolvidas na elaboração das bibliotecas de cDNA..... 45

Figura 2 – Etapas da síntese de cDNA..... 53

Figura 3 – Contagem média de OPG para cada animal monitorado no período de 31 de outubro de 2003 a 26 de janeiro de 2004..... 59

Figura 4 – Porcentagem de larvas infectantes de endoparasitas gastrintestinais identificados nas culturas de fezes de bovinos separados de acordo com a contagem de OPG.... 61

Figura 5 – Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais do RNA ribossômico (28S e 18S)..... 64

Figura 6 – Gel de agarose 1% para verificação da quantidade de cDNA e o tamanho dos insertos de cada fração da biblioteca ER1 64

Figura 7 – Gel de agarose 1% para verificação da quantidade de cDNA e o tamanho dos insertos de cada fração da biblioteca ES1..... 65

Figura 8 – Gel de agarose 0,8% utilizado para verificar a qualidade e estimar a concentração do DNA plasmidial da biblioteca ER1..... 66

Figura 9 – Gel de agarose 0,8% utilizado para verificar a qualidade e estimar a concentração do DNA plasmidial da biblioteca ES1..... 66

Figura 10 – Gel de agarose 0,8% para verificação do tamanho dos insertos clonados da biblioteca ER1..... 67

Figura 11 – Gel de agarose 0,8% para verificação do tamanho dos insertos clonados da

biblioteca ES1..... 67

Figura 12 – Distribuição das seqüências ER1 em *contigs*..... 69

Figura 13 – Distribuição das seqüências ES1 em *contigs*..... 69

Figura 14 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de componente celular.. 70

Figura 15 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de processo biológico... 71

Figura 16 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de função molecular..... 71

Figura 17 – Razão da expressão gênica no abomaso para o gene controle RPL-19, para pepsinogênio (PEP) e lisozima (LIS), entre os grupos resistente e susceptível (R/S)..... 77

Figura 18 – Análise de polimorfismos para imunoglobulinas e moléculas de classe I e II do MHC entre *Bos indicus* e *Bos taurus*..... 80

Figura 19 – Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S, 18S e 5S)..... 83

Figura 20 – Verificação dos produtos de RT-PCR esperados..... 84

Figura 21 – Curva de *melting* para o gene MCP-1..... 84

Figura 22 – Curvas de diluições geradas do PCR em tempo real para IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, IL-13 e TNF-α..... 86

Figura 23 – Curvas de diluições geradas do PCR em tempo real para IFN-γ, MUC-1, MCP-1, MCP-2, RPL-19, GAPDH, PEP e LIS..... 87

Figura 24 – Razão da expressão gênica no abomaso (AB), nódulos linfáticos abomasais (NL) e intestino delgado (ID) para os genes controle RPL-19 e GAPDH, entre os grupos resistente e susceptível (R/S)..... 88

Figura 25 – Razão da expressão gênica no abomaso entre os grupos resistente e susceptível (R/S), normalizado para o gene controle (RPL-19)..... 90

Figura 26 – Razão da expressão gênica nos nódulos linfáticos abomasais entre os grupos resistente e susceptível, normalizado para o gene controle (RPL-19)..... 90

Figura 27 – Razão da expressão gênica no intestino delgado entre os grupos resistente e susceptível, normalizado para o gene controle (RPL-19)..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Característica das famílias de citocinas..... 22

Tabela 2 – Termos utilizados nas análises de bioinformática..... 48

Tabela 3 – Seqüência, exons e tamanho dos fragmentos amplificados em cada par de *primer* desenhado..... 54

Tabela 4 – Condições das reações de PCR para os genes estudados..... 56

Tabela 5 – Média ± desvio padrão da contagem de OPG de cada animal pertencente ao grupo resistente e susceptível, selecionado no período de 31 de outobro de 2003 a 26 de janeiro de 2004..... 60

Tabela 6 – Análises da carga parasitária..... 63

Tabela 7 – Perfil das bibliotecas ER1 e ES1..... 68

Tabela 8 – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs..... 74

Tabela 9 – Polimorfismos de citocinas e mucinas 81

Tabela 10 – Temperatura de *melting*..... 85

1 INTRODUÇÃO

Nematódeos pertencentes à família dos trichostrongilideos são os principais responsáveis por endoparasitoses que acometem rebanhos bovinos nas regiões tropicais. As espécies do gênero *Haemonchus* e *Cooperia* são as mais comuns e podem causar anemia, perda de peso, diminuição do potencial reprodutivo e produtivo (CORWIN, 1997), resultando em grandes perdas na produção animal decorrentes das altas taxas de mortalidade, dos gastos com medicamentos e práticas de controle (LIMA, 1998).

O combate a estes endoparasitas normalmente é feito pela administração de drogas anti-helmínticas. Estes tratamentos podem ser ineficazes, custosos e prejudiciais ao rebanho, devido à possibilidade de deixar resíduos na carne, no leite, nas fezes produzidas pelos animais, e assim colocar em risco a saúde humana e/ou contaminação do meio ambiente. Além disso, a administração de drogas anti-helmínticas pode colaborar para a rápida seleção de parasitas resistentes aos vermífugos dificultando o tratamento da doença (ECHEVARRIA et al., 1996).

Assim, a crescente demanda por níveis reduzidos de drogas nos derivados animais e no ambiente, bem como a possibilidade do desenvolvimento de resistência aos compostos anti-helmínticos, têm levado à necessidade da utilização de estratégias que promovam o uso mínimo de compostos químicos na produção animal (BARGER, 1989; BEH; MADDOX, 1996; GASBARRE, 1997; SONSTEGARD; GASBARRE, 2001).

Nesse contexto, a identificação de genes envolvidos na resposta imune a endoparasitas utilizando a metodologia EST (*Expressed Sequence Tags*) é um primeiro passo importante que poderá permitir a seleção de animais resistentes a tais nematódeos, já que parte da variação natural desta resistência está sob controle genético (BARGER, 1989; GRAY; GILL, 1993; SONSTEGARD; GASBARRE, 2001). Essa metodologia visa o seqüenciamento de DNA complementar ao RNA mensageiro (cDNAs) gerados a partir de uma população de RNA mensageiro (RNAm) de interesse. A informação contida nas 150 a 500 bases de nucleotídeos seqüenciados das extremidades dos fragmentos de cDNA permite a identificação preliminar e a localização das respectivas seqüências nos cromossomos (ADAMS et al., 1991).

O rápido progresso nas pesquisas genômicas com diversos organismos, tais como: levedura, mosca de frutas, nematódeos, camundongos, aves, bovinos, suínos e humanos, tem sido guiado pela combinação de mapeamento, seqüenciamento e identificação de porções expressas de cada genoma, utilizando-se a metodologia EST (SMITH et al., 2001). Seu principal objetivo é

maximizar a descoberta de genes expressos nos tecidos estudados, e validar essas informações para posteriores estudos genômicos comparativos, além da utilização dos genes descobertos em estudos de quantificação da expressão de RNAm (SONSTEGARD et al., 2002). Para isso, a estratégia de RT-PCR *(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)* em tempo real vem sendo utilizada.

Desenvolvida nos últimos anos, a técnica de RT-PCR em tempo real torna a quantificação da expressão de RNAm fácil, rápida e eficaz. Após cuidadosa padronização dos parâmetros de amplificação, este método permite resultados altamente precisos (GIULIETTI et al., 2001).

Desse modo, os objetivos deste estudo são:

a) Identificar genes envolvidos na resposta imune a endoparasitas gastrintestinais, através da análise de ESTs de duas bibliotecas de clones de cDNA, obtidos a partir da mucosa do abomaso, nódulos linfáticos abomasais e intestino delgado de bovinos resistentes e susceptíveis a estes nematódeos;

b) Avaliar a ocorrência da polarização da resposta imune através da análise da expressão de 10 genes relacionados à resposta a nematódeos gastrintestinais utilizando a metodologia de RT-PCR em tempo real.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica

Em 2005, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 163.900 milhões de cabeças, das quais 17,1% se encontram na região Norte, 14,2% Nordeste, 35% Centro-Oeste, 20,75% Sudeste e 12,95% no Sul do Brasil. Deste total, 79,2% são de gado de corte, dos quais 72% são Zebu ou cruzamentos derivados desta espécie (ANUALPEC, 2006). Dentre as raças Zebuínas, a Nelore é a mais comercializada no Brasil devido à sua adaptação em sistemas de produção local e a mais utilizada em cruzamentos, representando cerca de 52,7% do mercado de sêmen nacional e 48,07% do mercado internacional no ano de 2003 (ASBIA, 2006).

Apesar de sua adaptação às condições brasileiras, estes animais apresentam perdas decorrentes de enfermidades, tais como as endoparasitoses gastrintestinais. Estas perdas derivam não apenas da morte dos animais, mas também da redução da performance dos sobreviventes. No Brasil, foram registradas perdas equivalentes de 53Kg de ganho de peso de animais infectados que não receberam tratamento profilático com anti-helmínticos (SOUTELLO et al., 2002).

Os nematódeos característicos dos países em desenvolvimento nas regiões tropicais e causadores dessas endoparasitoses pertencem à família dos trichostrongilideos. Para combater estes parasitas utilizam-se produtos químicos que podem deixar resíduos na carne, no leite e nas fezes, colocando em risco a saúde humana e/ou contaminação do meio ambiente (CORWIN, 1997).

Atualmente o tratamento mais utilizado é a administração de drogas anti-helmínticas, que resultam na seleção de parasitas resistentes aos vermífugos (ECHEVARRIA et al., 1996), dificultando o tratamento da doença. Além disso, a aplicação destes fármacos acarreta o aumento dos custos com tratamento e práticas de controle das helmintoses. Por estes motivos, é importante o desenvolvimento de novas tecnologias, medicamentos e seleção de animais resistentes a fim de minimizar as perdas decorrentes das endoparasitoses gastrintestinais sobre a produção animal.

2.2 Principais nematódeos gastrintestinais e seus efeitos no hospedeiro

Os principais nematódeos parasitas do abomaso de bovinos e ovinos são *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. e *Trichostrongylus axei*. No intestino delgado destacam-se *Trichostrongylus colubriformes*, *Cooperia* spp., *Bunostomum* spp., *Strongyloides* spp. e *Nematodirus* spp., e no intestino grosso as espécies *Oesophagostomum* spp. e *Trichuris* spp. (RUAS; BERNE, 2001).

A maior prevalência de um ou mais gêneros depende de um conjunto de fatores, tais como: temperatura, precipitação pluviométrica, solo, tipo e manejo de pastagem, espécie, raça, idade, estado nutricional e fisiológico do animal. A maioria das infecções é mista, causada por várias espécies de nematódeos com diferentes graus de patogenicidade. Os gêneros *Cooperia* (88%), *Haemonchus* (10%) e *Oesophagostomum* (0,9%) foram identificados como sendo os de maior ocorrência em bezerros mestiços (Zebu e Holandês) do Rio de Janeiro (PIMENTEL NETO; FONSECA, 2002); em bovinos jovens machos da raça Nelore do Estado de São Paulo foi constatada a predominância de *Cooperia punctata* e um nível relativamente baixo de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* (NICOLAU et al., 2002).

Em relação aos danos causados pelas infecções provocadas por nematódeos, um dos principais efeitos são anorexia e perda de peso, cuja intensidade está diretamente relacionada ao nível de parasitismo. A patogenicidade de *Haemonchus* resulta, principalmente, da sua ação hematófaga, causando anemia e hipoproteinemia. Um único indivíduo consome 0,05 mL de sangue por dia, podendo haver perda de 6 a 25% dos eritrócitos nas infecções mais graves em ovinos. A perda contínua de sangue leva a um processo progressivo de diminuição de peso, com anemia e esgotamento de reservas de ferro e proteínas (RUAS; BERNE, 2001).

Na trichostrongilose, os nematódeos *Trichostrongylus* spp. encontram-se nas glândulas da mucosa, causando reações inflamatórias com erosão superficial, hiperemia, edema e extravasamento de plasma para a luz intestinal com perda de proteínas. As vilosidades se atrofiam, diminuindo a área de absorção, causando perda de peso e diarréia. Infecções causadas por *Cooperia* spp. em bovinos, produzem inflamação da mucosa do jejuno com fragmentação do epitélio. A porção mais parasitada pode apresentar degeneração, necrose e destruição das vilosidades. Em infecções massivas há diminuição da ingestão de água e alimentos, podendo ocorrer diarréia. A oesofagostomose, causada por *Oesophagostomum* spp. é caracterizada pela formação de nódulos na mucosa intestinal resultantes de um processo inflamatório crônico local devido à migração das larvas. A emergência das larvas da parede para a luz intestinal causa

aumento das células produtoras de muco e perda de albumina para a luz do órgão, determinando o aparecimento de diarréia (RUAS; BERNE, 2001).

Um aspecto comum das helmintoses gastrintestinais é a severa depressão das capacidades digestivas e absortivas da mucosa no local da infecção, modificando sua permeabilidade e ocasionando perdas de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal, além da modificação da atividade de várias enzimas de células absortivas. Distúrbios na motilidade do trato digestivo que influenciam o peristaltismo e o fluxo do alimento também foram constatados (HOSTE, 2001).

De maneira geral, a colonização do trato gastrintestinal é um dos fatores de maior importância para a sobrevivência dos nematódeos neste local. A partir do momento que estes parasitas se instalam, o hospedeiro desenvolve processos adaptativos baseados nas modificações das fisiologias geral e digestiva para assegurar a manutenção de sua homeostase e compensar os distúrbios funcionais (HOSTE, 2001).

2.3 Estratégias de controle

O combate aos nematódeos normalmente é feito pela administração de drogas anti-helmínticas. Tratamentos anti-helmínticos aplicados em animais de todas as categorias de idade, em uso excessivo e não baseados na epidemiologia do parasita podem ser ineficazes, altamente custosos e potencialmente prejudiciais. Informações sobre os compostos usados, o período do ano em que são aplicados e a freqüência da administração são fatores importantes para o controle dos parasitas (CHARLES; FURLONG, 1996).

Charles e Furlong (1996), ao estudarem as práticas de controle de endoparasitoses no Sudeste do Brasil, verificaram que em 84% das fazendas analisadas, são os próprios fazendeiros que escolhem a época de vermifugação, aplicando-se os anti-helmínticos de 1 a 12 vezes por ano e em todas as categorias de idade, aumentando os custos com as práticas de controle e o desenvolvimento de resistências a tais compostos. Assim, com a possibilidade do desenvolvimento de resistência aos compostos anti-helmínticos disponíveis e a crescente demanda por níveis reduzidos de drogas nos derivados animais e no ambiente, Gasbarre, Leighton e Sonstegard (2001) recomendam que estratégias não terapêuticas que promovam o uso mínimo de compostos químicos na produção animal sejam desenvolvidas.

Nesse contexto, algumas alternativas de controle têm sido pesquisadas, dentre elas o estudo dos mecanismos imunológicos de resposta às endoparasitoses, a identificação de genes que influenciam a resistência adquirida ou inata e a criação de hospedeiros resistentes para reduzir a contaminação parasitária em rebanhos de bovinos (GASBARRE, 1997; GASBARRE; LEIGHTON; SONSTEGARD, 2001; SONSTEGARD; GASBARRE, 2001). Além disso, alguns marcadores fenotípicos como contagem de ovos por grama (OPG) de fezes, volume globular, número de eosinófilos circulantes e concentração de anticorpos são associados à resistência e podem ser utilizados como parâmetros em programas de seleção (BEH; MADDOX, 1996).

2.4 A resposta imune

O sistema imune dos vertebrados tem evoluído para defender o hospedeiro contra um espectro de patógenos infecciosos que variam desde vírus submicroscópicos residentes no interior das células, até vermes que podem alcançar diversos metros de comprimento e habitar o intestino do hospedeiro.

A resposta do hospedeiro a diferentes parasitas pode resultar numa rápida eliminação desprovida de grandes danos, eliminação com danos próprios, além de uma coexistência benigna e até uma ausência de resposta, que permite ao parasita provocar danos severos ou matar o hospedeiro. Para ter sucesso nesta resposta, o hospedeiro deve (1) reconhecer o parasita como estranho, (2) ativar mecanismos efetores que o eliminem ou limitem a possibilidade de indução de injúrias e (3) limitar a ativação de mecanismos efetores que possam causar danos próprios, particularmente aqueles que tenham pouca habilidade em combater ou conter o progresso do parasita (FINKELMAN et al., 2004). Por esses motivos, mecanismos que unam uma ótima proteção ao hospedeiro com mínima injúria do próprio organismo são necessários para a resposta imune. Nesse contexto, destaca-se a polarização da resposta imune T_H1 e T_H2 (Células *T Helper* 1 e 2), essenciais para a reação do hospedeiro.

2.5 A resposta imune T_H1 e T_H2

Os linfócitos derivados do timo, mais conhecidos como células T têm sido reconhecidos como condutores da resposta imune. Entretanto, distintos subconjuntos dessas células vêm sendo descobertos, constituindo a base para o entendimento dos mecanismos que controlam a resistência à infecção (ELSE; FINKELMAN, 1998; LIEW, 2002).

Em meados dos anos 70, foi aceito que as células T poderiam ser divididas em dois distintos subconjuntos com base em seus marcadores de superfície: $CD4^+$ e $CD8^+$. Células $TCD4^+$ pareciam ter a função de auxiliar na síntese de anticorpos e no desenvolvimento das células $TCD8^+$, ao contrário destas que tinham a função de lisar células alvo infectadas por patógenos. Entretanto, no final dos anos 70, foi verificado que a população de células $TCD8^+$ (T citotóxicas) era quem regulava a ativação e o desenvolvimento das células $TCD4^+$ (LIEW, 2002).

Posteriormente, foi mostrado que as células $TCD4^+$ de camundongos poderiam ser subdivididas em 2 subgrupos - T_H1 e T_H2, com base no seu padrão de produção de citocinas. Mais tarde, esse fato também foi comprovado em células T de humanos. Essas descobertas tiveram impactos imediatos não somente no entendimento da regulação e função das células T, mas também na possibilidade de explicar muitas doenças imunes, além de aplicações terapêuticas (LIEW, 2002).

A consolidação do conceito T_H1 e T_H2 levou à intensa atividade na elucidação de mecanismos de indução, desenvolvimento e regulação desses dois subconjuntos celulares.

Em 1988, Gajewski e Fitch relataram que os produtos das células T poderiam agir como fatores de crescimento autócrinos para posterior expansão dessas células, tão bem como os agentes inibidores recíprocos para o tipo celular oposto. Assim, interleucina (IL)-4 promovia a expansão clonal de células T_H2 e limitava a proliferação de células T_H1. Contrariamente, interferon-gama (IFN-γ) aumentava o crescimento de células T_H1, mas diminuía o desenvolvimento de T_H2. Esses estudos mostraram o mecanismo pelo qual as células T_H1 e T_H2 eficientemente regulam a atividade umas das outras (LIEW, 2002).

Entretanto, estes dados não foram suficientes para saber o que poderia iniciar o desenvolvimento de uma célula T_H1 e não de T_H2 ou quais os precursores celulares. Assim, em 1990, foi descoberto que IL-4 era essencial para o desenvolvimento de células T_H2 a partir de precursores específicos. Em 1993, Hsieh e Seder mostraram que IL-12 e a ativação do receptor da célula T (TCR) eram necessários para a indução das células T_H1 (ELSE; FINKELMAN, 1998;

LIEW, 2002). Estes resultados estabeleceram que as células T_H1 e T_H2 têm um precursor em comum e que as citocinas presentes no meio no momento da apresentação do antígeno são os determinantes para o desenvolvimento das linhagens das células T_H (LIEW, 2002; ELSE et al., 1994).

A maior evidência da importância de citocinas T_H2, especialmente IL-4, provém de modelos de camundongos infectados por *Heligmosomoides polygyrus* e *Trichuris muris*. A habilidade do hospedeiro em expelir *H. polygyrus* pode ser bloqueada em até 17 dias após a infecção usando um antagonista à IL-4 ou ao seu receptor, que também bloqueia o receptor de IL-13, resultando em infecções crônicas em animais normalmente resistentes, acompanhado pelo aumento da resposta T_H1. Camundongos susceptíveis respondem a *T. muris* por montar uma resposta imune com altos níveis de IFN-γ e imunoglobulina (Ig)-G2a. Esses animais desenvolvem uma infecção crônica e são incapazes de expulsar o parasita. Quando tratados com anti-IFN-γ no início da infecção, são capazes de eliminar o parasita e montar uma resposta T_H2 (ELSE; FINKELMAN, 1998).

Os mecanismos envolvidos na resposta T_H2 variam de acordo com a espécie de parasita e estágio de desenvolvimento. Dentre os fatores que influenciam a polarização da resposta T_H2 destacam-se:

1- Ambiente na apresentação dos antígenos: Se no ambiente houver predomínio de IL-4, a resposta é T_H2; entretanto, se o predomínio for de IL-12, a resposta imune desencadeada é do tipo T_H1;

2- Tipo de célula apresentadora de antígeno: Antígenos apresentados por macrófagos estimulam uma resposta T_H1, e aqueles apresentados pelas células B, estimulam a resposta T_H2;

Além disso, sinais através de contato entre moléculas, bem como receptores de citocinas, desencadeiam uma série de interações moleculares que culminam na ativação dos fatores de transcrição específicos a cada tipo de célula e subseqüente ativação dos genes das citocinas. Esses sinais parecem desempenhar um importante papel regulatório em determinar a diferenciação T_H1 ou T_H2 devido ao seu papel antagônico (ROMAGNANI, 2004).

Entretanto, estudos realizados em bovinos infectados por *Dictyocaulus viviparus* mostraram que nem sempre a resposta imune é polarizada: Em animais infectados, houve aumento de IL-4, IL-5, IL-13 (citocinas do tipo T_H2), IL-12p35 e IFN-γ (citocinas T_H1) no início da infecção (JOHNSON; SALES; MATTHEWS, 2005).

Uma resposta não polarizada pode existir para minimizar danos e prevenir a progressão da doença, assim como os componentes T_H1 e T_H2 em excesso, podem resultar em patologias danosas. Se os componentes T_H1 são essenciais para a imunidade ou são produzidos para prevenir o excesso de danos provocados pela resposta T_H2, isso não foi elucidado.

2.6 Citocinas

Citocinas são proteínas (aproximadamente 25 kiloDaltons-KDa) liberadas por várias células do organismo frente a um estímulo ativador, induzindo a resposta imune por meio da ligação a receptores específicos (JANEWAY et al., 2002). Sua forma de atuação é diversificada, podendo atuar de maneira autócrina, afetando o comportamento das células que as liberam, ou de forma parácrina, interferindo no comportamento das células adjacentes. Algumas citocinas podem ainda atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua capacidade de entrar na circulação e de seu tempo de vida.

As citocinas são agrupadas de acordo com sua estrutura (Tabela 1), constituindo as principais famílias: (1) família das hematopoietinas, que inclui os hormônios do crescimento e muitas interleucinas com funções na imunidade inata e adaptativa, (2) família do fator de necrose tumoral (TNF), que atua na imunidade inata e adaptativa e inclui alguns membros ligados à membrana, (3) família das quimiocinas, (4) família do interferon (IFN) e (5) família de citocinas não determinadas.

Tabela 1 – Característica das famílias de citocinas

(continua)

Família	Citocinas	Células produtoras	Ações
Hematopoietina	IL-2	Células T	Proliferação da célula T
	IL-4	Células T e mastócitos	Ativação de T_H2 e supressão de T_H1
TNF	TNF-α	Macrófagos, células NK (*natural killer*) e células T	Inflamação local e ativação endotelial
Quimiocinas	MCP-1	Células T, monócitos e basófilos	Atração de células da resposta imune, ativação de macrófagos
	MCP-2	Células T, monócitos, eosinófilos e basófilos	Atração de células da resposta imune para o local da infecção
	IL-8	Monócitos e macrófagos	Mobilização, ativação e degranulação de neutrófilos

Tabela 1 – Característica das famílias de citocinas

(conclusão)

Família	Citocinas	Células produtoras	Ações
IFN	IFN-γ	Células T e NK	Ativação das moléculas do MHC, estímulo das células T_H1
Não determinada	IL-12	Células B e macrófagos	Ativação da diferenciação de TCD4+ em células T_H1

Fonte: Adaptado de Janeway et al., 2002.

Dentre as citocinas relacionadas à resposta imune destacam-se:

Interleucina 2

Interleucina (IL)-2 é uma citocina secretada pelas células T_H0, T_H1 e T citotóxicas. São responsáveis pela resposta imune celular, cuja produção determina se uma célula T irá se proliferar tornando-se uma célula efetora armada ou não. Sem a produção de IL-2, há a inibição da proliferação e diferenciação das células T ao encontrarem um antígeno. Entretanto, uma vez ativadas, podem sintetizar todas as moléculas efetoras necessárias às suas funções especializadas como células T citotóxicas ou células T auxiliares (T_H) (JANEWAY et al., 2002).

Por outro lado, além de IL-2 atuar na proliferação das células T, tem sido sugerido um outro papel dessa citocina, anteriormente classificada como indutora da resposta T_H1. Essa nova função está relacionada ao estímulo da diferenciação de células T_H2, por estabilizar a acessibilidade ao gene IL-4 em camundongos infectados por *N. brasiliensis,* além de seu bloqueio inibir a diferenciação das células T_H2. Entretanto, se IL-2 é importante no desenvolvimento das células T_H2 durante a resposta tipo 2, permanece incerta (LIU et al., 2005). Desse modo, mesmo espécies iguais de parasitas, localizadas no mesmo habitat e parasitas do mesmo hospedeiro podem estimular diferentes respostas, quando se trata de diferentes espécies de parasitas, o perfil de expressão de citocinas, como por exemplo, IL-2, torna-se extremamente peculiar.

Um exemplo desse fato é a diferente resposta de IL-2 entre camundongos e bovinos. Estudos realizados em bovinos infectados com *Ostertagia ostertagi* verificaram que IL-2 presente nos nódulos linfáticos e na mucosa do abomaso desses animais não apresentou alteração em seus níveis de expressão após a infecção quando comparados aos animais controle (CLAEREBOUT et al., 2005), ao contrário de elevação dos seus níveis em camundongos infectados por *N. brasiliensis* (LIU et al., 2005).

Interleucina 4

Interleucina (IL)-4 é uma citocina pertencente à família das hematopoietinas, produzidas pelas células T e mastócitos. Atua ativando as células B, reprimindo a resposta tipo T_H1, além de estimular o crescimento e diferenciação de eosinófilos (JANEWAY et al., 2002; WALDVOGEL et al., 2004). É típica da inflamação mediada por células tipo T_H2, associada à alergia e estados parasitários, principalmente em infecções por nematódeos gastrintestinais, cuja secreção encontra-se elevada.

A mais clara evidência da importância das citocinas T_H2, especialmente da IL-4 na resistência à infecções, veio de modelos animais infectados com *H. polygyrus* e *T. muris*. Nestes modelos, o bloqueio de IL-4 levou à cronicidade da infecção, aumentando o tempo de retenção do parasita, acompanhado pelo aumento da resposta T_H1. Se camundongos infectados por *H. polygyrus* são tratados com IL-4, ocorre uma diminuição da fecundidade e do número de parasitas observados. Esses efeitos anti-parasitários são acompanhados por mudanças na fisiologia gastrintestinal, incluindo aumento da secreção fluida e contração da musculatura lisa (ELSE; FINKELMAN, 1998).

IL-4 também pode agir como uma molécula efetora, e não só direcionar e amplificar a resposta das células T_H através das células T_H2. Dentre as funções efetoras, destacam-se a ativação das células B, o aumento da expressão de moléculas do MHC do tipo II e o controle e ativação de IgE, eosinófilos e mastócitos. Pode ainda exercer efeitos diretos sobre os tecidos não linfóides, tais como células epiteliais da mucosa, células caliciformes e células da musculatura lisa (ELSE; FINKELMAN, 1998.)

Todavia, uma forte resposta T_H2 pode ter um impacto negativo no sistema imune do animal devido à inibição da resposta T_H1. Entretanto, se houver uma infecção simultânea de um parasita intracelular desencadeando uma resposta T_H1, IL-4 não tem a capacidade de afetar a montagem de tal resposta, se sua expressão estiver restrita ao local da infecção. Além disso, IL-4 por possuir variantes originadas por *splicing* alternativo, que podem competir com o receptor da IL-4, e desse modo, inibir seus efeitos nos linfócitos T, células B e monócitos. Estudos mais detalhados devem ser realizados para determinar a real função dessas variantes de IL-4 na resposta imune (WALDVOGEL et al., 2004).

Interleucina 12

Interleucina (IL)-12 é uma citocina heterodimérica (subunidades p35 e p40) produzida pelas células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células B) e exerce efeitos imunoregulatórios nas células T e NK. IL-12 ativa a diferenciação de células TCD4+ em T_H1 por estimular a produção de IFN-γ pelas células NK e T_H, inibindo a resposta T_H2 por suprimir a produção de IL-4. Ao contrário, em infecções por patógenos intracelulares, tem um importante papel na ativação da imunidade protetora do hospedeiro (KHAN et al., 2001; JANEWAY et al., 2002).

Estudos realizados em camundongos infectados por *Trichinella spiralis* mostraram que a administração de IL-12 diminuiu a contração da musculatura intestinal e hiperplasia das células caliciformes, prolongando assim, o tempo de sobrevivência do parasita. Estes estudos também verificaram a contagem dos parasitas no hospedeiro: nos animais infectados e não tratados com IL-12, os parasitas foram expelidos até o 14º dia após a infecção; já nos que foram submetidos à administração de IL-12, mais de 80% dos parasitas permaneceram no intestino até o 14º dia. Além disso, foram verificados os níveis de expressão de outras citocinas nos nódulos linfáticos mesentéricos, constatando-se a diminuição de IL-4 e IL-13 e aumento de IFN-γ nos animais submetidos ao tratamento com IL-12 (KHAN et al., 2001).

Os efeitos de IL-12 *in vivo* e *in vitro* são mediados por sua capacidade indutora de IFN-γ. Todavia, alguns estudos têm sugerido que IL-12 pode ter funções que são, em parte, independentes de IFN-γ. Helmby e Grencis (2003) observaram que, na ausência de IFN-γ, IL-12 tem efeito direto sobre a composição celular, citocinas T_H2, quimiocinas e seus receptores. Camundongos submetidos à infecção artificial por *T. spiralis* e tratados com IL-12, foram completamente incapazes de expelir os parasitas até 14 dias após a infecção. Além disso, o tratamento com IL-12 inibiu o recrutamento de mastócitos da mucosa, tão bem como a maturação e/ou ativação durante estágios tardios da infecção. Também foi constatada a diminuição do número de eosinófilos intestinais e células caliciformes.

Em relação às outras citocinas, a administração de IL-12 reduziu a secreção de IL-4, IL-13 e IL-10; quando o tratamento com IL-12 foi suspenso, a secreção de todas as citocinas foi aumentada. Em contrapartida, a administração de IL-12 aumentou os níveis de IFN-γ. Quando camundongos com *knockout* (interrupção do gene) para o gene do IFN-γ foram tratados com IL-12, houve uma diminuição de IL-4 e IL-10, e aumento de IL-13 nos nódulos linfáticos

mesentéricos. Estes resultados demonstram que IL-12 pode inibir a produção de algumas citocinas T_H2, tais como IL-4 e IL-10 e estimular a produção de outras, tais como IL-13, ambos na ausência de IFN-γ. IL-12 também atua no aumento de MCP-1 (*monocyte chemoatractant protein*), sem a interferência de IFN-γ (HELMBY; GRENCIS, 2003). Se IL-12 aumenta ou suprime a resposta T_H2, isso pode depender do local da resposta imune, das citocinas presentes e do estado de maturação das células T.

Interleucina 13

Interleucina (IL)-13 também tem importante papel na imunidade T_H2. Estudos realizados em camundongos com *knockout* para o gene da IL-4 e antagonista para o seu receptor, mostraram que tais animais expelem normalmente os parasitas, sendo que IL-13 é o candidato mais provável em desempenhar essa função independente de IL-4, podendo mediar a resistência à infecção na ausência dessa citocina. Talvez, a administração do anti-receptor de IL-4 não leve ao completo bloqueio do receptor de IL-13 em camundongos imunocompetentes. Complexos de IL-13 administrados a camundongos deficientes de CD4+ os tornam capazes de expulsar *N. brasiliensis* (ELSE; FINKELMAN, 1998).

IL-13 é também importante na resistência a *T. spiralis,* aumentando a permeabilidade intestinal e conseqüente resposta a mediadores, tais como, prostaglandina, que promove a secreção fluida; pode aumentar a contração da musculatura intestinal lisa e também a quantidade e qualidade do muco, eficiente na expulsão dos parasitas. Atua estimulando o aumento da produção de eosinófilos, mastócitos e IgE (FINKELMAN et al., 2004). Além disso, estudos realizados em camundongos infectados por *T. muris* mostraram que os animais com *knockout* para o gene da IL-13 são susceptíveis a esse parasita, ao contrário dos animais normais, demonstrando a importância dessa citocina no desenvolvimento da imunidade protetora (ELSE; FINKELMAN, 1998).

Camundongos naturalmente resistentes e infectados por *H. polygyrus* apresentaram elevação dos níveis de IL-13, dentre outras citocinas T_H2 (IL-4, IL-5, IL9 e IL-10). IL-13 atua na expulsão dos parasitas, por alterar as funções das células epiteliais. Essas mudanças incluem aumento da secreção fluida e diminuição de sua absorção, que poderia desalojar os vermes da mucosa ou interferir na sua alimentação na mucosa do intestino (SHEA-DONOHUE et al., 2001).

Fator de Necrose Tumoral-Alpha (TNF-α)

Fator de necrose tumoral-alpha (TNF-α) é uma importante citocina inflamatória, que desempenha papel na resposta imune, além de atuar na proliferação e diferenciação celular, bem como na patogênese de muitas doenças humanas e animais. Também apresenta funções relacionadas à modulação da produção e ativação funcional de diversas outras citocinas (GUPTA et al., 2004).

TNF-α pode ainda induzir a migração de mastócitos para o local da infecção. Essa propriedade implica que esta citocina, juntamente com IL-4 e IL-8, pode ser parte de um conjunto de quimiocinas que regulam a resposta migratória dos mastócitos nas inflamações mediadas por células T_H1 e T_H2 (OLSSON; TAUB; NILSSON, 2004). TNF-α é produzido por células T_H1 e algumas células T_H2, podendo atuar na resposta imune celular e humoral (JANEWAY et al., 2002). Como parte da resposta T_H2, aumenta a migração transendotelial e potencializa a inflamação da mucosa durante a infecção intestinal por helmintos (ARTIS et al., 1999).

Estudos realizados em camundongos infectados por *T. muris* e submetidos à neutralização da ação de TNF-α ou deficiência de seu receptor, mostraram que essa citocina é crítica na regulação da proteção do hospedeiro a infecções por helmintos. Em camundongos naturalmente resistentes, o bloqueio de TNF-α preveniu a expulsão dos parasitas até 21 dias após a infecção, sem entretanto, alterar a magnitude da resposta T_H2, mantendo os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, com exceção de IL-9; nos animais com *knockout* para o receptor do TNF-α, a infecção tornou-se crônica com a geração de uma resposta T_H1. Além disso, a expulsão dos parasitas em camundongos com *knockout* para o gene da IL-4, conseqüentemente dependentes de IL-13, também foi prejudicada pelo bloqueio do TNF-α (ARTIS et al., 1999). Nesse mesmo estudo foi observado que as fêmeas de camundongos produziam mais citocinas e expeliam os parasitas mais rápido que os machos, que por sua vez, produziam menores níveis de citocinas e não conseguiam expelir os parasitas. Ao administrarem TNF-α aos machos, estes animais expeliram os parasitas por volta de 35 dias, sem haver alteração nos níveis de produção de citocinas, podendo o TNF-α muito mais potencializar os efeitos das citocinas T_H2 do que aumentar sua produção.

Interferon-gama (IFN-γ)

Interferon-gama (IFN-γ) é uma importante citocina que desempenha papel na regulação da resposta imune nas infecções parasitárias. É secretada pelas células T e NK resultando na ativação

de macrófagos e regulação da resposta imune mediada por células, potencializando a resposta T_H1 e inibindo a T_H2 em infecções por nematódeos gastrintestinais (COLTMAN et al., 2001). Já em estados parasitários por vírus e bactérias, IFN-γ tem extrema importância em mediar a resistência do hospedeiro (LIU et al., 2006).

Vários estudos têm relacionado IFN-γ com resistência à infecções. Foi descoberto um QTL associado à diminuição de OPG e ao aumento de IgA próximo ao gene IFN-γ de ovinos infectados por *T. circuncincta*. É possível que esse QTL seja causado por polimorfismos genéticos resultando na expressão diferencial do IFN-γ e subseqüente modulação da reposta T_H1/T_H2. Entretanto, mais estudos são necessárias para afirmar que as bases imunológicas da resistência estejam associadas a esses polimorfismos (COLTMAN et al., 2001). Assim, qualquer tipo de polimorfismo que leve à expressão diferencial ou à ligação do receptor de IFN-γ poderia ter efeito na resistência a parasitas extracelulares.

Estudos realizados em camundongos resistentes a *N. brasiliensis* verificaram que esses parasitas são expulsos em 12 dias. Quando tratados com IL-12, que estimula a produção de IFN-γ, há o aumento do tempo de expulsão dos parasitas, além do aumento da produção de ovos (FINKELMAN et al., 2004).

Quimiocinas: Proteínas de atração de monócitos (MCP) 1 e 2 e Interleucina 8

Quimiocinas são proteínas pertencentes à classe de citocinas que apresentam propriedades quimiotáticas, ou seja, promovem o tráfego diferenciado de leucócitos e os induzem a participarem da resposta imune (JANEWAY et al., 2002). A principal função das quimiocinas é atrair leucócitos, monócitos, neutrófilos e outras células efetoras do sangue para os locais da infecção e atuarem como guias para as células envolvidas na imunidade inata e para os linfócitos da imunidade adaptativa; podem ainda participar do desenvolvimento de linfócitos, migração e angiogênese (JANEWAY et al., 2002).

Outra propriedade dessas proteínas é a seletividade, isto é, cada tipo de quimiocina atrai um determinado tipo de célula, e é essa propriedade que as distinguem de outras previamente identificadas, tais como o fator do complemento C5a e leucotrieno B4 (LTB4), que são amplamente ativos em uma variedade de leucócitos. Além disso, com a descoberta, em 1996, que o vírus do HIV-1 usa certos tipos de receptores de quimiocinas como co-receptores para infectar células, a pesquisa com quimiocinas revelou que, além de estarem envolvidas na migração

celular, tem papel na defesa antimicrobiana (GANGUR; BIRMINGHAM; THANESVORAKUL, 2002).

MCP-1 e MCP-2

A expressão de moléculas quimioatrativas que podem iniciar uma resposta imune, por atração de células, e que atuam na expulsão do parasita estão sendo amplamente estudadas. Os primeiros estudos foram realizados por Wenpe, Kleine e Scheit (1994), que caracterizaram o gene de MCP-1 de bovinos, e constataram ser formado por 3 exons. Intros e exons são similares em comprimento e ambos são achados em posições idênticas da região codificadora dos RNAms de MCP-1 e MCP-2.

Dada a importância do papel da MCP-1 na migração de leucócitos e sua função homeostática, os genes MCP-1 e MCP-2 de ovinos também foram isolados e caracterizados. Além disso, também foram estudados os níveis de expressão de MCP-1 e MCP-2 no abomaso de ovelhas adultas infectadas artificialmente por *Haemonchus contortus,* sendo observados altos níveis de ambas quimiocinas após o desafio. Esse fato sugere que, o aumento nos níveis de expressão de MCP-1 e MCP-2 estão envolvidos na resposta imune a infecção por helmintos e no recrutamento de leucócitos para o trato gastrintestinal, além de serem importantes mediadores da inflamação e defesa do hospedeiro. Todavia, esses autores não puderam afirmar se o aumento dos níveis de RNAm é devido ao acúmulo de leucócitos que expressam esses genes, ao aumento dos níveis de RNAm das células individuais ou à combinação de ambos fenômenos (DUNPHY et al., 2001).

O papel de MCP-1 no desenvolvimento da resistência a infecção pelo nematódeo gastrintestinal *T. muris* também foi estudado, sendo verificado que, na ausência dessa quimiocina não ocorre a expulsão do parasita. Camundongos deficientes em MCP-1 tiveram menor taxa de expulsão das larvas, quando comparados aos indivíduos resistentes, que apresentaram larvas por 12-24 dias, eliminando-as por volta de 35 dias após a infecção. Indivíduos deficientes em MCP-1 abrigavam parasitas adultos e férteis, indicando uma completa susceptibilidade à infecção. Foi também detectado que os nódulos linfáticos dos indivíduos deficientes em MCP-1 tornam-se locais de diminuição da resposta T_H2 e intensa proliferação da resposta T_H1, altamente benéfica à retenção do parasita no organismo hospedeiro (DESCHOOLMEESTER et al., 2003). Em modelos de infecção por *N. brasiliensis* foi constatado o aumento da expressão de MCP-1 no epitélio do jejuno de camundongos infectados (ROSBOTTOM et al., 2002).

Entretanto, há indícios de duplo papel de MCP-1 na polarização da resposta imune: MCP-1 pode promover a imunidade T_H2 em certas circunstâncias, enquanto facilita a resposta T_H1 em outras. Helmby e Grencis (2003) observaram que em camundongos submetidos à infestação artificial por *T. spiralis* e tratados com IL-12, houve aumento da expressão de MCP-1, tanto na presença quanto na ausência de IFN -γ.

Interleucina 8

Interleucina (IL)-8 também é uma citocina pertencente à classe das quimiocinas e secretada por macrófagos. Está envolvida na resposta inflamatória local, auxiliando o recrutamento de neutrófilos, basófilos e células T para o local da infecção (JANEWAY et al., 2002). Pode atrair e ativar células efetoras nos tecidos peri-parasitados, limitando a proliferação e disseminação dos parasitas. Entretanto, quando secretada desordenadamente, IL-8 pode atuar induzindo inflamação local excessiva, levando à destruição do tecido hospedeiro (SOBOSLAY et al., 2006).

Essa citocina apresenta um duplo papel no recrutamento das células da resposta imune: (1) atuam no rolamento dos leucócitos nas células endoteliais presentes no local da inflamação, que, conseqüentemente muda a conformação das moléculas de adesão chamadas integrinas. Esse fato permite que os leucócitos atravessem a parede dos vasos, infiltrando-se nas células endoteliais; (2) dirigem a migração dos leucócitos por um gradiente de quimiocina, que aumenta a concentração na direção do local da infecção.

Mucinas

Mucinas são glicoproteínas poliméricas sintetizadas e secretadas pelas células caliciformes do intestino e cólon, e células mucosas do estômago. São os maiores componentes não aquosos da barreira mucosa protetora que recobrem as superfícies epiteliais e funcionam como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de patógenos (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003), ao mesmo tempo em que permitem a passagem de nutrientes (HÓLMEN et al., 2002).

As moléculas de mucinas são compostas de distintos domínios que compreendem repetições em tandem (TRs), ricas em treonina, prolina e/ou resíduos de serina. Os padrões de glicosilação afetam suas propriedades físicas, influenciando sua rigidez, resistência a proteases e capacidade de formação de gel (CONNARIS; GREENWELL, 1997). Suas regiões N e C-terminal

são pouco glicosiladas e consequentemente vulneráveis a ataques proteolíticos, ao contrário dos domínios de mucina (D1, D2, D3 e D4), que contém muitos aminoácidos, especificamente resíduos de cisteína, que formam pontes disulfeto intramoleculares com regiões amino (N) e carboxi (C) terminal, característico da natureza polimérica das mucinas, além de apresentarem um elevado padrão de glicosilação (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003).

Alguns parasitas localizam seus hospedeiros por detectar componentes de seu muco, enquanto outros expressam moléculas semelhantes à mucina, que poderiam estar envolvidas na proteção do parasita na resposta do hospedeiro. Entretanto, os hospedeiros têm a propriedade de alterar a estrutura de suas mucinas em resposta ao ataque de endoparasitas, prevenindo seu estabelecimento ou promovendo sua expulsão (THEODOROPOULOS et al., 2001). Assim, sítios de ligação nas mucinas competem com aqueles do epitélio, prevenindo a adesão de patógenos à superfície mucosa. Esse mecanismo de inibição competitiva protege o epitélio de microrganismos patogênicos, tais como, bactérias, parasitas e vírus, ao mesmo tempo em que permite o estabelecimento da flora intestinal normal. Essa flora comensal hospedeira é uma importante aliada no combate à invasão de patógenos, pois coloniza o muco e ocupa um importante nicho no intestino, prevenindo dessa forma, a ligação de outros patógenos, por ocupar os locais de adesão disponíveis na mucina. Além disso, pelo fato da barreira mucosa intestinal ser relativamente densa e encontrar-se em estado dinâmico, o hospedeiro pode eliminar os patógenos do muco durante os movimentos peristálticos ou defecação (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003).

Entretanto, os patógenos gastrintestinais desenvolvem mecanismos de evasão da resposta imune, através de sua habilidade em colonizar a camada mucosa. O primeiro passo para isso, é se ligarem à mucina. Uma vez ligados, devem colonizar ou penetrar na camada mucosa a fim de sobreviverem no trato gastrintestinal. Essa interação entre patógenos e mucinas pode levar: (1) à sua aderência à mucina, seguida por eliminação pelos movimentos peristáticos; (2) à colonização somente do muco, tendo seu acesso negado ao epitélio; (3) à colonização da camada mucosa, secretando fatores patogênicos, e (4) ao rompimento da barreira mucosa, ocorrendo a invasão do epitélio intestinal (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003).

Patógenos entéricos que interagem com as mucinas produzem fatores de virulência que rompem o balanço entre a degradação e produção/secreção de mucina, essencial para a manutenção e solidez da barreira mucosa. Esses fatores podem ser proteinases e glicosidases, cuja função é destruir a natureza polimérica e protetora da barreira mucosa. Proteinases liberadas pelo nematódeo de bovinos *O. ostertagi* degradam a mucina e sua atividade cisteína-proteinase poderia

ser importante para a penetração na mucosa abomasal. Tais proteínas representam os maiores fatores de patogenicidade produzidos por parasitas para penetrarem na camada mucosa (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003).

Em ovelhas infectadas por *H. contortus*, a infecção leva a mudanças no conteúdo e distribuição das mucinas na mucosa gástrica. Após 48 horas da infecção, os animais apresentam uma redução de mucina gástrica, com mucina neutra diminuída da superfície do epitélio e mucina sulfatada das glândulas gástricas (quanto maior o grau de sulfatação das mucinas, mais rápida é a expulsão dos parasitas) (NEWLANDS; MILLER; JACKSON,1990).

Por esses motivos, essas alterações sugerem um mecanismo geral de proteção contra patógenos gastrintestinais, diretamente relacionados à expulsão do parasita, além de promover a manutenção da barreira luminal e epitelial. Entretanto, as mucinas são somente um componente da defesa inata do hospedeiro. Numerosos outros componentes protegem o hospedeiro dos efeitos deletérios de invasores, tais como ácidos gástricos, lisozimas, defensinas, proteínas fator trefoil e receptores semelhantes a Toll (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003).

2.7 Estratégias para estudar genes de importância na resposta imune a endoparasitas gastrintestinais

O advento de novas tecnologias tais como seqüenciamento e análise de ESTs, RT-PCR em tempo real, micro e macroarranjos de cDNA vêm contribuindo para uma nova era nos estudos de sistemas biológicos. Na imunobiologia, esses avanços têm começado a influenciar estudos de doenças infecciosas, processos inflamatórios e função das células e genes relacionados à resposta imune (COUSSENS; NOBIS, 2002).

Técnicas de seqüenciamento e análise de ESTs podem ser empregadas na descoberta de novos genes, em programas de mapeamento genético e na identificação de regiões codificadoras nas seqüências genômicas (STERKY; LUNDEBERG, 2000); mapeamento de regiões genômicas que controlam a variação genética da resistência (quantitaive trait loci- QTL) e identificação dos genes nesses loci, são importantes para informar quais linhagens de animais são geneticamente resistentes, além de facilitar o entendimento de vias biológicas que controlam a resistência às infecções por nematódeos gastrintestinais (MENGE et al., 2003); e ensaios de PCR em tempo real

têm sido desenvolvidos e usados para monitorar a expressão de pequenos conjuntos de genes relevantes imunologicamente, tais como citocinas e quimiocinas (GIULIETTI et al., 2001).

2.7.1 ESTs para identificar genes

A primeira aplicação de seqüenciamento de cDNA para gerar EST foi descrita por Adams et al., (1991), que selecionou e seqüenciou clones de cérebro humano, gerando seqüências que representavam os genes expressos no tecidos e que foram designadas EST.

Esta rápida técnica de caracterização de uma biblioteca de cDNA facilita a identificação de vários genes de um genoma em um período de tempo relativamente curto, fornecendo novos marcadores e servindo como fonte para diversas pesquisas biológicas (ADAMS et al., 1991). Além disso, pelo fato das seqüências geradas poderem ser comparadas entre as diferentes espécies de vertebrados, um gene encontrado em uma espécie pode ser localizado em outra por comparação de seqüências evolutivamente conservadas do genoma.

Devido ao crescente número de ESTs geradas pelos projetos genoma, houve a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para processar o montante de informações geradas, visando facilitar o acesso e compreensão dos pesquisadores.

Com esse propósito, foram desenvolvidos programas, tais como *BLAST -Basic Local Alignment Search Tool-* (ALTSCHUL et al., 1990), *Phred* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) e *Cap3* (HUANG; MADAN, 1999) que, respectivamente, identificam a similaridade das ESTs obtidas com demais seqüências disponíveis nos bancos de dados, analisam a qualidade e realizam o alinhamento das seqüências e geram os *contigs*. Além desses programas que permitem a análise de seqüências, aqueles que visam sua categorização também foram gerados. Nesse contexto, a categorização de seqüências pelo *Gene Ontology* (www.geneontology.org) vem sendo amplamente utilizada.

Gene Ontology foi iniciado a partir da necessidade da anotação do genoma de *Drosophila, Saccharomyces* e camundongo, em uma única linguagem que descrevesse os principais processos biológicos. Essa necessidade em comum resultou no desenvolvimento de um conjunto de termos inseridos em categorias, que se associam aos produtos gênicos gerados.

As principais categorias utilizadas pelo *Gene Ontology* são: (1) componente celular, (2) processo biológico e (3) função molecular. Neste programa, um gene pode ser anotado em mais

de uma categoria, visto que este pode ter mais de uma função, estar envolvido em uma variedade de processos e/ou desempenhar essa função em várias localizações subcelulares (HILL et al., 2001).

Enfim, com o desenvolvimento das ferramentas de bioinformática necessárias para o processamento das ESTs geradas, novos projetos de seqüenciamento de espécies de importância agropecuária, tais como bovinos, vêm sendo realizados. Inseridos nestes projetos encontram-se estudos de identificação de genes relacionados à maior produtividade de carne, melhor desempenho animal e resposta imune contra diversos tipos de patógenos.

2.7.2 PCR em tempo real para estudo e/ou validação de genes previamente conhecidos

Uma variedade de métodos são utilizados para quantificar a expressão de RNAm, tais como *Northern blotting*, hibridização *in situ*, arranjos de cDNA e a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (GIULIETTI et al., 2001).

RT-PCR vem sendo amplamente utilizada em estudos de expressão gênica, tais como na expressão de citocinas, freqüentemente expressas em baixos níveis. Esse método é considerado o mais sensível e preciso para tal procedimento (GIULIETTI et al., 2001), podendo determinar eventos iniciais em sua cinética de expressão e diferenciação da resposta T_H1/T_H2 (LEUTENEGGER et al., 1999).

O primeiro método de PCR em tempo real foi relatado por Higuchi em 1993, usando brometo de etídeo intercalando durante a amplificação e um termociclador modificado para irradiar as amostras com luz ultra-violeta e então detectar o sinal de fluorescência com uma câmara CCD. Os sinais fluorescentes eram plotados em função do número de ciclos, fornecendo uma boa indicação da quantidade de produto de PCR gerado durante cada ciclo (WITTWER et al., 1997).

Com o objetivo de tornar esta técnica acessível à comunidade científica, Wittwer et al., (1997) adaptaram um primeiro protótipo do equipamento denominado *LightCycler*, o que viria a ser um dos equipamentos mais utilizados e indicados para análises de expressão gênica. Este equipamento realiza rápidas quantificações da amplificação de DNA de seqüências específicas em 10 a 15 minutos, onde 30 ciclos de amplificação podem ser completados rotineiramente nesse

período, minimizando os tempos de denaturação e anelamento dos primers, conseqüentemente aumentado a especificidade e rendimento do produto.

Desde a descoberta da PCR, numerosas aplicações vêm sendo descritas para quantificação da expressão de RNAm, tais como o método semiquantitativo, quantitativo competitivo e mais recentemente, PCR em tempo real. A introdução dessa nova metodologia baseada na cinética de fluorescência possibilita a quantificação do produto de PCR em tempo real, processo que combina amplificação e detecção em um só passo.

PCR em tempo real permite a quantificação de transcritos raros, além de detectar pequenas mudanças na expressão gênica. É fácil de ser executado, oferece a precisão necessária e produz resultados confiáveis, possíveis de serem reproduzidos e em um período de tempo relativamente curto (PFAFFL, 2001). Esta metodologia também pode ser utilizada para validar estudos de expressão gênica realizados com outras técnicas.

2.8 Métodos de quantificação da expressão de RNAm

A escolha do método de quantificação depende da seqüência alvo, da quantidade de RNAm presente no tecido, do grau de precisão desejado e do tipo de quantificação (PFAFFL, 2001).

Há dois tipos de quantificações em PCR em tempo real: (1) quantificação relativa, baseada na expressão relativa do gene de interesse versus um gene referência e (2) quantificação absoluta, baseada tanto numa curva de calibração interna como externa. Essa quantificação determina o número de cópias do transcrito de interesse, por relacionar o sinal de PCR a uma curva padrão. Quantificação relativa deve ser utilizada quando o objetivo é comparar diferenças de expressão gênica entre tratamentos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para quantificar mudanças relativas na expressão de um gene usando PCR em tempo real, é necessário levar em consideração as variáveis que podem influenciar sua expressão. Assim, Pfaffl (2001) desenvolveu um novo modelo matemático (Equação1) para determinar a quantificação relativa de um gene de interesse em comparação com um gene referência. A expressão relativa (*R*) do gene de interesse é calculada baseada na eficiência de amplificação (*E*) e no ciclo (*Ct*) onde é detectado o início do aumento da fluorescência (ponto onde inicia-se a

detecção da amplificação do produto desejado) de uma amostra tratamento versus uma amostra controle, ambos expressos em relação ao gene referência:

Equação 1: $$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene de interesse}})^{\Delta Ct\ (Ct\ \text{médio do grupo controle} - Ct\ \text{médio do grupo tratratamento})}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta Ct\ (Ct\ \text{médio do grupo controle} - Ct\ \text{médio do grupo tratratamento})}}$$

2.9 Aplicações do PCR em tempo real em estudos realizados com bovinos

As aplicações do PCR em tempo real são numerosas e nas mais diversas áreas de pesquisa: estudos de expressão de RNAm, medida do número de cópias no DNA genômico ou DNA viral, ensaios de discriminação alélica e confirmação de dados de microarranjos (GINGINZER, 2002). Pode ainda ser empregado nas análises do perfil de citocinas em bovinos e ovinos com o objetivo de elucidar a relação entre padrões de citocinas e resistência a doenças e também os mecanismos moleculares que modulam a imunidade mediada por células.

Nesse contexto, o nível de várias citocinas (IL-1α, IL-2β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40 e IFN-γ) foi determinado em bovinos infectados e não infectados pelo vírus da leucemia (BLV- Bovine Leukemia Virus), utilizando este método. Diferenças significativas dos níveis de expressão de IFN- γ ($P<0,01$) e IL-12p40 ($P<0,05$) entre bovinos aleucêmicos (maior expressão de IFN-γ e de IL-12p40) e persistentemente linfocitóticos foram detectadas, e estão de acordo com relatos anteriores utilizando outros métodos para tal quantificação (KONNAI et al., 2003). Além disso, para confirmar se o sistema de PCR em tempo real poderia ser aplicado em ovinos, os autores analisaram as diferenças de expressão de citocinas nesses animais também infectados com BLV. Concluíram que a análise de expressão de citocinas pelo método de PCR em tempo real é eficiente e serviria como uma ferramenta poderosa nas análises de detecção quantitativa de vários genes para diagnóstico ou análises imunológicas em bovinos e ovinos.

Aho, McNultry e Coussens (2003) utilizaram a metodologia de PCR em tempo real para validar os níveis de expressão de diversos genes obtidos por técnicas de macroarranjos em bovinos de leite infectados e não infectados por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (microrganismo causador da doenca de Johnes). Ao compararem os níveis de expressão entre as duas metodologias utilizadas, verificaram que a técnica de PCR em tempo real produziu estimativas mais precisas da abundância relativa de RNAm em múltiplas amostras.

Além desses estudos, Tichopad, Pfaffl e Didier (2003) também constataram que o método de PCR em tempo real é adequado para avaliar a expressão de genes relacionados a doenças neurodegenerativas em bovinos e ovinos, tais como o gene prion. Estes autores afirmaram que o método é excelente, altamente sensível, constituindo um poderoso instrumento para estudos da patogênese da doença de prion e de outras enfermidades em bovinos. O método de PCR em tempo real torna a quantificação da expressão de RNAm fácil, rápida, mais sensível e precisa se todos os parâmetros avaliados forem padronizados e os fatores de variação cuidadosamente controlados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise de ESTs

3.1.1 Preparo dos animais

Foram utilizados 100 bovinos machos da raça Nelore (*Bos indicus*), com 11 e 12 meses de idade, provenientes da Estação Experimental Agrozootécnica Hildegard Georgina Von Pritzelwitz (Fazenda Figueira), da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, situada no Município de Londrina-PR.

Estes animais, nascidos nos meses de novembro e dezembro de 2002, foram alojados em uma área de 79 ha (divida em 4 piquetes) de capim colonião (*Panicum maximum*) contaminada naturalmente por larvas de nematódeos. Os animais foram submetidos ao usual manejo sanitário e nutricional da Fazenda Figueira:

1- Logo após o nascimento foram submetidos a tratamento com doramectina (Dectomax®, Pfizer), para prevenção de miíase;
2- No mês de março de 2003, foram vacinados contra clostridiose (Fortress®, Pfizer);
3- No mês de maio foram submetidos a tratamento anti-helmíntico com ivermectina (Ivomec Gold®, Merial);
4- No mês de junho, ou seja, na desmama, novamente vacinados contra clostridiose e submetidos a tratamento anti-helmíntico com ivermectina (Ivomec Gold®, Merial);
5- Após o início do experimento (outubro de 2003), os animais não receberam nenhum tratamento anti-helmíntico e foram mantidos juntos em pasto.

Com a finalidade de separá-los em dois grupos distintos, (1) resistente e (2) susceptível, foram coletadas fezes quinzenalmente, totalizando 7 coletas, de 31 de outubro de 2003 a 26 de janeiro de 2004, para a realização dos exames parasitológicos.

3.1.2 Exames parasitológicos

Para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi utilizado o método modificado de Gordon e Withlock (1939). Foram pesadas 4g de fezes e diluídas em 28 mL de solução

hipersaturada de cloreto de sódio. Após a homogeneização, procedeu-se nova diluição acrescentando-se novamente 28 mL de solução de cloreto de sódo e alíquotas foram inseridas em câmara de contagem. O resultado obtido foi expresso em ovos por grama, onde cada ovo contado representa 50 ovos/g de fezes.

Para a identificação das larvas de terceiro estádio foram realizadas culturas de larvas empregando-se a técnica de Roberts e O'Sullivan (1949). Essa técnica consiste na utilização de um *pool* de amostras coletadas dos animais experimentais (cerca de 1-2 g por animal) para serem homogeneizadas e misturadas com fezes de equino esterilizadas, colocadas em frasco até ¾ da sua capacidade, tampado com uma placa de Petri e colocado na estufa a 25ºC por 7 dias. Para realização da colheita das larvas infectantes, o frasco de cultivo foi completado com água corrente até o bordo, tampado com a placa de Petri e invertido bruscamente. Um volume de 5 a 10 ml de água foi adicionado na placa de Petri e após 3 a 4 horas, o conteúdo da placa foi colhido com uma pipeta e colocado em tubo de ensaio. As culturas foram realizadas em grupos de acordo com as contagens de OPG: (1) grupo com contagem zero; (2) grupo de 50 a 200 OPG; (3) grupo de 250 a 500; (4) grupo de 550 a 1000 OPG e (5) grupo acima de 1050 OPG. A identificação das larvas de terceiro estádio foi realizada de acordo com as características morfológicas descritas por Keith (1953).

Após os exames parasitológicos, foram escolhidos 20 animais divididos em 2 grupos de 10 animais: (1) com baixa e (2) com alta contagem média de OPG, constituindo os grupos resistente (ER1) e susceptível (ES1), respectivamente. Esses animais foram abatidos para serem coletados os tecidos de interesse.

Para a recuperação e contagem da carga parasitária, o trato gastrintestinal foi removido durante a necropsia. O abomaso foi aberto pela sua curvatura maior e o seu conteúdo colocado em um recipiente graduado; em seguida foi submetido à digestão para recuperação dos nematódeos imaturos presentes na mucosa. Amostras de 5% do conteúdo do abomaso e do material da digestão foram colhidas e preservadas em formalina 5%, para posterior identificação dos nematódeos (UENO; GONÇALVES, 1994). O intestino delgado foi submetido a procedimento similar ao descrito para o abomaso. Para o intestino grosso, foram colhidas alíquotas de 5% do seu conteúdo. Todos os helmintos presentes no material preservado foram identificados e contados com base no estágio de desenvolvimento.

3.1.3 Coleta de tecidos

Após o abate dos animais, foram coletadas amostras dos tecidos do abomaso (região fúndica), intestino delgado (região próxima ao piloro) e nódulos linfáticos abomasais. Estas foram acondicionadas em recipiente adequado e congeladas em nitrogênio líquido para posterior utilização.

3.1.4 Extração de RNA total

O isolamento do RNA total dos tecidos foi realizado segundo o protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Foi feito um *pool* dos tecidos dos 10 animais de cada grupo: (1) grupo com baixa contagem de OPG (ER1) e (2) grupo com alta contagem de OPG (ES1). Entretanto, a extração do RNA total foi realizada individualmente para cada animal. Os tecidos coletados (500 mg) foram dissolvidos em *TRIZOL* (Gibco/BRL), e aliquotados em tubos eppendorfs, finalizando o volume de 1 mL. À essa mistura foram adicionados 200 µL de clorofórmio, agitado vigorosamente e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente (25ºC). Após centrifugação a 12000Xg por 15 minutos, a 4ºC, a fase aquosa foi recuperada e à esta foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 10000Xg, por 10 minutos, a 4ºC e o precipitado de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10000Xg, por 5 minutos a 4ºC. O precipitado de RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água DEPC para posterior determinação da concentração de RNA total em espectrofotômetro. As amostras obtidas com esse procedimento foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA.

3.1.5 Isolamento do RNA mensageiro

O isolamento do RNA mensageiro a partir das amostras de RNA total foi feito com a utilização do *Kit Oligotex* (Qiagen). Foram utilizados 500 µg de RNA total de cada grupo de animais separadamente, ajustados para um volume final de 1mL com água DEPC (segundo

recomendações do fabricante do *Kit Oligotex*) para o início do procedimento. À essa mistura foram adicionados 500 μL de OBB (tampão de ligação), 45 μL de resina, agitados em vórtex, incubados por 3 minutos, a 70ºC e em seguida, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, a solução foi centrifugada por 2 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi retirado e armazenado em um novo tubo (eppendorf 1,5 mL) (eluato 1). Ao sobrenadante foram adicionados 500 μL de OBB e 500 μL de água DEPC e incubado por 3 minutos, a 70ºC, por 10 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante novamente foi retirado e armazenado em um outro tubo (eluato 2). A resina no interior da coluna e inserida em um tubo, foi ressuspendida em 400 μL de OW2 (tampão de lavagem) e centrifugada por 1 minuto, a 14000Xg. Nessa etapa foi recuperado o eluato 3 e a coluna foi inserida em um outro tubo e repetida a etapa acima, recuperando o eluato 4. Em seguida, a coluna foi transferida para outro tubo, adicionando-se 100 μL de OEB a 70ºC (tampão de eluição) e centrifugado por 1 minuto, a 14000g. Para garantir um maior rendimento, essa etapa foi repetida, adicionando-se mais 100 μL de OEB à coluna, e esta centrifugada por mais 1 minuto, a 14000Xg para recuperar o RNA mensageiro, que foi precipitado, adicionando-se 50 μg de glicogênio (2,5 μL de glicogênio a 20 μg/μL), 0,5 volume de acetato de amônia 7,5M e 3 volumes de etanol absoluto e estocado por 1 hora em freezer -80ºC. Após a centrifugação de 30 minutos, a 14000Xg, a 4ºC, o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% e centrifugado por 2 minutos, a 14000Xg, a 4ºC. O RNA mensageiro foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 7 μL de água DEPC.

3.1.6 Construção das bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas de cDNA dos animais resistentes (ER1) e susceptíveis (ES1) foi utilizado o *Kit Superscript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen/Life Technologies), constituindo-se das seguintes etapas:

a) Síntese da primeira fita de cDNA

Ao RNA mensageiro foram adicionados 2 μL de *Not I primer adapter*, sendo a mistura aquecida por 10 minutos a 70ºC, resfriada em gelo e adicionados os seguintes reagentes:

- 5X *First Strand Buffer* 4 μL

- 0,1M DTT 2 μL
- 10M dNTP mix 1 μL
- [α-^{32}P] dCTP (1μC/μL) 1 μL
- Enzima *SuperScript II RT (*200U/μL*)* 5 μL

Após a adição, a mistura foi incubada a 37ºC por 2 horas, sendo a reação terminada em gelo.

b) Síntese da segunda fita de cDNA

Com o tubo no gelo, foram adicionados os seguintes reagentes:

- água DEPC 93 μL
- 5X *Second Strand Buffer* 30 μL
- 10mM dNTP mix 3 μL
- *E.coli* DNA ligase (10U/μL) 1 μL
- *E. coli* DNA polimerase I (10U/μL) 4 μL
- *E. coli* RNAse H (2U/μL) 1 μL

E incubados a 16ºC por 2 horas. Em seguida foram adicionados 2 μL de T_4 DNA Polimerase (10U) e a mistura incubada por 5 minutos em banho a 16ºC. A reação foi colocada em gelo e adicionados 10 μL de EDTA 0,5M, 150 μL da mistura fenol:clorofórmio:álcool/isoamílico (25:24:1), procedendo 5 minutos de centrifugação a 14000Xg para separar as fases. Foram então recuperados 140 μL do sobrenadante (fase aquosa) e transferido para um tubo limpo. Foram adicionados 70 μL de acetato de amônia 7,5M, seguido por 500 μL de etanol absoluto (-20ºC) e centrifugado imediatamente por 20 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e ao *pellet* foram adicionados 500 μL de etanol 70% (-20ºC), centrifugado por 5 minutos, a 14000Xg e removido o sobrenadante. O cDNA foi seco a 37 ºC por 10 minutos, e ressuspendido em 25 μL de água DEPC.

c) Adição do adaptador *Sal* I

Com o tubo no gelo, foram adicionados os seguintes reagentes:

- 5X T_4 Ligase *Buffer* 10 μL
- *Sal I Adapter* 10 μL
- T_4 DNA Ligase (5U/μL) 5 μL

A solução foi misturada e a reação incubada a 16ºC por 16 horas.

Foi realizada a segunda precipitação, e para isso foram adicionados 50 μL de fenol:clorofórmio:álcool/isoamílico (25:24:1), seguindo centrifugação por 5 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente para separar as fases. Foram removidos cuidadosamente 45 μL do sobrenadante (fase aquosa) e transferidos para um novo tubo no qual foram adicionados 25 μL de acetato de amônia 7,5M e 150 μL de etanol absoluto (-20ºC) e centrifugado por 20 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente removido e adicionados 500 μL de etanol 70% (-20ºC), procedendo-se nova centrifugação por 2 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente. Após esse procedimento, o sobrenadante foi removido e o cDNA foi seco a 37 ºC por 10 minutos, e ressuspendido em 41 μL de água DEPC.

d) Digestão com *Not* I

Foram adicionados os reagentes na seguinte ordem:

- *React 3 Buffer* 5 μL
- *Not I* 4 μL

Foi feita a homogeneização seguida pela incubação a 37ºC por 2 horas. Foi realizada a terceira precipitação, da mesma forma que a descrita anteriormente, de modo que, após o cDNA ter sido seco por 10 minutos a 37ºC, o mesmo foi ressuspendido em 100 μL de *TEN Buffer 1X* (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1mM EDTA; 25 mM NaCl).

e) Coluna cromatográfica

O cDNA ressuspendido foi mantido em gelo enquanto procederam-se as lavagens da coluna cromatográfica. Para esse procedimento foi utilizada uma coluna, colocada em um suporte, tendo sua parte superior e inferior removida, para que o excesso de etanol fosse drenado. Foram feitas 3 lavagens da coluna com 800 μL de *TEN Buffer 1X* (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1mM EDTA; 25 mM NaCl), com duração de aproximadamente 15 minutos cada lavagem. Enquanto isso, foram numerados tubos eppendorf (1,5 mL) de 1 a 20. A amostra de cDNA foi adicionada à coluna e coletada no tubo 1. Em seguida, foram adicionados 100 μL de *TEN Buffer1X* à coluna e coletados completamente no tubo 2. Iniciando com a próxima alíquota de 100 μL de *TEN Buffer1X*, foi coletada uma gota em tubos individuais, totalizando 18 gotas dos tubos 3 ao 20 (1

gota por tubo), sendo que cada 100 μL correspondem a 3 gotas. Os tubos contendo as frações de cDNAs foram organizados e armazenados em freezer - 20ºC.

f) Visualização das frações

Para que as frações contendo os diferentes tamanhos de fragmentos de cDNA pudessem ser visualizadas para serem selecionadas e ligadas ao vetor, 5 μL de cada fração e 2μL de bromo fenol foram aplicados em gel de agarose 1%, contendo 5 μL de 1 Kb e submetidos a 85 volts por aproximadamente 1 hora. Após o término da eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana (*Millipore,* 0,025μm) e submetido ao secador de gel *Slab Gel Dryer (SGd 200)* por aproximadamente 1 hora, para que pudesse haver a impressão dos fragmentos de cDNA na membrana. Em seguida, esta foi inserida em um cassete contendo um filme de raio X e incubados por 40 minutos. Na sequência, o filme foi submetido ao revelador *Storm 860 Molecular Dymamics (Amersham Pharmacia Biotech)* onde os fragmentos de cDNA marcados com [α-^{32}P] dCTP (1μC/μL) foram visualizados e os tamanhos desejados escolhidos. Estes foram precipitados com 5 μL de RNAt, 0,5 volume de acetato de amônia 7,5M e 2 volumes de etanol absoluto (-20ºC) e a mistura centrifugada por 20 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionados 500 μL de etanol 70% (-20ºC), procedendo-se nova centrifugação por 2 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente, removendo-se o sobrenadante. O cDNA foi seco e ressuspendido em 10 μL de água Milli-Q estéril.

g) Ligação ao vetor *pSPORT* 1

Para a ligação ao vetor, foi utilizada a fração 11 para a biblioteca ER1, e as frações 8 e 9 para a ES1. As reações foram as seguintes:

- cDNA	1,5μL (ER1) e 3 μL (ES1)
- Vetor pSPORT 1	0,5 μL
- 5X T_4 DNA ligase *buffer*	2 μL
- T4 DNA ligase (1U/μL)	1 μL
- Água	X μL
- Volume final	10 μL

Incubada por 3 horas a temperatura ambiente e precipitada com 2,5 μL de RNAt, 6 μL de acetato de amônia 7,5M e 35 μL de etanol absoluto (- 20ºC) e a mistura centrifugada por 20

minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionados 500 µL de etanol 70% (-20ºC), procedendo-se nova centrifugação por 2 minutos, a 14000Xg, a temperatura ambiente, removendo-se o sobrenadante. O cDNA foi seco por 10 minutos em placa aquecedora a 37ºC e ressuspendido em 5 µL de água Milli-Q estéril e armazenado em freezer -20ºC.

Os passos realizados para a elaboração das bibliotecas estão resumidos na Figura 1.

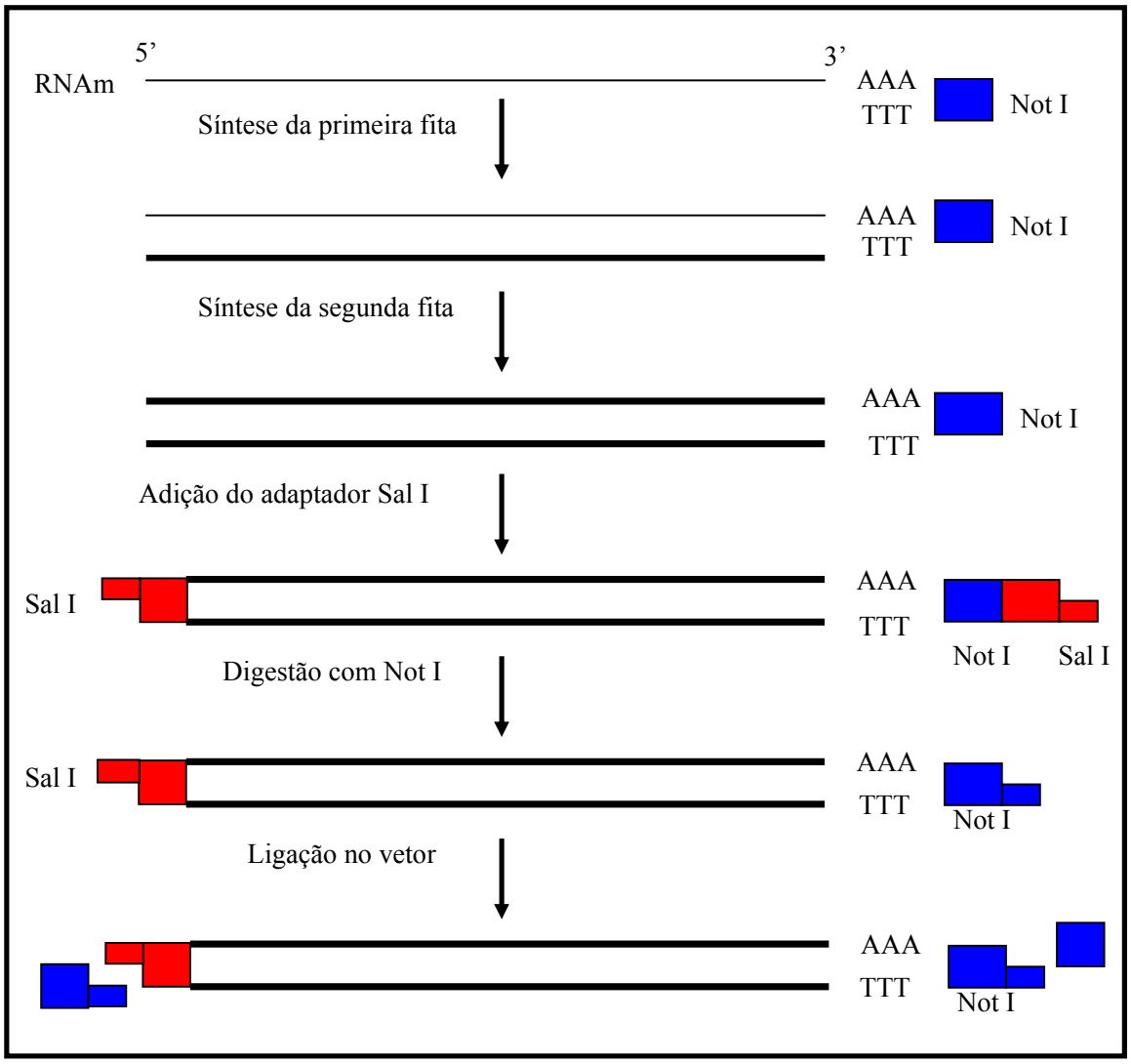

Figura 1 – Resumo das etapas envolvidas na elaboração das bibliotecas de cDNA

h) Transformação por eletroporação em bactéria competente

A transformação foi feita por eletroporação, onde 2 μL da reação de ligação foram acrescentados a 20 μL de célula *DH10B* competente, homogeneizadas e transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas ao eletroporador *BTX-ECM 399*. Após o choque elétrico, 1 mL de meio de cultura SOC foi adicionado à cubeta, ressuspendendo as bactérias e transferindo-as para um novo tubo (eppendorf de 1,5 mL). Essa suspensão de bactérias foi mantida em estufa a 37 ºC sob 300 rpm (revoluções por minuto) de agitação por 1 hora. Deste total, 100 μL foram diluídos em 900 μL de meio SOC e destes, 200 μL foram utilizados para plaqueamento em meio LBÁgar 1,2% com ampicilina (100mg/mL), 40 μL de IPTG (100mM) e 100 μL de X-gal (20mg/mL) e mantidos em estufa, a 37 ºC por 16 horas.

3.1.7 Mini-preparação do DNA plasmidial

As colônias obtidas foram inoculadas em placas de cultura de 96 poços, contendo 1 mL de meio *Circle Grow* (CG) e 1μL de ampicilina (100mg/mL) por poço, sendo incubadas a 37ºC por 22 horas sob agitação constante de 300 rpm. As placas de estoque foram preparadas após o crescimento das células, contendo 100 μL da cultura inoculada e 100 μL de glicerol 50% estéril e estocadas em freezer -80 ºC. Para a sedimentação das células as placas foram centrifugadas por 6 minutos, a 3200Xg e o sobrenadante foi descartado por inversão. Ao *pellet* foram adicionados 240 μL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5M, pH 8,0 e Tris-HCl 1M pH 7,4) e misturado em vórtex por 2 minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão. A cada poço foram adicionados 80 μL de GET e agitado em vórtex por 2 minutos. Para a degradação do RNA, transferiu-se 60 μL da suspensão de células para uma microplaca de fundo redondo (tipo Elisa) contendo 2,5 μL de RNAse (10mg/mL). Foram adicionados 60 μL de solução tensoativa de hidróxido de sódio (NaOH 0,2N) com dodecil sulfato de sódio (SDS 1%) e misturado por inversão. Após a incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, acrescentou-se 60 μL de acetato de potássio 3M resfriado a 4ºC, novamente misturando-se e incubando-se. A microplaca foi incubada em estufa a 90ºC por 30 minutos, e em seguida, resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos a 3200Xg, e todo o volume foi transferido para uma placa filtro *Millipore* (MAGV N22) encaixada no topo de uma micro placa de fundo "V" de polipropileno.

Após a centrifugação por 4 minutos, a 3200Xg, o filtro foi removido e, ao material filtrado foram adicionados 110 μL de isopropanol, misturado por inversão e centrifugado por 45 minutos a 3200Xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionados 200 μL de etanol 70% resfriado a 4ºC e centrifugado por 5 minutos a 3200Xg. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi seco por 60 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido com 50 μL de água Milli-Q estéril. A qualidade e a concentração dos clones obtidos foram avaliadas em eletroforese de gel de agarose 0,8%, comparando-se o resultado obtido com o padrão de peso molecular pGEM4Z (40ng/μL).

3.1.8 PCR da mini-preparação do DNA plasmidial

Para a verificação do sucesso da clonagem e tamanho dos insertos no plasmídio, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para cada reação foi utilizado 1 μL de DNA plasmidial, adicionado a 24 μL do mix de reação composto pelos seguintes reagentes: 2,5 μL de tampão 1X (50mM de KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0), 0,75μL de $MgCl_2$ 25mM, 0,5 μL de dNTP 10 mM, 1 μL de *primer* M13 direto (Direto: 5'- GTAAAACGACGGCCAGT- 3') e reverso (Reverso: 5'- AACAGCTATGACCATG- 3') a 3,2 pmoles/μL e 0,4 μL de enzima Taq DNA polimerase, completando com 17,85 μL de água Milli-Q estéril para o volume final de 24 μL. Foi feita a desnaturação inicial por 3 minutos a 95ºC, seguida de nova desnaturação por 30 segundos a 96 ºC e as condições de anelamento e extensão estabelecidas para essa reação foram de 50 ºC por 30 segundos e 72ºC por 2 minutos, respectivamente, totalizando 35 ciclos. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% para verificação da existência e do tamanho dos insertos clonados.

3.1.9 Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada segundo o protocolo do kit *Dyenamic ET Terminator Sequencing Kit (Amersham)*. Os reagentes utilizados para a reação de seqüenciamento da extremidade 5' e 3' foram: 2μL de Tampão *Save Money* (200mM de Tris pH 9, 0,5 mM

$MgCl_2$), 1μL de *primer* T7 (5'- TAATACGACTCATATAGGG- 3') 5 pmoles/μL para a região 5'e 1μL de *primer* SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3') 5 picomoles/μL para a região 3', 2,0 μL de *Dyenamic ET Terminator* e 100 ng de DNA. A reação de seqüenciamento compreendeu desnaturação de 95ºC por 20 segundos, anelamento a 50 ºC por 15 segundos e extensão a 60ºC por 60 segundos, totalizando 25 ciclos.

3.1.10 Purificação da reação de seqüenciamento

Para a purificação da reação de seqüenciamento foram adicionados 80 μL de isopropanol 65%, misturado em vórtex e incubado no escuro por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação por 45 minutos a 3200Xg, o sobrenadante foi removido por inversão, adicionados 150μL de etanol 60% e centrifugado por 15 minutos, a 3200Xg a temperatura ambiente. A placa foi seca por 1 hora a temperatura ambiente e o *pellet* ressuspendido em 10 μL de formamida *Hi-Di.* Em seguida, as amostras foram aplicadas em seqüenciador automático *ABI 3100 Applied Biosystems.*

3.1.11 Análise das seqüências

As análises da qualidade e alinhamento das seqüências e montagem dos *contigs* a partir das sequências geradas foram feitas utilizando-se os programas *Phred* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) e *Cap3* (HUANG; MADAN, 1999). Tais análises geraram algumas denominações específicas, definidas na Tabela 2.

Tabela 2 – Termos utilizados nas análises de bioinformática

Termos	Definição
Read	Sequência de nucleotídeos
Clusterização	Processo de agrupamento dos *reads* em *contigs*
Contigs	Agrupamento de várias *ESTs* mediante a sobreposição de bases
Singletons	Sequências únicas que não entram na formação dos contigs

As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando-se dos programas *BLAST -Basic Local Alignment Search Tool-* (ALTSCHUL et al., 1990) e classificadas de acordo com as seqüências do *Gene Ontology* (http://www.geneontology.org).

a) Análise da qualidade das seqüências (*Phred*)

A qualidade das seqüências foi avaliada pelo programa *Phred,* que atribui um valor de qualidade para cada base seqüenciada. A partir do arquivo de dados brutos do seqüenciador, o programa reconhece as seqüências de nucleotídeos, atribui um valor de qualidade e gera um arquivo de saída contendo os valores. Nesse estudo foram consideradas apenas as ESTs com mais de 150 bases com qualidade superior a 20 (um erro a cada 100 bases seqüenciadas); as que não atingiram esse parâmetro foram removidas da análise.

Durante a análise de qualidade, também foi utilizado o programa *Cross Match* (EWING et al., 1998; EWING;GREEN, 1998) que identifica as seqüências do vetor, adaptadores adicionados às extremidades dos insertos de cDNA e cauda poli(A) presente na extremidade 3'dos cDNAs seqüenciados, e as alteram para a letra X, de maneira a não interferir nos processos de análises de bioinformática (PROSDOCIMI et al., 2002).

b) Clusterização (*Cap3*)

Após as análises de qualidade pelo programa *Phred,* as seqüências com qualidade superior a 20 foram submetidas à clusterização pelo programa *Cap3*. Este programa realiza a montagem de *contigs,* no qual os *reads* referentes à uma mesma seqüência consenso são alinhados por regiões com bases de alta qualidade.

c) Informações geradas

A partir das análises de bioinformática acima citadas, foram gerados relatórios contendo as seguintes informações sobre as bibliotecas seqüenciadas:

- ✓ Número de bases
- ✓ Número de bases com qualidade superior a 20
- ✓ Número total de *reads*
- ✓ Número total de *reads* em *contigs*
- ✓ Número total de *contigs*

- ✓ Número total de *singletons*
- ✓ Índice de novidade (número de *contigs* e *singletons* de cada biblioteca em relação ao número total de *reads* válidos)

d) *Blast*

A partir dos dados de seqüenciamento, as seqüências válidas que formaram *contigs* e os *singletons* foram comparados às depositadas no *GenBank*. Para isso foi utilizado o programa *Blast* (ALSCHUL et al., 1990), que possibilitou a identificação das seqüências pelo grau de similaridade entre elas.

e) Categorização das seqüências

Após as análises de bioinformática, os genes encontrados foram categorizados de acordo com os 3 termos principais de classificação do *Gene Ontology* (http://www.geneontology.org), bem como em suas subcategorias:

- ✓ Componente celular
  - Celular
  - Extra-celular
  - Componente celular desconhecido
  - Complexo imunoglobulina
  - Não localizado
  - Virion
  - Obsoleto
- ✓ Processo Biológico
  - Processo fisiológico
  - Processo celular
  - Desenvolvimento
  - Processo biológico desconhecido
  - Obsoleto
  - Comportamento
  - Ciclo de vida viral
- ✓ Função Molecular

- Ligante
- Atividade catalítica
- Atividade estrutural
- Transdutor de sinal
- Função molecular desconhecida
- Atividade transportadora
- Regulador enzimático
- Regulador da transcrição
- Atividade imune
- Atividade chaperona
- Atividade motora
- Obsoleto
- Regulador da apoptose
- Atividade adesão celular
- Atividade estabilização protéica
- Proteína alvo

f) *Northern* digital

Após as análises de bioinformática, os genes relacionados à resposta imune foram submetidos ao *Northern* digital. Neste programa, o número de ESTs geradas é assumido como sendo proporcional à abundância do transcrito no tecido usado para a construção da biblioteca de cDNA, e a variação na freqüência relativa das ESTs é usada para representar a expressão diferencial do gene correspondente, constituindo o conceito de *Northern* digital (AUDIC; CLAVERIE, 1997). Este procedimento permite inferir a abundância do transcrito de interesse em cada biblioteca de cDNA gerada (ER1 e ES1).

Após o *Northern* digital, foi utilizado o programa *Significance of digital gene expression profiles* (AUDIC; CLAVERIE, 1997) (http://igs-server.cnrs-mrs.fr) para calcular a probabilidade de significância entre os genes diferencialmente expressos. Aqueles que apresentaram expressão diferencial significativa entre bibliotecas foram confirmados pela metodologia quantitativa de PCR em tempo real.

3.1.12 Análise de polimorfismos

Após as análises das seqüências, aquelas categorizadas como sequências únicas e relacionadas à resposta imune foram selecionadas para serem sequenciadas à partir da extremidade 3', utilizando o *primer* SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3').

Este procedimento foi realizado com a finalidade de unir as sequências das duas extremidades (5'e 3'), contribuindo para aumentar seu tamanho, e dessa forma, verificar possíveis polimorfismos entre os genes dos animais dos grupos resistentes e susceptíveis, e ainda, quando possível, entre espécies de *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Para isto, as sequências da extremidade 3' de *Bos indicus* foram clusterizadas às sequências da extremidade 5', formando uma sequência consenso, a qual foi submetida ao *GenBank* para obtenção, da mesma, na espécie de *Bos taurus.*

3.2 Análise da expressão gênica

3.2.1 Animais

Inicialmente, os animais utilizados para as análises de expressão gênica seriam os mesmos 20 animais selecionados pela contagem de OPG e utilizados na construção das bibliotecas. Entretanto, após a recuperação e contagem dos parasitas (realizada no Laboratório de Parasitologia da UNESP de Botucatu), alguns animais classificados como resistentes, apresentaram altas contagens de parasitas; em contrapartida, animais classificados como susceptíveis apresentaram carga parasitária mínima. Por estes motivos, os animais identificados como 8, 40, 60, 72 e 81, foram excluídos das análises de quantificação da expressão gênica. Assim, os grupos passaram a ser compostos por 7 animais resistentes e 8 animais susceptíveis.

3.2.2 Extração de RNA total

O isolamento do RNA total dos tecidos foi realizado segundo o protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). A extração foi realizada separadamente para cada animal e para cada tecido (Material e Métodos ítem 3.1.4).

3.2.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se o *Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 5 µg de RNA total das amostras de tecidos, 1 µL de *primer* oligo (dT) a 0,5µg/µL; 1µL de dNTP mix 10 mM. Após a incubação a 65º por 5 minutos, a reação foi resfriada em gelo por 1 minuto. À essa mistura foram adicionados 2 µL de *Buffer RT* 10X, 4 µL de $MgCl_2$ 25mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de *Rnase OUT* (40u/µL) em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 42ºC por 2 minutos e adicionadas 50 unidades da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen). A transcrição reversa foi feita a 42ºC por 50 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70ºC por 15 minutos. Para remover o RNA molde da molécula híbrida cDNA:RNA foi feita digestão com 2 unidades de *Rnase H* por 20 minutos a 37ºC.

Os passos realizados para a síntese de cDNA estão sumarizados na Figura 2.

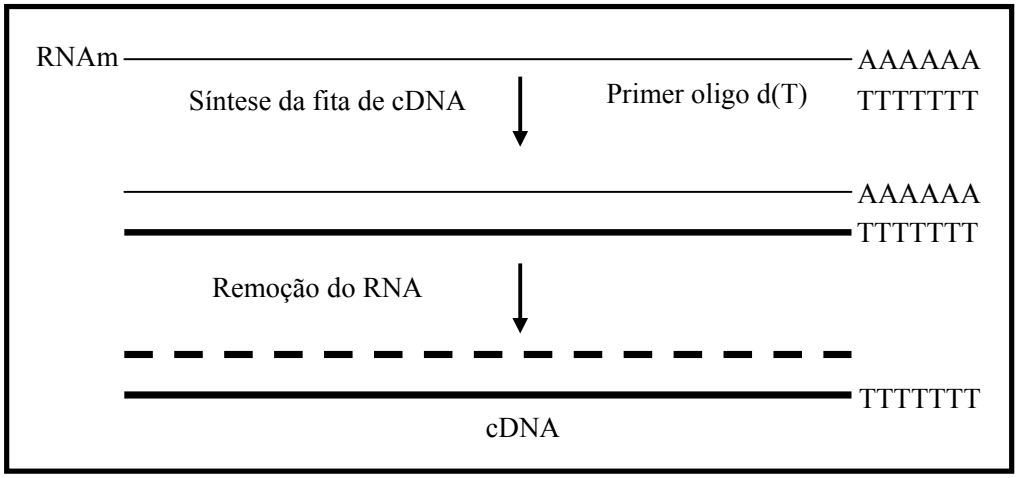

Figura 2 – Etapas da síntese de cDNA

3.2.4 Desenho dos *primers*

Após a escolha dos genes, os *primers* disponíveis na literatura foram testados através do programa *Primer3* (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (ROZEN;

SKALETZKY, 2000) para verificação da temperatura e a região de anelamento através do *site* disponibilizado na internet pela *Qiagen* (www.operon.com), cujas ferramentas permitem a identificação de dímeros em cada *primer* e entre eles. A partir dos resultados obtidos, optou-se por construir *primers* próprios.

Para isso, foi realizada uma pesquisa por seqüências específicas dos genes de interesse nos bancos de dados e posterior utilização do programa *Primer3* para a construção dos *primers*. A verificação de suas características e qualidades foi feita pelo *site* da *Qiagen.*

Os genes pepsinogênio (PEP) e lisozima (LIS), encontrados como diferencialmente expressos entre as bibliotecas, também foram quantificados pela metodologia de PCR em tempo real com a finalidade de confirmar os dados obtidos a partir do seqüenciamento. A quantificação foi feita somente a partir das amostras do abomaso, e as sequências utilizadas para a contrução dos *primers* foram as obtidas com o seqüenciamento das ESTs. A Tabela 3 mostra as características dos *primers* desenhados.

Tabela 3 – Seqüência, exons e tamanho dos fragmentos amplificados para cada par de *primer* desenhado

(continua)

Genes	Sequência (5'→ 3')	Exons usados	Tamanho do fragmento (pb)
IL-2	F- TCCAAGCAAAAACCTGAACC	E3	
	R- CAGCGTTTACTGTTGCATCATC	E4	198
IL-4	F: TGCATTGTTAGCGTCTCCTG	E1	
	R: AGGTCTTTCAGCGTACTTGT	E2	450
IL-8	F- TGGGCCACACTGTGAAAAT	E1	
	R- TCATGGATCTTGCTTCTCAGC	E3	203
IL-12p35	F- GAGGCCTGTTTACCACTGGA	E1	
	R- CTCATAGATACTTCTAAGGCACAG	E4	143
IL-13	F: GGTGGCCTCACCTCCCCAAG	E2	
	R: GATGACACTGCAGTTGGAGATGCTG	E4	234
TNF-α	F- TAACAAGCCGGTAGCCCACG	E3	
	R- TCTTGATGGCAGACAGGATG	E4	279
IFN-γ	F- GCCAAATTGTCTCCTTCTACTTC	E3	
	R- GGGTCAAGTGAAATAGTCACAGG	E4	484
MCP-1	F- CAAGTCGCCTGCTGCCTATAC	E2	
	R- AGAGGGCAGTTAGGGAAAGC	E3	278

Tabela 3 – Seqüência, exons e tamanho dos fragmentos amplificados para cada par de *primer* desenhado

(conclusão)

Genes	Sequência (5'→ 3')	Exons usados	Tamanho do fragmento (pb)
MCP-2	F- GGGATTCTGTGTCTGCTGCT	E1	
	R- TTTGGTCCAGGAGCCTTATG	E3	241
MUC-1	F- TGCTGTTCCCAGTGCTTACA	E1	
	R- GAGACGAGGTGCCATTGT	E2	276
RPL-19	F- GAAATCGCCAATGCCAAC	E1	
	R- GAGCCTTGTCTGCCTTCA	E2	410
GAPDH	F- GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	E1	
	R- CCCTCCACGATGCCAAAGT	E2	194
PEP	F- CGCTTCAACCCTCAAGACTC	E1	
	R- CGAAGGGAGCGTAGTACAGG	E2	210
LIS	F- CTTCCTTTCTGTCGCTGTCC	E3	
	R- TGCCATCATTACACCACCAT	E4	240

3.2.5 Confirmação da especificidade dos *primers*

A especificidade dos produtos de RT-PCR foi confirmada em eletroforese de gel de agarose. Estes produtos também foram seqüenciados usando *DYEnamic ET DyeTerminator Sequencing Kit* (*Amersham Bioscience)* e analisados em *ABI 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems)*.

Além disso, foi realizada a análise da curva de *melting* para a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, podendo-se diferenciar os produtos desejados e inespecíficos.

3.2.6 Eficiência de amplificação

Para calcular a eficiência de amplificação de todos os genes, uma curva de diluição em série de cDNA foi realizada. A partir dos dados obtidos, foi produzido um gráfico do Ct (*threshold cycle*) versus o log10 do número relativo de cópias da diluição em série. Regressão linear foi feita para determinar o coeficiente angular da reta, que é usado para determinar a

eficiência de amplificação utilizando a fórmula: Eficiência = $10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$ (PFAFFL, 2001).

3.2.7 Escolha do gene controle

Para escolher o melhor gene controle para ser usado nesse trabalho, foram testados 2 genes: RPL-19 (proteína ribossomal 19) e GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor de Ct para cada gene em cada grupo experimental foi obtido e analisado pelo programa REST© (Relative Expression Software Tool) desenvolvido por Pfaffl, Horgan e Demple (2002), a fim de verificar possível variação de sua expressão entre tratamentos.

3.2.8 Reações de PCR em tempo real

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o mix composto pelos seguintes reagentes: 0,4 μL de dNTP mix 10 mM, 1 μL de cada primer (concentração variando de 2,0 a 2,5 pmoles/μL), 0,8 μL de $MgCl_2$ 25mM, 0,25 μL de BSA (20mg/mL), 0,3μL de *Taq Platinum* (5u/μL Invitrogen), *Sybr Green I* e 11,55 μL de Água Milli-Q. As reações foram preparadas adicionando-se 19 μL do mix em cada capilar, seguidos de 7,5ng de cDNA em cada reação. Os capilares foram centrifugados a 700Xg por 5 segundos e colocados no equipamento *LightCycler* (Roche), seguindo as condições específicas para cada gene (Tabela 4). A desnaturação inicial e o passo de desnaturação foram os mesmos para todos os *primers*, isto é, 95ºC por 5 minutos e 95ºC por 10 segundos, respectivamente. A temperatura de aquisição de fluorescência foi de 72ºC.

Tabela 4 – Condições das reações de PCR para os genes estudados

(continua)

Gene	Concentração do primer (picomoles)	Anelamento	Extensão
IL-2	2,5	57ºC/ 7 seg	72ºC/ 6 seg
IL-4	2,0	56ºC/ 6 seg	72ºC/ 17 seg
IL-8	2,5	53ºC/ 5 seg	72ºC/ 9 seg
IL-12p35	2,0	58ºC / 7 seg	72ºC/ 7 seg

Tabela 4 – Condições das reações de PCR para os genes estudados

(conclusão)

Gene	Concentração do primer (picomoles)	Anelamento	Extensão
IL-13	2,5	60ºC / 7 seg	72ºC/ 9 seg
TNF-α	2,0	57ºC / 7 seg	72ºC/ 12 seg
IFN-γ	2,0	61ºC / 7 seg	72ºC/ 22 seg
MCP-1	2,5	56ºC / 5 seg	72ºC/ 12 seg
MCP-2	2,0	61ºC / 7 seg	72ºC/ 10 seg
MUC-1	2,5	55ºC/ 5 seg	72ºC/ 12 seg
RPL-19	2,5	60ºC / 7 seg	72ºC/ 16 seg
GAPDH	2,5	59ºC/ 7 seg	72ºC/ 5 seg
PEP	2,5	60ºC / 7 seg	72ºC/ 9 seg
LIS	2,0	60ºC / 7 seg	72ºC/ 9 seg

3.2.9 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro

Para a quantificação dos resultados foi escolhido o método de quantificação relativa (Pfaffl, 2001), uma vez que se deseja saber a diferença de expressão entre os grupos estudados. Esse método é baseado na quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle denominado referência ou controle interno (RPL-19), para que se minimizem as possíveis variações quanto à quantidade de RNA utilizada inicialmente e eficiência na transcrição reversa. A razão da expressão relativa é baseada na eficiência (E) de amplificação dos primers e na variação do ciclo de início da detecção do produto amplificado (C_t) de uma amostra do grupo controle versus uma amostra do grupo tratamento, corrigidos para o gene referência:

A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa escolhido.

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene de interesse}})^{\Delta Ct\ (Ct\ \text{médio do grupo controle} - Ct\ \text{médio do grupo tratratamento})}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta Ct\ (Ct\ \text{médio do grupo controle} - Ct\ \text{médio do grupo tratratamento})}}$$

Para o cálculo das razões foi utilizado o programa REST© (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL; HORGAN; DEMPLE , 2002).

O nível de significância para qualquer diferença obtida entre os grupos foi avaliado por análises não-paramétricas usando o mesmo software, testando a significância dos transcritos pelo teste de *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*© (Teste de casualização através da realocação fixa aos pares). Para todas as análises estatísticas, o nível de significância atribuído foi de $P<0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Exames parasitológicos

Este trabalho procurou identificar animais que respondessem diferencilamente às infecções, pois há carência de informações e desconhecimento sobre a existência de uma linhagem de bovinos comprovadamente resistentes a nematódeos gastrintestinais nas regiões tropicais. Para isto, o primeiro passo foi identificar, em uma população comercial, os animais resistentes e susceptíveis a estes nematódeos, através da medida fenotípica de contagem de ovos de estrongilideos por grama (OPG) de fezes. Isto tornou possível a identificação dos animais que apresentavam alta e baixa contagem de OPG, e sua utilização neste experimento (Figura 3).

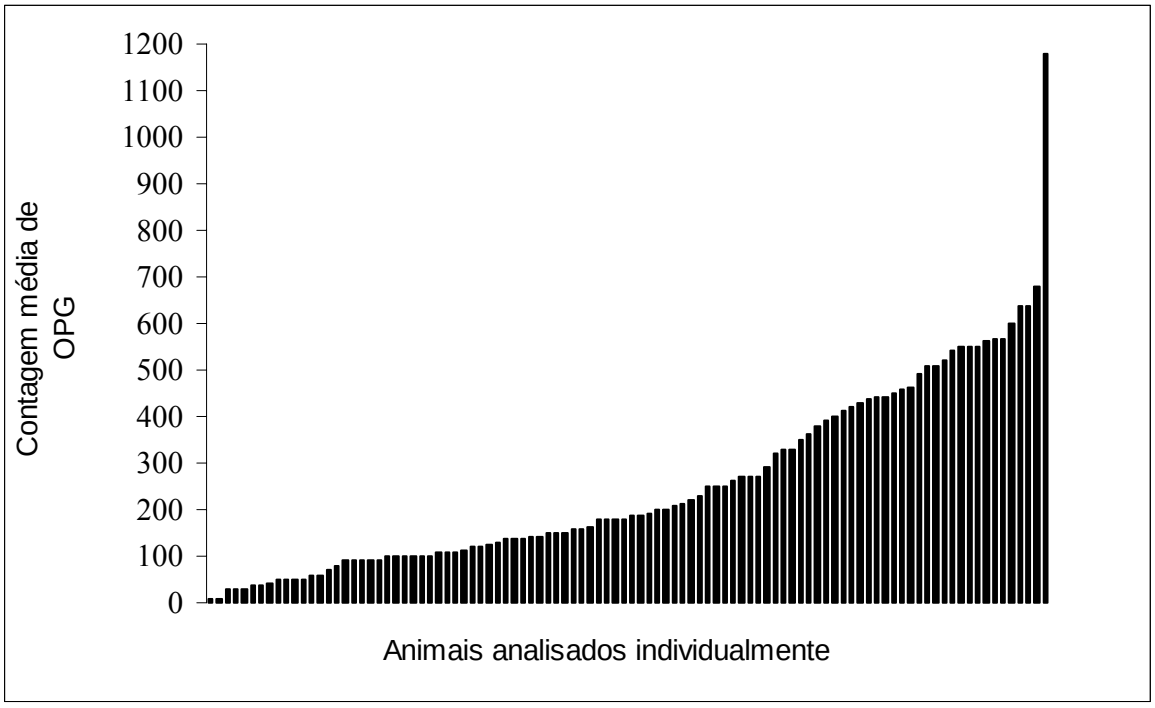

Figura 3 – Contagem média de OPG para cada animal monitorado no período de 31 de outubro de 2003 a 26 de janeiro de 2004

A contagem de OPG possibilitou separar os 10 animais que apresentavam a menor média, denominados resistentes (ER1) e os 10 com maior média da contagem de OPG, denominados susceptíveis (ES1) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média ± desvio padrão da contagem de OPG de cada animal pertencente ao grupo resistente e susceptível, selecionado no período de 31 de outobro de 2003 a 26 de janeiro de 2004

	Média de OPG dos animais resistentes ± desvio padrão	Média de OPG dos animais susceptíveis ± desvio padrão
	7,14 ± 18,89	550,00 ± 437,79
	8,33 ± 20,41	678,57 ± 719,87
	42,85 ± 34,50	635,71 ± 318,47
	50,00 ± 77,45	635,71 ± 343,64
	35,71 ± 55,63	564,28 ± 302,37
	35,71 ± 47,55	720,00 ± 207,96
	28,57 ± 39,33	641,66 ± 188,19
	50,00 ± 50,00	1178,57 ± 1040,38
	28,57 ± 26,72	600,00 ± 305,5
	28,57 ± 39,30	550,00 ± 445,34
Média	31,61 ± 43,11	674,62 ± 505,67

Nota: Os dados apresentados estão em escala original. Entretanto, devido à variável analisada não apresentar distribuição normal, houve a necessidade de transformar os dados para LOG10 (OPG) + 1 para homogeneizar as variâncias.

Utilizando-se o procedimento PROC MEANS do Programa Estatístico SAS (1989), pôde-se verificar que as médias de OPG dos animais resistentes (31,61) e susceptíveis (674,62) são estatisticamente diferentes ($P<0,001$).

Entretanto, a metodologia da contagem de OPG indica o número total de ovos presentes nas fezes dos animais, sem identificar o parasita existente. Por este motivo, houve a necessidade da realização das coproculturas, a fim de identificar os parasitas presentes nos animais experimentais.

As análises de coproculturas realizadas em grupos de animais separados pela contagem de OPG permitiram concluir que a infestação é mista, causada por várias espécies de nematódeos com diferentes graus de patogenicidade. Houve a predominância dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus* e em menor incidência *Oesophagostomum* (Figura 4).

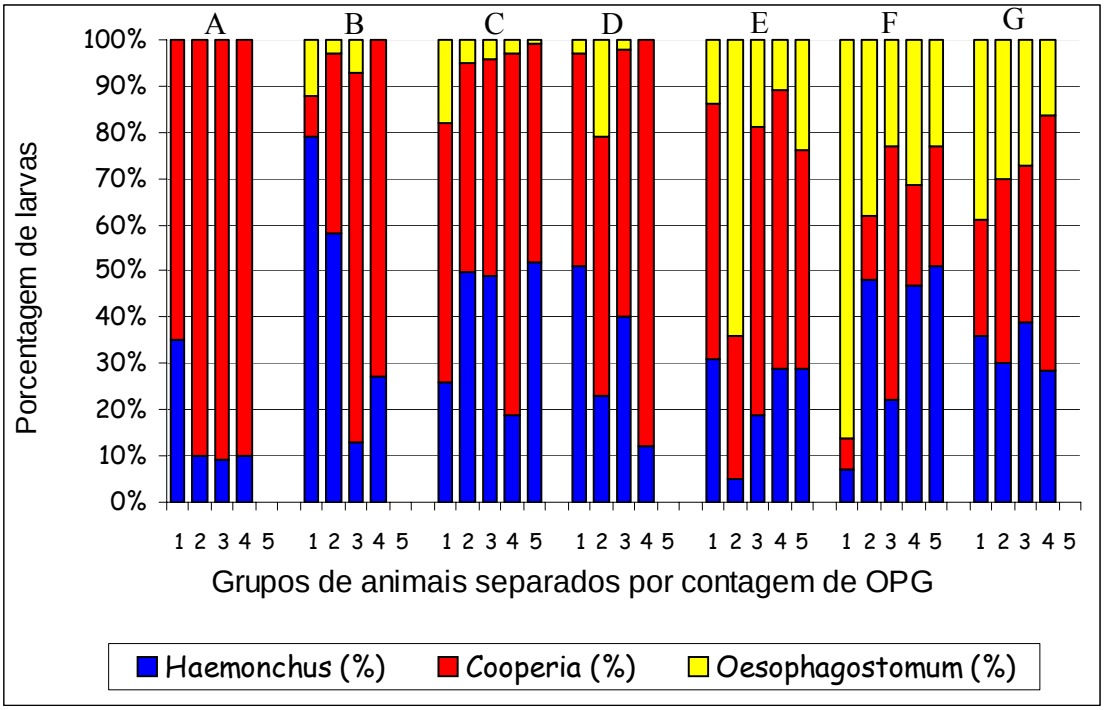

Figura 4 – Porcentagem de larvas infectantes de endoparasitas gastrintestinais identificados nas culturas de fezes de bovinos separados de acordo com a contagem de OPG. As letras A, B, C, D, E, F e G correspondem às coletas dos dias 31/10, 17/11, 01/12, 15/12, 29/12 de 2003, e 12/01 e 26/01 de 2004 e os números: (1) grupo com contagem zero; (2) grupo de 50 a 200 OPG; (3) grupo de 250 a 500; (4) grupo de 550 a 1000 OPG e (5) grupo acima de 1050 OPG

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Pimentel Neto e Fonseca (2002) e Nicolau et al. (2002). Pimentel Neto e Fonseca (2002) identificaram os gêneros *Cooperia, Haemonchus* e *Oesophagostomum* como sendo os de maior ocorrência em bezerros mestiços (Zebu e Holandês) do Rio de Janeiro. Nicolau et al. (2002), constataram elevada ocorrência de *Cooperia punctata* e um nível relativamente baixo de *Haemonchus placei* e *Oesophagostomum radiatum* em bovinos jovens machos da raça Nelore do Estado de São Paulo.

De modo geral, rebanhos bovinos pertencentes às regiões de Minas Gerais, São Paulo e Paraná são parasitados por nematódeos pertencentes aos gêneros *Cooperia, Haemonchus, Oesophagostomum, Trichostrongylus*, *Trichuris* e, ocasionalmente, por *Bonostomum* e *Agriostomum* (RUAS; BERNE, 2001).

A maior ocorrência de larvas do gênero *Cooperia* pode ser devido ao elevado grau de resistência deste parasita em relação às condições ambientais (GUIMARÃES; COSTA; LIMA,

1990). Pimentel Neto e Fonseca (1999) estudando a distribuição sazonal das populações de *Cooperia* e outros parasitas verificaram a presença dessas larvas em todas as épocas do ano, sendo que, amplitudes de temperatura e pluviosidade, não interferiram no seu desenvolvimento.

O gênero *Oesophagostomum* foi encontrado em pequenas quantidades na fase inicial do experimento, com aumento de sua incidência no período final do estudo, coincidindo com a estação chuvosa. Lima (1998) observou que *Oesophagostomum* spp. estavam presentes em pequenos números em bovinos em muitos meses do ano; entretanto, grandes números foram recuperados ocasionalmente durante os períodos chuvosos no estado de Minas Gerais.

Vale ressaltar que, antes do início do experimento, todo o rebanho foi submetido a periódicos tratamentos com lactonas macrocíclicas (ivermectina). Um recente estudo conduzido na região oeste do estado de São Paulo indicou que a existência de resistência de espécies de *Haemonchus* e *Cooperia* a diversos grupos de anti-helmínticos, particularmente, lactonas macrocíclicas é muito comum em bovinos de corte (SOUTELLO, 2005). A prevalência de *Haemonchus* e *Cooperia* nas primeiras culturas de larvas sugerem a existência de cepas resistentes a ivermectinas. A interrupção do tratamento anti-helmíntico devido ao manejo dos animais para o experimento, pode ter contribuído para um aumento da população de *Oesophagostomum*, uma vez que não há relatos do desenvolvimento de resistência a anti-helmínticos deste parasita em bovinos.

As análises de recuperação e contagem de carga parasitária realizadas com os 10 animais resistentes e os 10 susceptíveis selecionados pelas contagens de OPG, confirmaram a presença de nematódeos imaturos do gênero *Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum*.

Entretanto, quando a carga parasitária dos grupos foi analisada após o abate, identificou-se que os animais número 8, 60 e 81, classificados como resistentes, apresentaram níveis elevados de parasitas, enquanto que os de número 40 e 72, classificados como susceptíveis, apresentaram níveis reduzidos de nematódeos gastrintestinais (Tabela 6).

Por este motivo, esses animais (número 8, 40, 60, 72 e 81) foram excluídos da próxima fase do projeto, ou seja, das análises de quantificação da expressão gênica. Os grupos resistente e susceptível até então formados por 10 animais cada, passaram a ser constituídos respectivamente por 7 e 8 animais.

Tabela 6– Análises da carga parasitária

Número do animal	Grupo	Carga total	Número de *Haemonchus*	Número de *Cooperia*	Número de *Oesophagostomum*
8	ER1	3080	260	2760	60
34	ER1	40	0	0	40
39	ER1	380	0	100	280
42	ER1	260	20	0	240
60	ER1	7800	40	7620	140
64	ER1	920	260	660	0
81	ER1	3400	260	3100	40
84	ER1	440	300	0	140
87	ER1	1260	380	760	120
89	ER1	260	40	0	220
4	ES1	8357	1060	6537	760
9	ES1	13900	1460	12260	180
17	ES1	5340	1360	3780	200
23	ES1	7200	3400	3660	140
40	ES1	2420	1680	640	100
51	ES1	8733	880	7793	60
54	ES1	3100	720	2240	140
55	ES1	8500	1480	6940	80
72	ES1	160	80	20	60
82	ES1	5040	600	4200	240

4.2 Extração do RNA total e seleção do RNA mensageiro

A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a qualidade das amostras de RNA total extraídas (Figura 5). A integridade do material é avaliada pela presença e relação das bandas do RNA ribossômico (28S e 18S). Após a verificação da qualidade do RNA total, a população de RNAm foi selecionada, quantificada e diluída para a concentração de 1μg/μL.

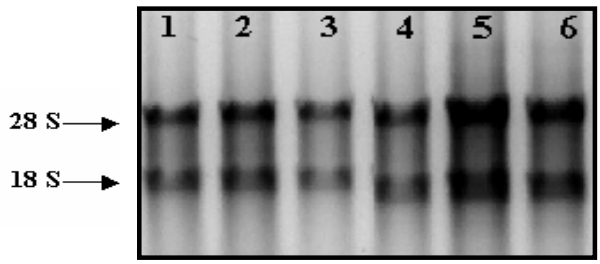

Figura 5 – Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S e 18S). Amostras 1, 2, 3 correspondem, respectivamente, ao abomaso, intestino delgado e nódulos linfáticos abomasais dos animais do grupo com baixa contagem de OPG (ER1), e as amostras 4, 5, 6, aos mesmos tecidos dos animais do grupo com alta contagem de OPG (ES1)

4.3 Construção da biblioteca de cDNA

Após o isolamento do RNAm foi feita a síntese de cDNA para a construção das bibliotecas. Entretanto, como há possibilidade de gerar cDNAs de diferentes tamanhos, este foi separado em colunas de fracionamento de acordo com o tamanho desejado.

Desse modo, procede-se o fracionamento, sendo que fragmentos que não continham os adaptadores foram coletados nas primeiras frações. Em seguida, os fragmentos maiores, e os menores foram coletados nas frações posteriores.

Foi utilizada a fração 11 para a biblioteca ER1, e as frações 8 e 9 para a biblioteca ES1, escolhidas de acordo com a quantidade de cDNA, de maneira a garantir uma quantidade suficiente para a realização da ligação (aproximadamente 10 ng/μL) com o vetor de clonagem, e de acordo com o tamanho dos cDNAs, visualizados em eletroforese de gel de agarose 1% (Figuras 6 e 7).

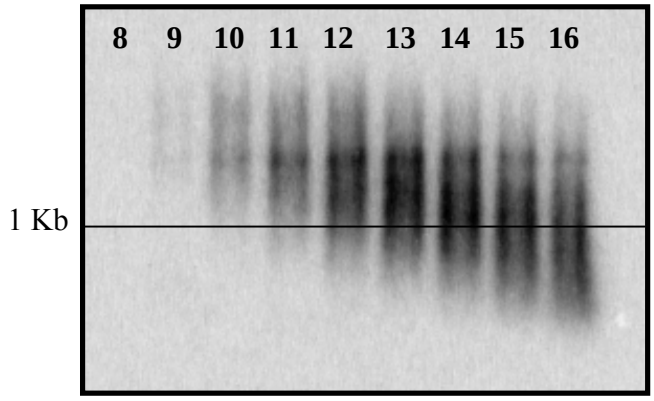

Figura 6 – Gel de agarose 1% para verificação da quantidade de cDNA e o tamanho dos insertos de cada fração da biblioteca ER1. Os números representam as frações obtidas em coluna cromatográfica

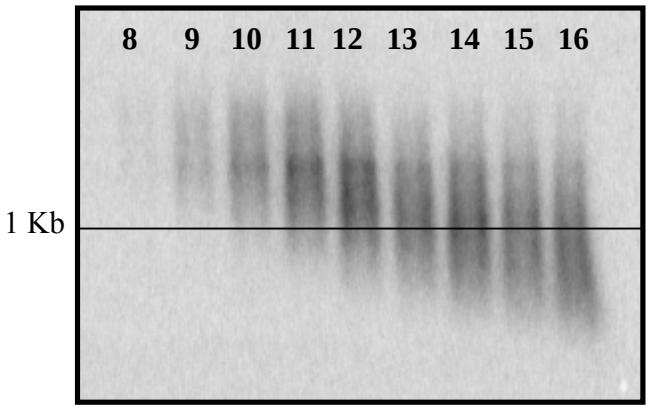

Figura 7 – Gel de agarose 1% para verificação da quantidade de cDNA e o tamanho dos insertos de cada fração da biblioteca ES1. Os números representam as frações obtidas em coluna cromatográfica

Sendo assim, cDNAs de tamanho entre 500 pb (pares de bases) até 1 Kb (1000 pb) foram selecionados para serem clonados, respeitando-se os limites do vetor de clonagem, no caso, o pSPORT1.

4.4 Mini-preparação do DNA plasmidial

Após a ligação dos cDNAs selecionados por fracionamento ao vetor de clonagem, estes foram inseridos em bacteria *E.coli* DH10B competente. Em meio de cultura adequado, essas células se multiplicaram, e as colônias que continham o inserto foram selecionadas para que estes pudessem ser isolados da bactéria através da técnica de lise alcalina, mais conhecida como mini-preparação do DNA plasmidial.

Após a extração, a qualidade e concentração dos clones foram avaliadas em gel de agarose 0,8%, comparando-se o resultado obtido com o padrão de peso molecular pGEM4Z (40ng/μL), como pode ser verificado nas Figuras 8 e 9.

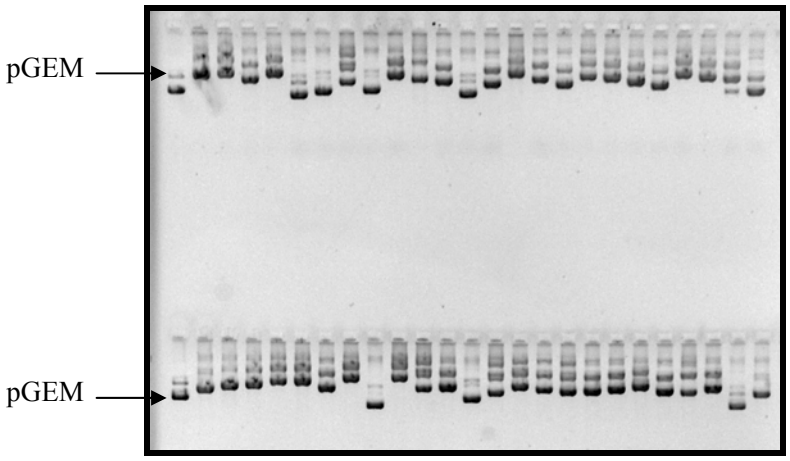

Figura 8 – Gel de agarose 0,8% utilizado para a verificar a qualidade e estimar a concentração do DNA plasmidial. Na primeira canaleta é mostrado o padrão molecular pGEM 4Z (40ng/μL) e as demais referem-se aos clones obtidos na construção da biblioteca ER1

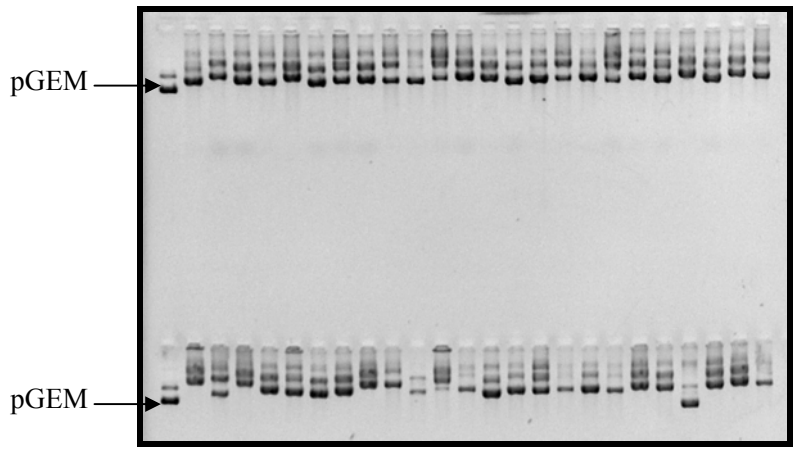

Figura 9 – Gel de agarose 0,8% utilizado para a verificar a qualidade e estimar a concentração do DNA plasmidial. Na primeira canaleta é mostrado o padrão molecular pGEM 4Z (40ng/μL) e as demais referem-se aos clones obtidos na construção da biblioteca ES1

A partir da análise do gel, foi constatado que a maioria dos clones obtidos estavam na concentração de aproximadamente 200ng/μL, uma vez que 2μL de DNA foram aplicados em cada canaleta para serem comparados com os 5 μL (200ng) de pGEM4Z.

4.5 Avaliação do tamanho dos insertos clonados

Para verificação do tamanho dos insertos clonados, foi feita a reação de PCR com o DNA proveniente da mini-preparação do DNA plasmidial. Os produtos dessa reação foram visualizados em gel de agarose 0,8% (Figuras 10 e 11).

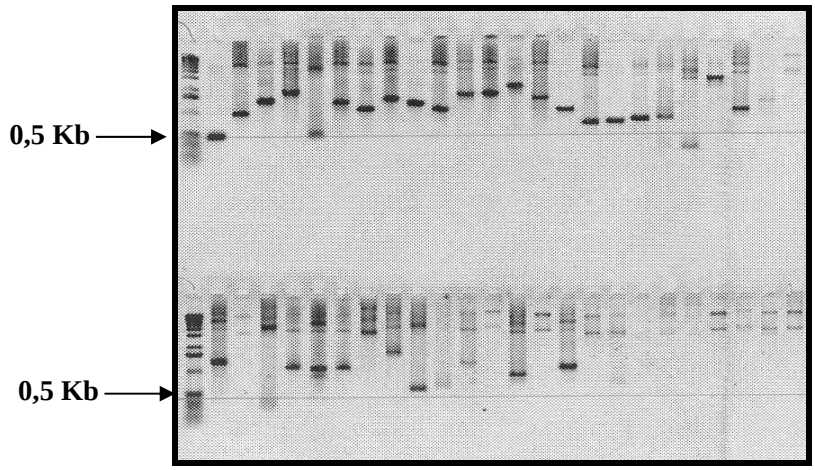

Figura 10 – Gel de agarose 0,8% para verificação do tamanho dos insertos clonados da biblioteca ER1. A canaleta 1 corresponde ao marcador molecular *1 Kb DNA Ladder* (GIBCO/BRL) e as demais ao DNA proveniente da minipreparação plasmidial

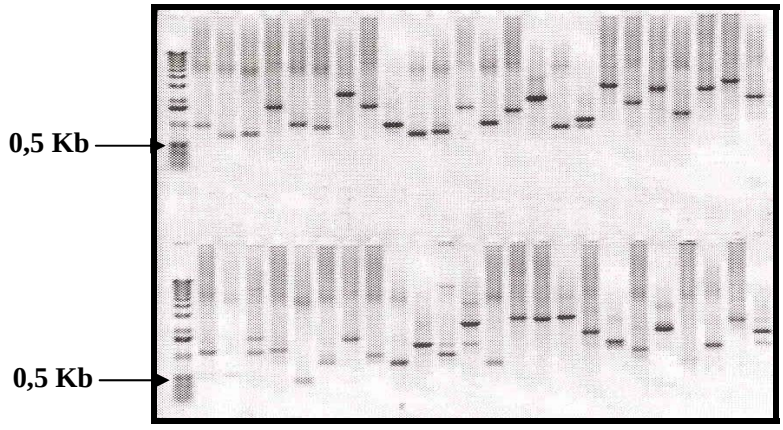

Figura 11 – Gel de agarose 0,8% para verificação do tamanho dos insertos clonados da biblioteca ES1. A canaleta 1 corresponde ao marcador molecular *1 Kb DNA Ladder* (GIBCO/BRL) e as demais ao DNA proveniente da minipreparação plasmidial

Pode-se notar que os cDNAs clonados apresentavam tamanho igual ou superior a 0,5 Kb. A seleção de insertos grandes é importante, uma vez que proporciona a maximização da informação no seqüenciamento, além de aumentar as chances de obtenção de cDNA *full-lengh.*

4.6 Análise das ESTs

Foram geradas 2496 ESTs de cada biblioteca. Todavia, após a utilização do programa *Phred* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) para a seleção das sequências compostas por mais de 150 pb e do progama *Cross Match* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) para a remoção da sequência do vetor de clonagem, das 2496 ESTs geradas para cada biblioteca, 1664 e 1898 ESTs foram válidas para as bibliotecas ER1 e ES1, respectivamente.

Em seguida, utilizando-se o programa *Cap3* (HUANG; MADAN; 1999) gerou-se os *contigs,* no qual os *reads* referentes à uma mesma seqüência consenso foram alinhados por regiões com bases de alta qualidade, cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Perfil das bibliotecas ER1 e ES1

Biblioteca	Total de *reads* válidos	Total de *singletons*	Total de *reads* em *contigs*	Total de *contigs*	Total de *clusters*
ER1	1664	1103	561	128	1231
ES1	1898	1411	487	124	1535
ER1/ES1	3562	2323	1239	301	2624

A distribuição dos *contigs* entre bibliotecas foi: ER1 apresentou 55,62% e a ES1 25,25% de seqüências agrupadas em contigs de até 10 ESTs; 15,32% e 21,57% em contigs de 11 a 30 ESTs; 29,05% e 35,32% em contigs com mais de 80 ESTs, e 17,86% em contigs compostos por 30 a 60 ESTs somente para a biblioteca ES1. As Figuras 12 e 13 mostram a distribuição das sequências em *contigs.*

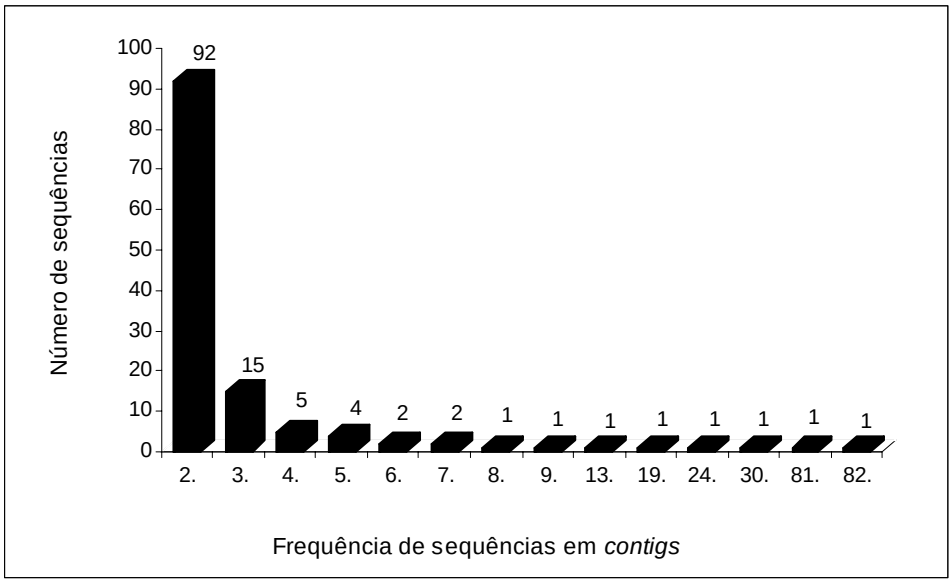

Figura 12 – Distribuição das seqüências ER1 em *contigs*

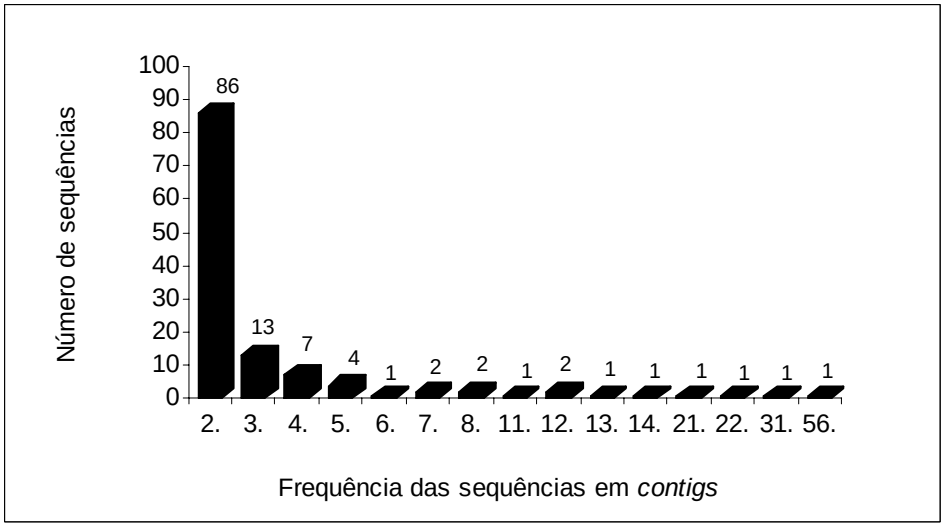

Figura 13 – Distribuição das sequências ES1 em *contigs*

A análise de clusterização conjunta revelou um índice de 72,74% de novidade para o banco de ESTs construído. Este índice fornece informação quanto à redundância, mostrando que a cada 10 seqüências geradas, pelo menos 7 representam seqüências novas para o banco. Para a biblioteca ER1 o índice foi calculado em 73,98% e para a ES1 em 80,87%. Estes índices indicam

que a biblioteca do grupo susceptível contribuiu com um maior número de seqüências novas para o banco de dados em relação à biblioteca do grupo resistente.

4.6.1 Categorização das ESTs

As seqüências obtidas foram classificadas de acordo com a categorização proposta pelo *Gene Ontology*. Dessa forma, das 1664 seqüências ESTs válidas geradas para a biblioteca ER1, 458 foram categorizadas, sendo 424 classificadas como componente celular, 439 como processo biológico e 433 como função molecular. Das 1898 seqüências ESTs válidas geradas para a biblioteca ES1, 613 foram categorizadas, sendo 571 classificadas como componente celular, 580 como processo biológico e 584 como função molecular, bem como em suas subcategorias (Figuras 14, 15 e 16).

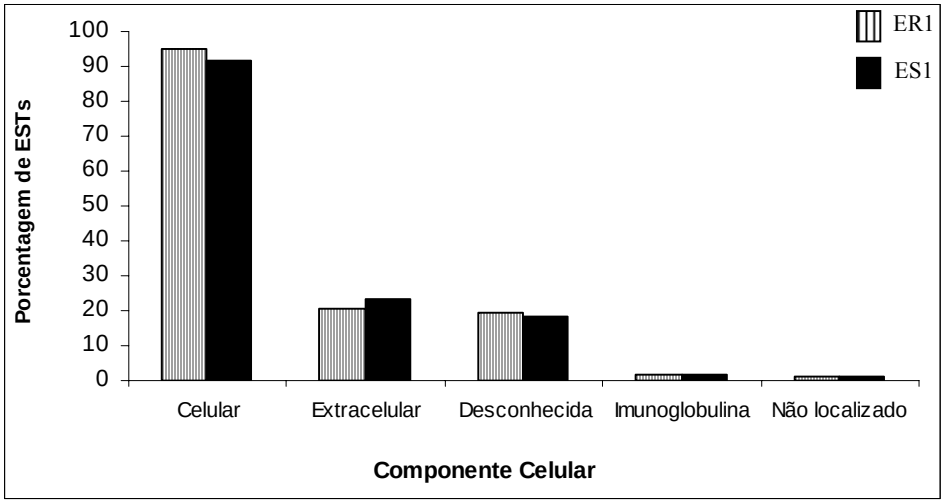

Figura 14 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de componente celular

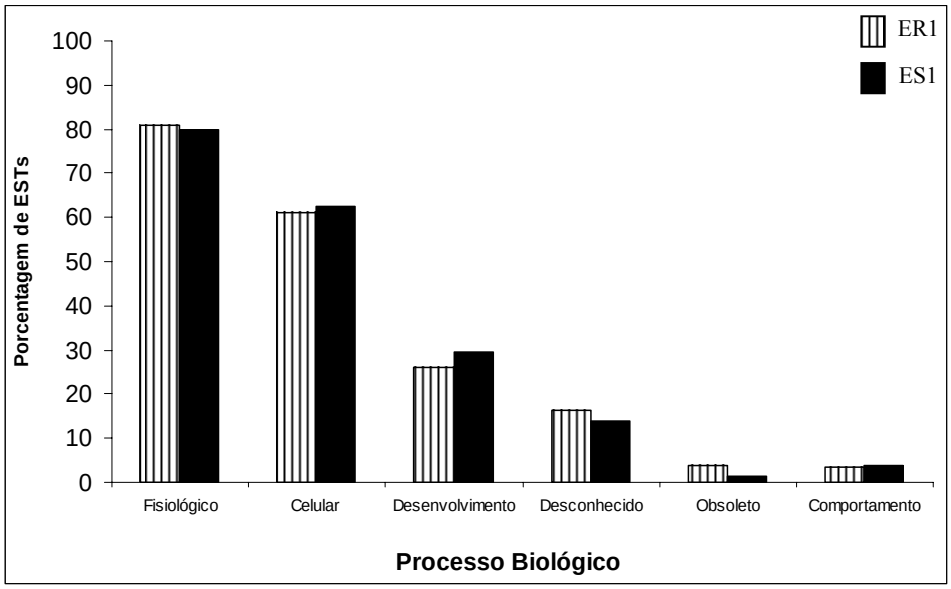

Figura 15 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de processo biológico

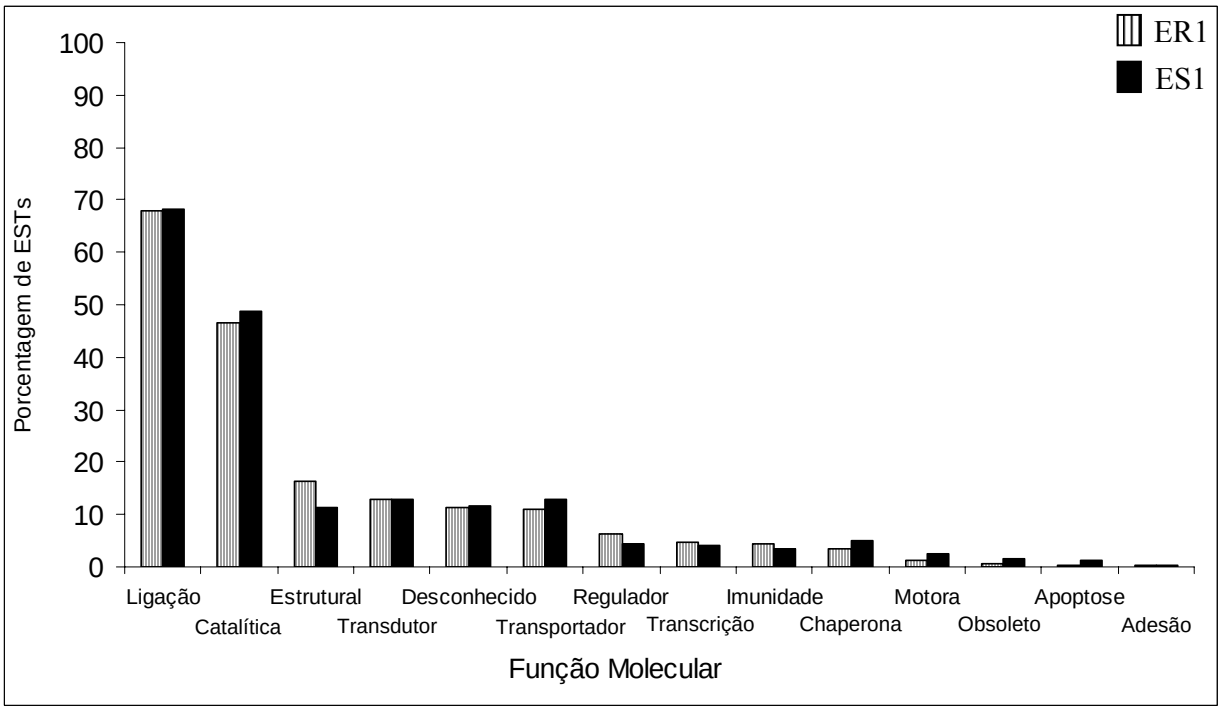

Figura 16 – Distribuição das seqüências das bibliotecas na categoria de função molecular

Vale ressaltar que, em relação à classificação do *Gene Ontology* ambas bibliotecas apresentaram porcentagens semelhantes de seqüências classificadas.

Das seqüências ESTs obtidas da biblioteca ER1, foi determinada a presença de vários produtos gênicos relacionados à resposta imunológica, embora não classificados diretamente como componentes da resposta imune na categorização proposta pelo *Gene Ontology*.

Assim, destacam-se:

- ✓ Proteínas ativadoras das células T, cuja principal função é estimular a diferenciação destas células, para que possam iniciar uma resposta imune (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Mucina gástrica, uma glicoproteína de membrana que participa de diversas interações entre helmintos parasitas e seus hospedeiros, funcionando como componente da barreira luminal, constituindo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de patógenos (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE et al., 2003);
- ✓ Proteassomas que regulam importantes processos celulares através de sua habilidade seletiva em degradar proteínas celulares, sendo estas as maiores fontes de peptídeos apresentados pelas moléculas da classe I do MHC (PETROVSKY; BRUSIK, 2004);
- ✓ C1q, primeiro componente da via clássica de ativação da cascata do complemento, também denominado lectina, que conecta a resposta imune adaptativa humoral ao sistema do complemento através da ligação de anticorpos complexados com o antígeno; pode também se ligar diretamente à superfície de certos patógenos e induzir a ativação do complemento na ausência do anticorpo (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Anexinas que também participam da via do complemento e atuam como potentes anti-inflamatórios, através da inibição de determinadas lipases, enzimas responsáveis pela inflamação e citotoxidade (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Cadeias leves e pesadas que constituem os peptídeos de classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), envolvidos na apresentação de antígenos (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Proteínas NFYC, fatores nucleares que promovem a transcrição de proteínas da classe II do MHC (JABRANE-FERRAT et al., 2002);
- ✓ Fator trefoil 3, envolvido na manutenção e integridade da mucosa, localizado nas células caliciformes do intestino delgado e grosso, onde a redução de sua expressão

leva ao aumento da susceptibilidade aos danos intestinais (CARRASCO et al., 2004);

- ✓ Proteínas MAX que são grandes GTPases indutoras de interferon, uma citocina que participa da resposta T_H1 (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Leucotrienos, mediadores de lipídeos nos processos inflamatórios, liberados no momento de desgranulação dos eosinófilos, com propriedade de quimiotaxia de leucócitos (SHI, 2004);
- ✓ Receptores de IL-1, IL-4, IL-2, TNF, MCP-1, que são citocinas mediadoras da resposta imune (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Imunoglobulinas (glicoproteínas com atividade anticorpo), tais como IgA, predominantes do sistema imune de mucosas e que limitam a aderência do parasita ao epitélio e, desse modo, reduzem as taxas de colonização local; IgE que desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (HUSBAND, BAO; BEAGLEY,1999); membros da superfamília de imunoglobulinas 6;
- ✓ Receptores de linfócitos T e B.

Do mesmo modo, das seqüências ESTs obtidas da biblioteca ES1, foi determinada a presença de vários produtos gênicos relacionados à resposta imune, embora não classificados diretamente como componentes da resposta imune na categorização proposta pelo *Gene Ontology*.

Assim, destacam-se:

- ✓ Proteínas semelhantes a fosducinas, proteínas que atuam na ativação de citocinas por meio da transdução de sinais para as proteínas G, que por sua vez ativam as moléculas da resposta imune (LUKOV et al., 2004);
- ✓ Swiprosina, uma nova proteína que discrimina entre antígenos CD8, CD4 e CD19, envolvida em funções importantes para os linfócitos citotóxicos (VUADENS et al., 2004);
- ✓ Interferon-gama, citocina secretada pelas células T e NK resultando na ativação de macrófagos e regulação da resposta imune mediada por células, potencializando a resposta T_H1 e inibindo a T_H2 (COLTMAN et al., 2001);
- ✓ Catepsina S, uma cisteína protease altamente expressa em células apresentadoras de antígenos, desempenhando papel na apresentação de antígenos restritos à classe II do MHC (LIU; SPERO, 2004);

- ✓ Tensinas, proteínas que atuam na regulação do desenvolvimento das células T no timo, cuja produção excessiva contribui ao desenvolvimento de linfomas (HAGENBEEK et al., 2004);
- ✓ Antígenos CD8+ que promovem a proliferação das células T (JANEWAY et al., 2002);
- ✓ Proteína Mac-2 cuja função é bloquear o reconhecimento de imunoglobulinas pelos receptores de Fc (região constante) e degradá-las, além de aumentar a sobrevivência dos patógenos por inibir os processos de fagocitose e endocitose de proteínas opsonizadas por IgG (AGNISWAMY et al., 2004);
- ✓ Peroxiredoxina, além de sua atividade antioxidante, vem atuando na diferenciação, proliferação e como ativador de células NK, que por sua vez atuam na proliferação e diferenciação de linfócitos (ZHANG et al., 2004);
- ✓ Proteína PLSCR1, pertencente à membrana plasmática, induzida por IFN-γ, (DONG et al., 2004);
- ✓ Lectinas, proteassomas, receptor de IL-2, peptídeos pertencentes ao MHC classe I e II, componentes do complemento C1q, já descritos na bilioteca ER1.

4.6.2 *Northern* digital

Para as análises comparativas, as ESTs foram agrupadas em *clusters* e aqueles relacionados à resposta imune foram analisados quanto à sua distribuição nas duas bibliotecas. O número de ESTs em cada biblioteca e a probabilidade de significância podem ser visualizadas na Tabela 8 e Anexo A.

Tabela 8– Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Antígeno de tumor CTCL	3	0	0,1
Fator Trefoil 2	3	0	0,1
MHC classe II- DR-ALPHA	2	0	0,3
Família transportador	2	0	0,3
Lipoproteína de superfície	2	0	0,3

Tabela 8– Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continuação)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Proteína quimiotática aceptora de grupo metil	2	0	0,3
Subunidade beta da ATPase H+/K+ gástrica	2	0	0,3
Serina/treonina kinase 11	2	0	0,3
Proquimiosina	2	0	0,3
Transgelina	2	0	0,3
Fator de transcrição associado a HLA-B	2	0	0,3
Antígeno de classe I do MHC	2	0	0,3
IL-5	2	0	0,3
Proteína histidina kinase	2	0	0,3
IgM	2	0	0,3
Precursor do MHC classe II DRB3	2	0	0,3
ATPase H+/K+ gástrica subunidade beta	2	0	0,3
MCP-1	2	0	0,3
IL-4	2	0	0,3
Receptor de IL-4	2	0	0,3
Mucina 5	2	0	0,3
IL-10	2	0	0,3
IL-9	2	0	0,3
Antígeno do MHC classe I	4	1	0,2
Fosfoglicerato kinase	3	1	0,3
Ubiquinona/Menaquinona	3	1	0,3
Mucina gástrica 6	2	1	0,6
Regulador transcricional	2	1	0,6
Lisozima 2d	2	1	0,6
Proteína HSPC023	2	1	0,6
glicoproteína de membrana	2	1	0,6
Supresor de glioma	1	1	1,0
Precursor de trefoil fator 3	1	1	1,0
Proteína 4 associada a imunidade	1	1	1,0
Calreticulina	1	1	1,0
Lectina	1	1	1,0
Cadeia pesada de IgA	1	1	1,0
Similar a poliubiquitina	1	1	1,0
Diubiquitina	1	1	1,0
Complemento C1q	1	1	1,0
Peptídeo transportador de antígeno	1	1	1,0
Proteína dilocil-difosfooligosacarídeo	1	1	1,0
Antígeno específico a transplantação de tumor P198	1	1	1,0
Hidrolase amido ácido graxo	1	1	1,0
Poliubiquitina	1	1	1,0
Acil CoA desidrogenase	1	1	1,0
Cadeia pesada de Ig alpha	1	1	1.0
Receptor de IL-13	0	2	0,4
Receptor de interferon alpha	0	2	0,4
IL-12	0	2	0,4

Tabela 8– Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(conclusão)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Receptor de IL-12	0	2	0,4
Receptor de interferon beta	0	2	0,4
Interferon gamma	0	2	0,4
Mucina 1	0	2	0,4
HLA-G, classe I	2	2	1,0
Proteína ITLN2	2	2	1,0
Precursor do trefoil fator 1	1	2	0,8
Transferase O-linked-GlcNAc isoforma 2	0	2	0,4
Proteína transdutora de sinal associada a tumor	0	2	0,4
Similar a subunidade 26S do poteassoma	0	2	0,4
Antígeno do MHC classe I	0	2	0,4
Proteína TLN	0	2	0,4
Calreticulina	0	2	0,4
Progastricsina	0	2	0,4
Provável proteína de adesão periplasmática	0	2	0,4
Microglobulina beta2	3	3	1,0
Inibidor de serina protease	1	3	0,5
Fator secretor da cadeia pesada de IgM	0	3	0,2
Antígeno do MHC- BOLA de classe I	0	3	0,2
Poliubiquitina	0	3	0,2
Cadeia pesada MHc classe I	0	3	0,2
Cadeia leve de Ig lambda	3	4	0,9
Precursor de lisozima C-1	24	12	0,01
Receptor de imunoglobulina polimérica	7	13	0,4
Pepsinogênio A	7	21	0,02
Lisozima	81	47	0,01

Os genes diferencialmente expressos, confirmados estatisticamente, foram a lisozima ($P<0,01$) e seu precursor ($P<0,01$) e o pepsinogênio A ($P<0,02$).

Lisozima e pepsinogênio foram submetidos à análises de expressão gênica no abomaso utlizando a metodologia de PCR em tempo real, para confirmar a expressão diferencial entre animais resistentes e susceptíveis sugeridos pelas análises das ESTs geradas: lisozima foi 2,3 vezes mais expressa nos animais resistentes ($P<0,042$) e pepsinogênio 5,9 vezes mais expresso nos animais susceptíveis ($P<0,025$) (Figura 17).

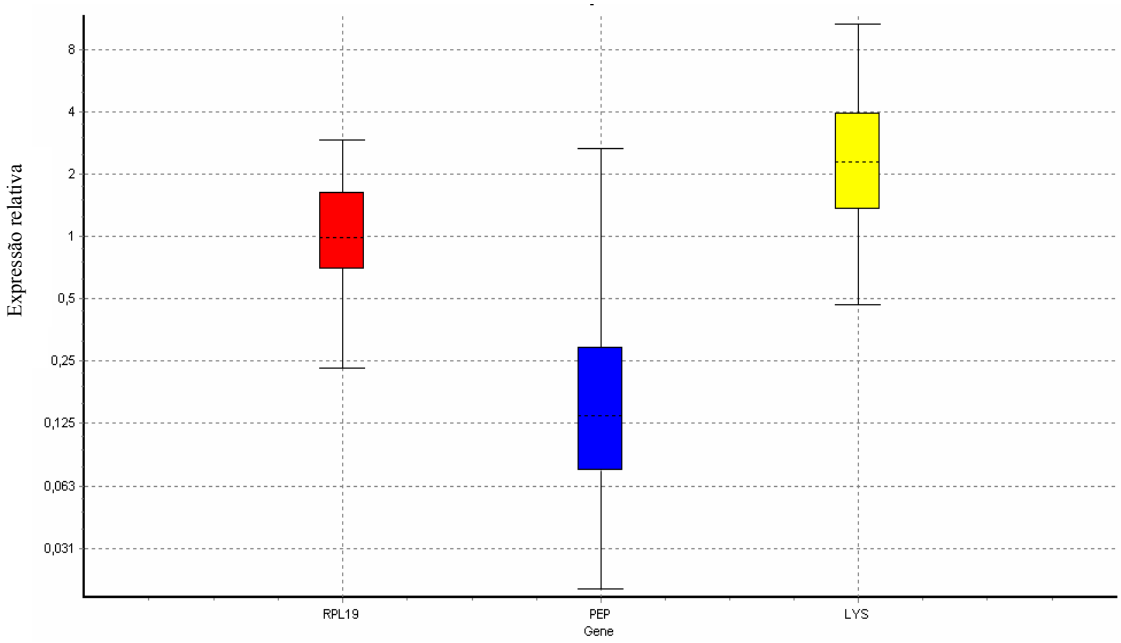

Figura 17 – Razão da expressão gênica no abomaso para o gene controle RPL-19, para pepsinogênio (PEP) e lisozima (LIS), entre os grupos resistente e susceptível (R/S). As caixas representam 50% das observações expressas como *n*-diferenças entre os grupos (R/S) em relação ao gene controle. As linhas pontilhadas representam a expressão gênica média. As extremidades de cada caixa representam as observações mínimas e máximas

Lisozimas são beta-N-acetil-muramil hidrolases cuja função é romper a mureína de bactérias. Ruminantes têm múltiplos genes para lisozima, e pelo menos quatro codificam para lisozima gástrica, que funciona como enzima digestiva com atividade antimicrobiana (DOMINGUÉZ-BELLO et al., 2004).

Lisozima e seu precursor foram encontrados em altas frequências em ambas bibliotecas. Isso ocorre pelo fato do abomaso ser o local de quebra e digestão de células microbianas oriundas do material do omaso e rúmem (HANSEN et al., 2004). Entretanto, os animais pertencentes ao grupo ER1 apresentaram duas vezes mais lisozima que os animais ES1, fato não descrito anteriormente na literatura. Secreções ácidas e de pepsinogênio acompanham a produção de lisozimas no abomaso. Além disso, altos níveis de pepsinogênio plasmático podem ser associados com alto grau de infestação larval da mucosa gástrica (SUAREZ; BUZETTI; LORENZO, 1995).

Ao comparar as sequências das bibliotecas ER1 e ES1, constatou-se maior expressão de pepsinogênio nos animais susceptíveis (21 clones) do que nos resistentes (7 clones) ($P<0,02$). Infecções por *Haemonchus* spp. em ruminantes resultam em elevadas concentrações plasmáticas de pepsinogênio. Os mecanismos que envolvem a hiperpepsinogenia são ainda desconhecidos,

mas há duas teorias a respeito: (1) Aumento da permeabilidade vascular e epitelial permitindo ao pepsinogênio extravasar para o sangue; (2) Direta secreção de pepsinogênio a partir de zimogêneo (secretores de pepsinogênio). Ovinos infectados apresentam hiperplasia das células mucosa, associada ao aumento do número de células produtoras de pepsinogênio; mudanças na população de células abomasais que afetam a habilidade de secreção deste órgão também são observadas (SCOTT et al., 1999).

Pepsinogênio foi verificado ser produzido em três tipos de células do abomaso de bovinos infectados por *O. ostertagi:* células mucosas da superfície, células mucosas intermediárias e células *chief* (SCOTT et al., 1999). Neste mesmo trabalho foi constatado que os nódulos parasitados continham maiores níveis de pepsinogênio que os nódulos adjacentes, resultando em grande quantidade de pepsinogênio no abomaso.

Dos genes analisados, cuja expressão diferencial não foi significativa, alguns foram encontrados somente na biblioteca ER1, tais como antígeno de tumor (CTCL), precursor do MHC classe II DRB3, IgM. Outros apareceram nas duas bibliotecas, porém com maior freqüência na ER1, como por exemplo, lisozima 2d, antígeno do MHC classe I, ubiquinona, mucina gástrica 6. Foi também detectada igual freqüência nas duas bibliotecas para precursor do trefoil fator 3, proteína 4 associada a imunidade, calreticulina, lectina, cadeia pesada de IgA, poliubiquitina, diubiquitina, complemento C1q, cadeia pesada de Ig alpha, proteína ITLN2, dentre outros.

Dentre os produtos encontrados somente na biblioteca ES1 destacam-se, subunidade 26S do poteassoma, antígeno do MHC classe I, proteína TLN, fator secretor da cadeia pesada de IgM, antígeno do MHC-BOLA de classe I, cadeia pesada MHC classe I e poliubiquitina. Alguns cDNAs apareceram nas duas bibliotecas, porém com maior freqüência na ES1, como por exemplo, cadeia leve de Ig lambda, precursor de fator trefoil 1, receptor de imunoglobulina polimérica. Foi também detectada igual freqüência nas duas bibliotecas para microglobulina beta 2, fator secretor de cadeia pesada de IgM, antígeno do MHC- BOLA de classe I, poliubiquitin, cadeia pesada MHC classe I, dentre outros.

Assim, devido ao fato do intestino ser continuamente exposto a antígenos, ele constitui uma parte do sistema imune da mucosa. Neste local há diversos transcritos relacionados à resposta imune, dentre eles, componentes do MHC de classe I e II, que constituem um conjunto de moléculas localizadas na superfície celular, que reconhecem linfócitos e apresentam antígenos (HANSEN et al. 2004). Moléculas da classe I coletam peptídeos do citossol e são reconhecidas

por células T citotóxicas e moléculas da classe II coletam peptídeos de vesículas celulares (células B) e são reconhecidas pelas células T_H1 e T_H2 (JANEWAY et al., 2002).

Neste trabalho as moléculas de classe II tiveram maior expressão nos animais ER1 em relação aos animais ES1 (P<0,3). Este fato é consistente com as diferenças entre animais resistentes e susceptíveis em suas habilidades de montar uma resposta imune humoral no início da infecção (DIEZ-TASCÓN et al., 2005). Dainichi et al. (2001) relataram que em camundongos infectados por *N. brasiliensis* houve diminuição da expressão de moléculas do MHC de classe II, como um mecanismo de evasão do parasita. Além disso, um aumento da expressão de tais moléculas em animais resistentes pode somente ser efetivo na redução dos parasitas se combinado com um conjunto de alelos do MHC, eficientes em apresentar antígenos parasitários (DIEZ-TASCÓN et al., 2005).

Um outro transcrito encontrado na biblioteca ER1 foi o fator trefoil 2 (TFF). TFF são peptídeos secretados pelo epitélio mucoso, tendo importante papel na defesa de mucosa através de mecanismos protetivos e reparativos. Fatores trefoil são induzidos por danos epiteliais e facilitam a restituição e reparo por estimular a migração celular e inibir a apoptose. São regulados por citocinas pró e anti-inflamatórias, e têm sido verificado participar da resposta imune da mucosa por estimular a migração de imunócitos (BAUS-LONCAR et al., 2005).

Neste trabalho, os animais do grupo ER1 apresentaram maiores níveis de fator trefoil 2 em relação aos do grupo ES1 (P<0,10), sugerindo função na resposta imune. Baus-Loncar et al. (2005) asssociaram a deficiência de TFF2 com um aumento (2 vezes) na secreção ácida gástrica e grande susceptibilidade aos danos gástricos.

Um outro transcrito encontrado somente na biblioteca ER1 (P<0,30) foi a transgelina (TAGLN), uma proteína do citoesqueleto também conhecido como SM22 alpha, WS3-10 e p27, expressa abundantemente nas células musculares lisas das vísceras e dos vasos sanguíneos. TAGLN se liga diretamente aos filamentos de actina e seu possível papel está na organização da relação espacial desses filamentos nas células musculares lisas. Diez-Tascón et al. (2005) sugeriram que o aumento da expressão desse gene pode estar relacionado ao aumento da mobilidade entérica em cordeiros geneticamente resistentes a nematódeos gastrintestinais. Este fato pode estar relacionado com a elasticidade da camada muscular lisa, associada ao aumento da contração do músculo intestinal. Infecções em ruminantes sugerem diferenças na velocidade em que os hospedeiros expelem os parasitas. Em camundongos infectados por *T. spirallis*, a alta densidade da camada muscular lisa, devido a hipertrofia e hiperplasia, tem sido associado com o

aumento da contração do músculo intestinal para facilitar a expulsão dos parasitas (COLLINS, 1996).

Além desses genes, a análise das bibliotecas permitiu a identificação de citocinas T_H1 e T_H2, que são importantes moduladores da resposta imune.

Na biblioteca ES1 foram encontradas IL-12 e seu receptor, IFN-γ, receptor de IFN-α e IFN-β, característicos da resposta T_H1. Em relação às citocinas T_H2, destaca-se o receptor de IL-13. Na biblioteca ER1, foram encontradas citocinas T_H2, tais como, IL-4 e seu receptor, IL-10, IL-9 e IL-5 e MCP-1, relacionada à resposta T_H1. Esses resultados confirmam a dicotomia T_H1/T_H2 da resposta imune de bovinos da raça Nelore à infecções por nematódeos gastrintestinais, caracterizada por uma forte resposta tipo T_H2 nos animais resistentes, embora detectada a presença de uma única citocina tipo T_H1. Entretanto, esses resultados são apenas qualitativos, e devem ser confirmados por metodologias quantitativas.

4.7 Análise de polimorfismo

As análises de clusterização das sequências das extremidades 5'e 3'permitiram a geração de 1628 *contigs*, os quais foram analisados e os polimorfismos relacionados a genes de resposta imune, tais como imunoglobulinas (IgE) e moléculas de classe I e II do MHC podem ser visualizadas na Figura 18.

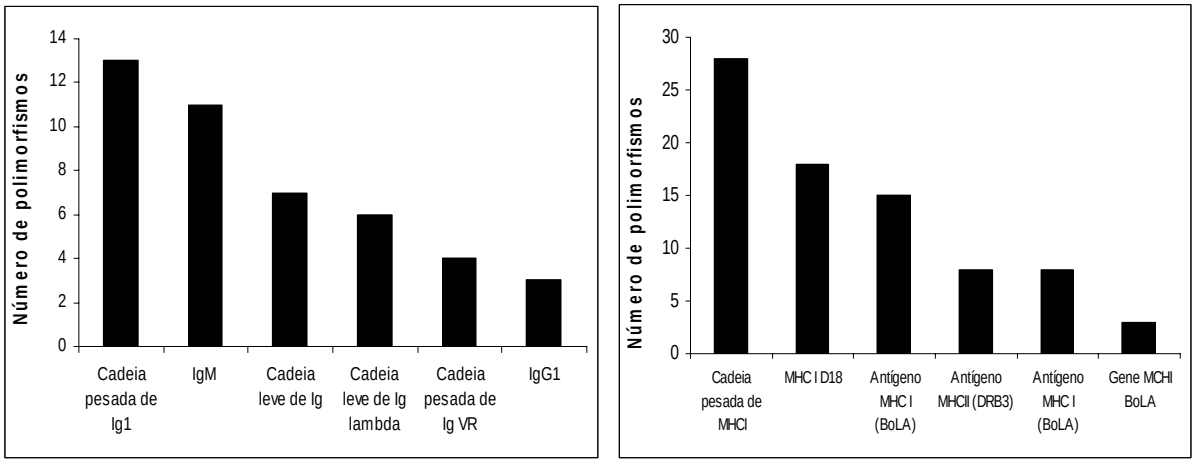

Figura 18 - Análise de polimorfismos para imunoglobulinas e moléculas de classe I e II do MHC entre *Bos indicus* e *Bos taurus*

Como pode ser verificado neste trabalho, as imunoglobulinas e moléculas do MHC são altamente polimórficas entre as espécies. Há um grande número de alelos no locus do MHC e estes diferem em múltiplos nucleotídeos. Esta variação contribui para as diferenças indivíduais no tipo de resposta e na resistência à doenças (STEAR; INNOCENT; BUITKAMP, 2005). A diversidade no MHC é provavelmente mantida por equilíbrio de seleção, embora não haja um consenso dos mecanismos envolvidos.

Além dos genes acima citados, as citocinas e mucinas também apresentaram polimorfismos entre as espécies: IL-8, MCP-2 e IL-13 apresentaram elevada frequência de mutações, ao contrário de IL-2, que não revelou diferenças entre as espécies estudadas. Outras citocinas também foram analisadas e os polimorfismos identificados podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Polimorfismos de citocinas e mucinas

(continua)

Biblioteca	Gene	Posição (pb)	Polimorfismo (*taurus:indicus*)
ER1	IL-4	110	C:T
		254	A:C
		255	C:T
		257	A:T
	Mucina 1	601	* :T
		655	A:C
		700	G:A
		624	C:T
ES1	IL-12p35	367	* :G
	TNF-α	390	A:G
		388	T:C
		386	G:A
	MCP-1	180	A:G
		193	* :T
		230	* :T
		253	* :T
		279	* :T

Tabela 9 – Polimorfismos de citocinas e mucinas

(conclusão)

Biblioteca	Gene	Posição (pb)	Polimorfismo (*taurus:indicus*)
ES1	MCP-1	340	T:G

Nota: *deleção

De acordo com a Tabela 9, IL-4 e mucina encontradas na biblioteca ER1 de *Bos indicus* apresentaram 5 mutações comparadas às sequências de *Bos taurus*. Por outro lado, IL-12p35, TNF-α e MCP-1 encontradas na biblioteca ES1 apresentaram 1, 4 e 5 mutações, respectivamente. Estes polimorfismos podem estar associados às características de resistência e susceptibilidade apresentadas pelos animais da raça *Bos indicus* selecionados neste estudo. Todavia, estudos mais detalhados devem ser realizados para a confirmação destes polimorfismos na raça Nelore.

Neste estudo somente os polimorfismos encontrados em imunoglobulinas, moléculas do MHC e citocinas foram descritos. Estudos mais aprofundados acerca de grupos divergentes (resistentes e susceptíveis) devem ser realizados para que estas observações sejam confirmadas.

4.8 Análise da expressão gênica

Para realizar a quantificação da expressão de RNAm relacionados à resposta imune e validar as observações das bibliotecas através de metodologias quantitativas, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Os genes quantificados foram: IL-2, IL-4, IL-8, IL-12p35, IL-13, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, MCP-2 e a glicoproteína mucina (MUC-1). Para a confirmação dos resultados das bibliotecas de ESTs, pepsinogênio (PEP) e lisozima (LIS) foram quantificados somente para o tecido do abomaso.

4.8.1 Extração de RNA total

Para a extração do RNA total foram utilizadas amostras dos tecidos do abomaso, nódulos linfáticos abomasais e intestino delgado de 7 animais do grupo resistente e 8 do grupo susceptível. A extração foi realizada individualmente e o RNA total pode ser visualizado na Figura 19.

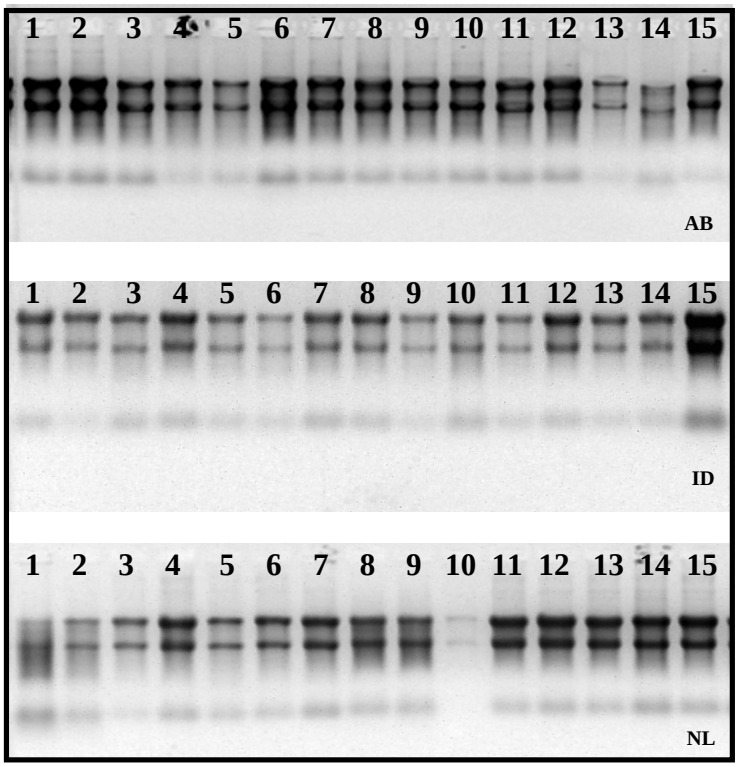

Figura 19 – Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S, 18S e 5S). Amostras de 1 a 7 são dos animais pertencentes ao grupo resistente, e de 8 a 15, dos animais susceptíveis extraídas dos tecidos do abomaso (AB), intestino delgado (ID) nódulos linfáticos abomasais (NL)

A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a integridade das amostras de RNA total, avaliada pelas bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S). As amostras que não estavam íntegras, como por exemplo a amostra 1 de NL, foram reextraídas.

Após a verificação da integridade do RNA total e quantificação em espectrofotômetro, procedeu-se a síntese de cDNA empregado nas análises de expressão gênica.

4.8.2 PCR em tempo real

O cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras de tecidos foi empregado nas reações de PCR em tempo real com o objetivo de estabelecer as condições de amplificação para cada um dos genes estudados, citadas a seguir:

a) Especificidade dos *primers*

As condições de RT-PCR utilizadas resultaram em produtos de tamanho esperado e amplificação de uma única banda para todos os genes, como pode ser visualizado na Figura 20.

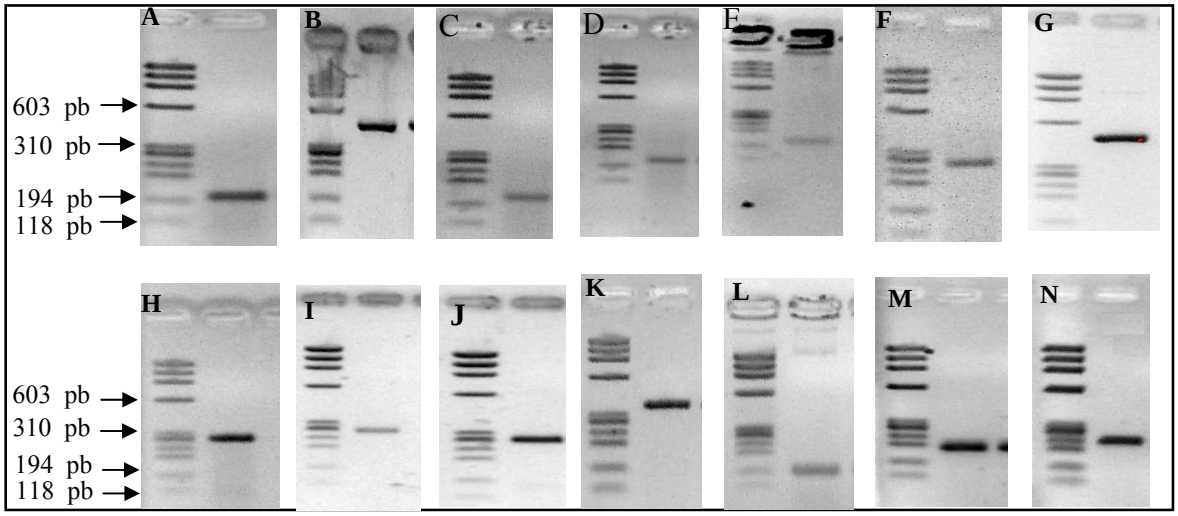

Figura 20– Verificação dos produtos de RT-PCR esperados. A primeira canaleta refere-se ao padrão molecular Phi-X174 *Hae*III. As letras referem-se à: A:IL-2, B:IL-4, C:IL-8, D:IL-12-p35, E:IL-13, F:TNF-α, G:IFN-γ, H: MCP-1α, I:MCP-2, J: MUC-1, K:RPL-19, L: GAPDH, M: PEP, N: LIS

A especificidade foi confirmada por seqüenciamento, resultando em seqüências específicas. Também foi confirmada pela análise da curva de *melting*, realizada de 70ºC a 95ºC a 0,1ºC/s para todos os genes estudados. Uma representação da análise da curva de *melting* para o gene MCP-1 é apresentada na Figura 21.

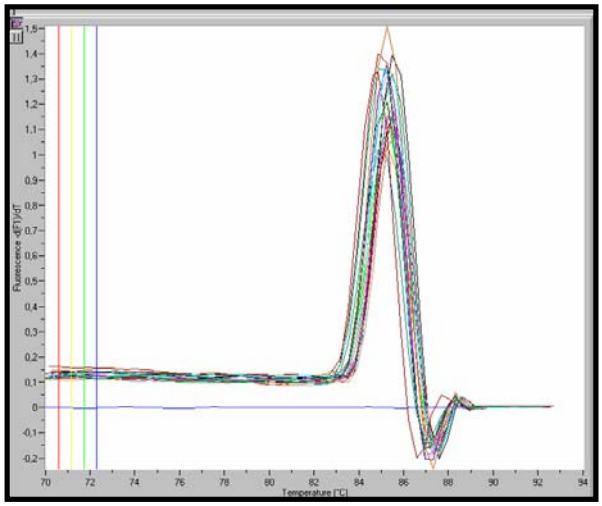

Figura 21 – Curva de *melting* para o gene MCP-1. Eixo Y representa a primeira derivada negativa da fluorescência durante cada ciclo (-[dF/dT]) e o eixo X, a temperatura de *melting*. Cada linha respresenta uma amostra cuja expressão foi quantificada

A temperatura de *melting* foi definida como sendo o pico da curva, o ponto mais alto como platô, e assim, o ponto central foi identificado como T_M. A temperatura de *melting* para todos os genes é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10– Temperatura de *melting*

Gene	Temperatura de *melting* (ºC)
IL-2	82,5
IL-4	86,0
IL-8	82,0
IL-12p35	82,5
IL-13	87,0
TNF-α	88,5
IFN-γ	85,0
MCP-1	85,0
MCP-2	87,0
MUC-1	87,0
RPL19	87,5
GAPDH	86,0
PEP	88,7
LIS	85,0

A análise da curva de *melting* é um método preciso e rápido para verificar a especificidade dos produtos de PCR. Todavia, em alguns casos, produtos de diferentes comprimentos podem ter a mesma temperatura de *melting*, sendo indistinguíveis por essa análise. Desse modo, sugere-se a utilização de outros métodos que também confirmem a especificidade dos produtos de PCR (WILKENING; BADER, 2004).

b) Eficiência de amplificação

Os resultados de eficiência de amplificação foram analisados como descrito anteriormente. Os detalhes estão sumarizados nas Figuras 22 e 23. Os valores de eficiência podem

ser visualizados na parte inferior direita de cada gráfico, podendo-se constatar uma relação linear entre concentração de cDNA das amostras utilizadas e os valores de Ct.

Análises de regressão revelaram valores acima de 0,96 para o coeficiente de determinação (R^2). Desse modo, pôde-se verificar a eficiência de amplificação para cada *primer*, que foi utilizada nos cálculos de expressão relativa. Tais eficiências variaram de 1,85 para o gene IL-2 a 2,18 para o TNFα.

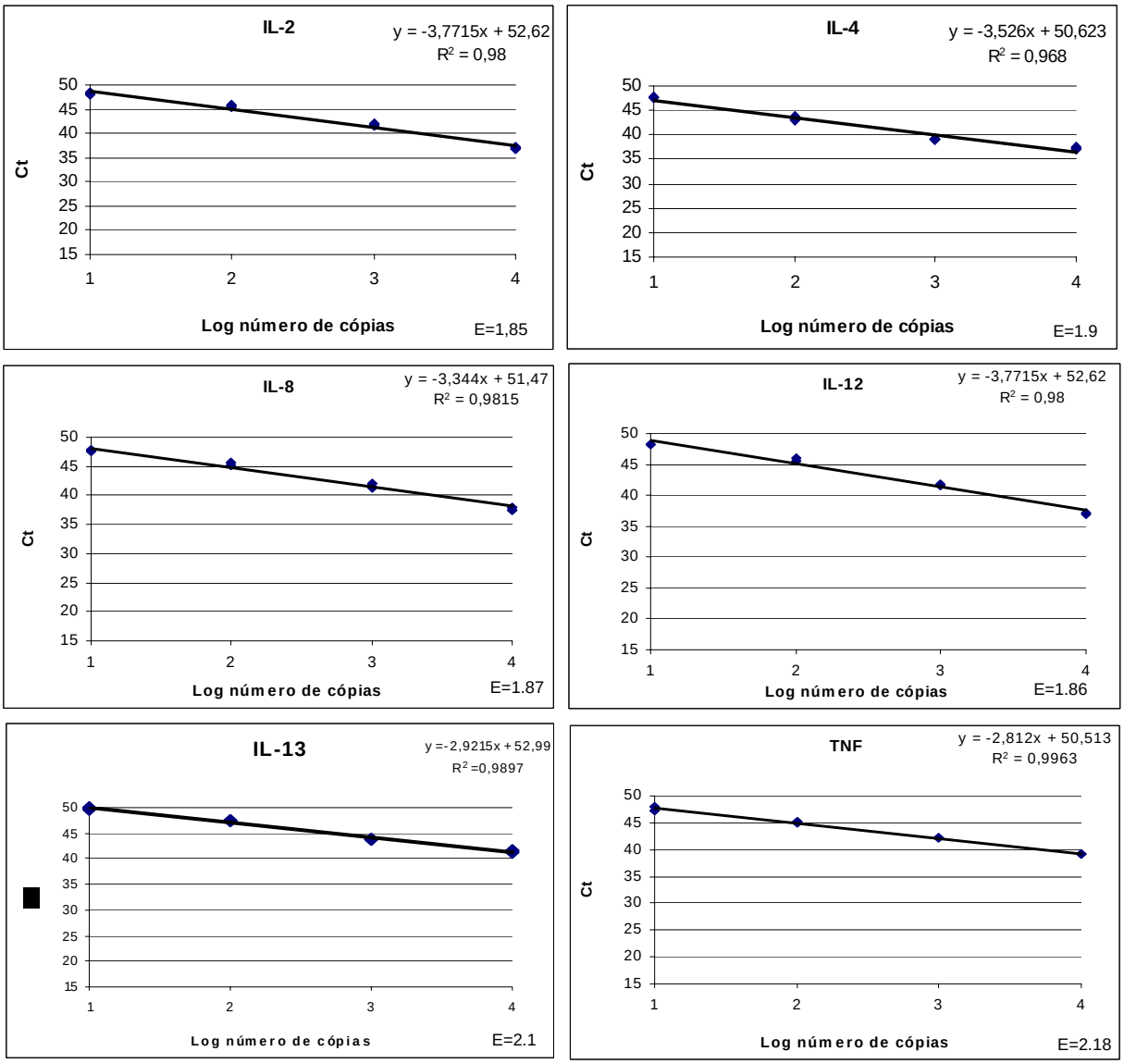

Figura 22 – Curvas de diluição geradas do PCR em tempo real para IL-2, IL-4, IL-8, IL-12, IL-13 e TNF-α. Os resultados das análises de regressão (equações e valores de R^2) e a eficiência de amplificação são mostrados à direita do gráfico

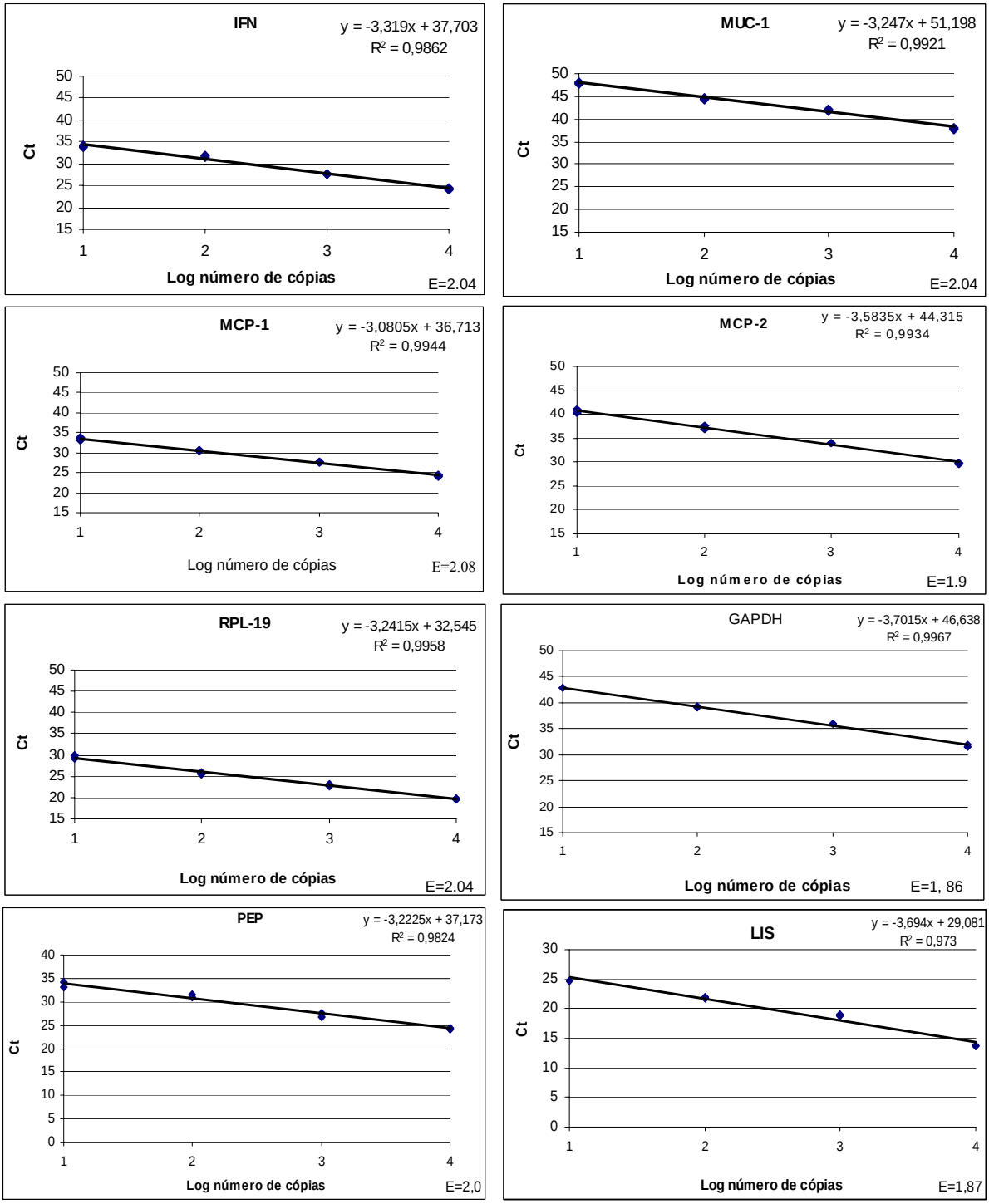

Figura 23 – Curvas de diluição geradas do PCR em tempo real para IFN-γ, MUC-1, MCP-1, MCP-2, RPL19,GAPDH, PEP e LIS. Os resultados das análises de regressão (equação e valores de R^2) e a eficiência de amplificação são mostrados à direita do gráfico

c) Escolha do gene controle

A obtenção de resultados confiáveis utilizando a metodologia de PCR em tempo real requer correção para variações experimentais. A quantificação de um gene controle ou referência permite a normalização de diferenças na quantidade de RNA ou cDNA em amostras individuais geradas por: (1) diferenças na quantidade e qualidade do material inicial, (2) diferenças no preparo do RNA e síntese de cDNA (AL-BADER; AL-SARRAF, 2005). Diferenças na transcrição reversa podem resultar em quantidades de cDNA que não correspondem à quantidade de RNA inicial.

A normalização para um gene controle é o método mais aceitável para corrigir estas variações (GIULIETTI et al., 2001; BUSTIN et al., 2005). O gene ideal deve ter sua expressão constante entre diferentes tecidos e sob diferentes tratamentos. Nesse estudo foram testados 2 genes, RPL-19 e GAPDH, para verificar suas qualidades como controle nos dois grupos de animais: resistente (R) e susceptível (S) (Figura 24).

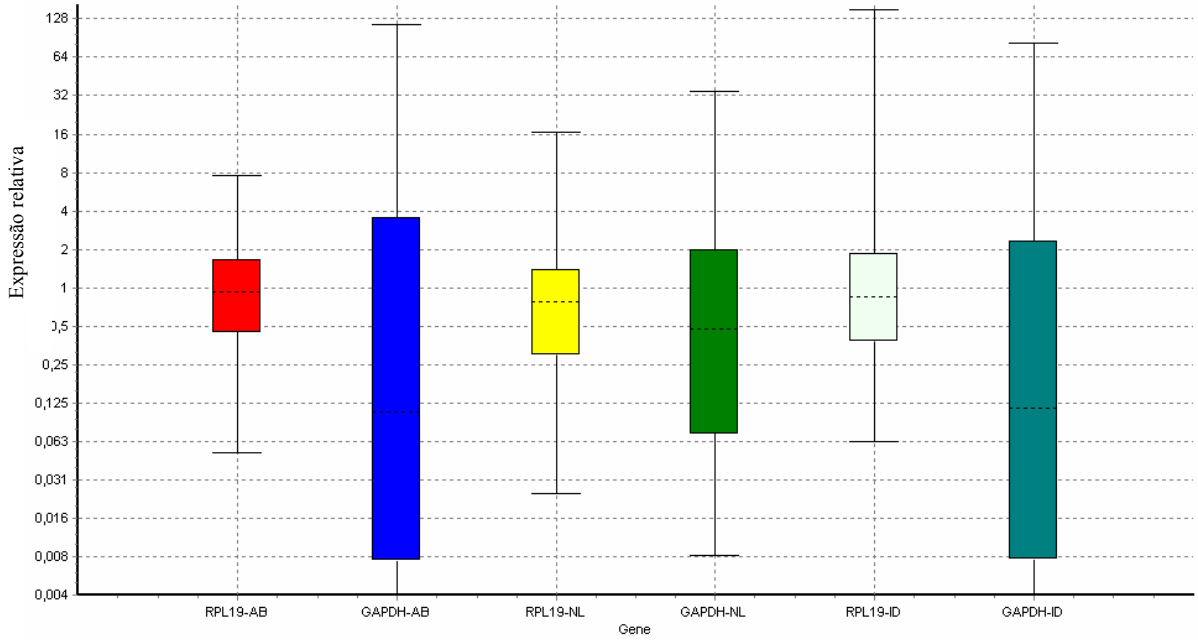

Figura 24 – Razão da expressão gênica no abomaso (AB), nódulos linfáticos abomasais (NL) e intestino delgado (ID) para os genes controle RPL-19 e GAPDH, entre os grupos resistente e susceptível (R/S). As caixas representam 50% das observações expressas como *n*-diferenças entre os grupos (R/S) em relação ao gene controle. As linhas pontilhadas representam a expressão gênica média. As extremidades de cada caixa representam as observações mínimas e máximas

Pode-se notar que, para todos os tecidos, o gene GAPDH apresentou maiores variações entre os grupos e maiores limites máximos e mínimos. RPL-19 foi escolhido por apresentar menores variações. Além disso, um gene controle ideal deve iniciar sua amplificação no início da PCR, como o RPL-19 (ciclos de amplificação começando em 22 ciclos no abomaso, 19 no intestino delgado e 16 nos nódulos linfáticos). Em contraste, GAPDH iniciou sua amplificação por volta dos ciclos 32 e 35 no abomaso, 29 e 32 no intestino delgado e 27 e 28 nos nódulos linfáticos.

GAPDH, albuminas, actinas, tubulins, rRNA 18S e 28S vêm sendo extensivamente utilizados como genes controle. Entretanto, diversos estudos mostram que estes genes podem variar sob diferentes circunstâncias experimentais (AL-BADER; AL-SARRAF, 2005). GAPDH é amplamente usado (GIULIETTI et al., 2001; BUSTIN, 2002; BUSTIN et al., 2005), mas contínuos relatos enfatizam problemas associados com seu uso (KE; CHEN; YUNG, 2000; SUZUKI; HIGGENS; CROWFORD, 2000).

Al-Bader e Al-Sarraf (2005) usaram a metodologia RT-PCR para quantificar os níveis de RNAm de diversos genes a fim de identificar quais os mais apropriados, e concluíram que GAPDH não é o mais indicado para esta função, ao contrário de RNAr 18S, RPL19, BGLU, CY e HH4 que tiveram expressão constante independente do tratamento. Ontsouka et al. (2004) testaram quatro genes (GAPDH, RNAr 18S, beta-actina e RPL-19) nas frações intestinais, obtendo resultados de pouca variação entre tratamentos para tais genes. RPL-19, uma proteína ribossomal, foi escolhida para ser usada como gene controle neste trabalho.

4.8.3 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro

Após a realização dos experimentos de RT-PCR em tempo real, obtenção dos Cts e análise através do programa REST© (PFAFFL; HORGAN; DEMPLE, 2002), foram construídos os gráficos referentes à razão da expressão dos animais resistentes (R) em relação aos susceptíveis (S) para todos os tecidos (Figuras 25, 26 e 27).

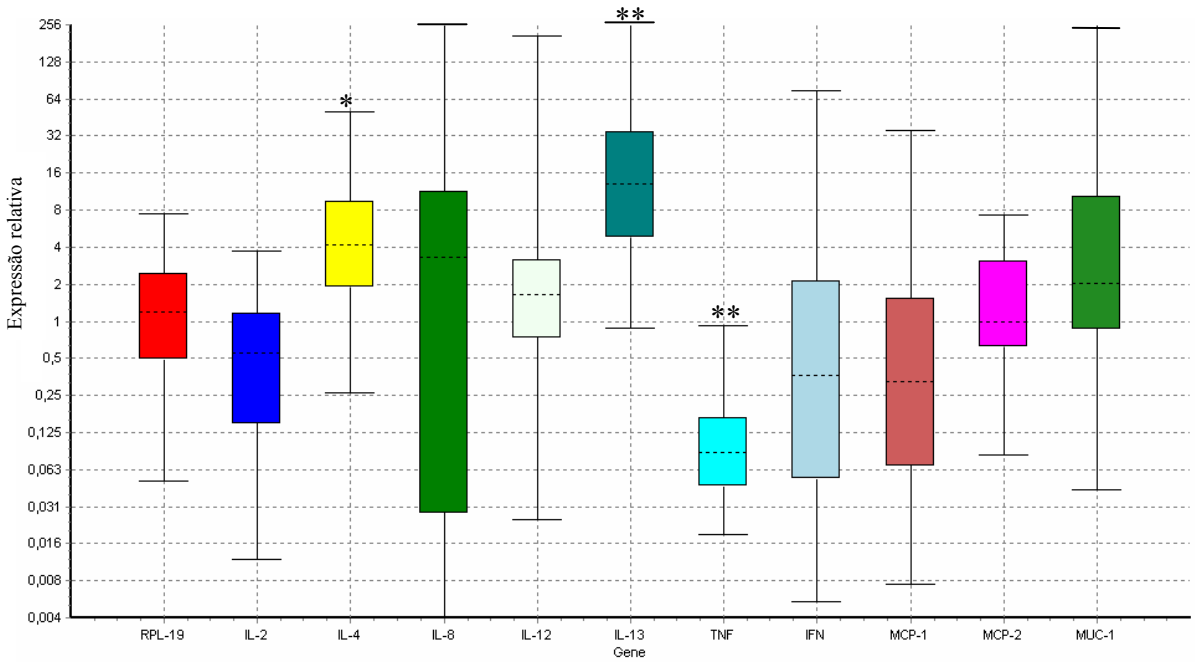

Figura 25 – Razão da expressão gênica no abomaso entre os grupos resistente e susceptíve (R/S), normalizado para o gene controle (RPL-19). As caixas representam 50% das observações expressas como *n*-diferenças entre os grupos (R/S) em relação ao gene controle. As linhas pontilhadas representam a expressão gênica média. As extremidades de cada caixa representam as observações mínimas e máximas. Nota: *P<0,05 **P<0,01

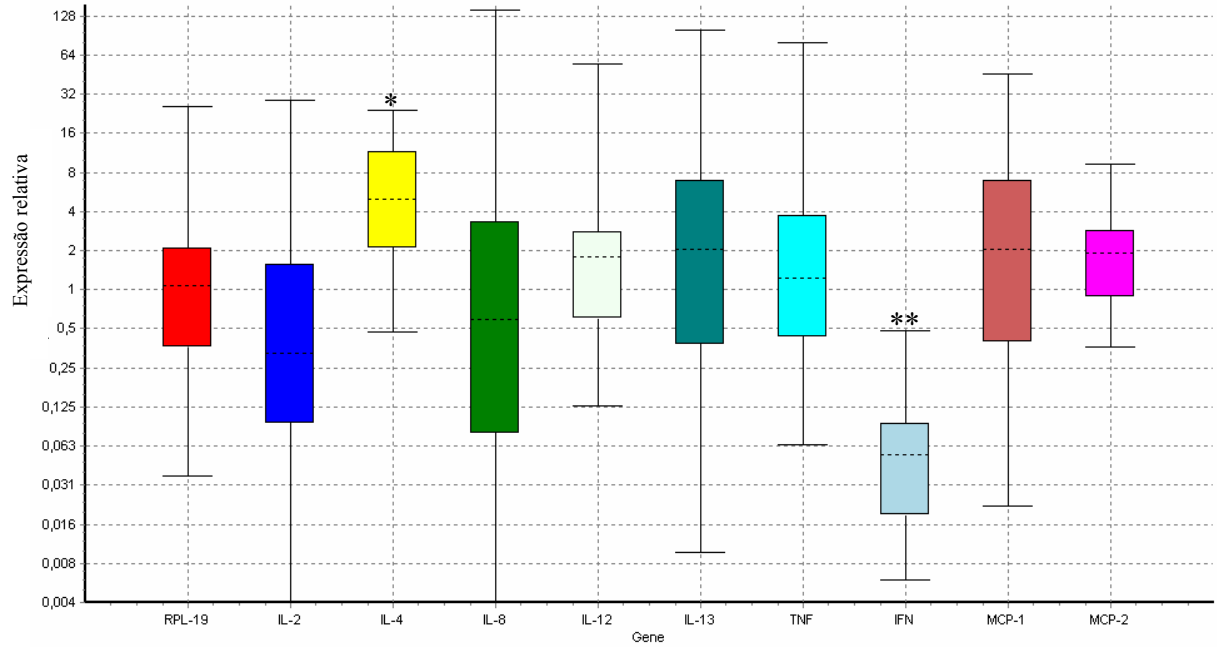

Figura 26 – Razão da expressão gênica nos nódulos linfáticos abomasais entre os grupos resistente e susceptível (R/S), normalizado para o gene controle (RPL-19). As caixas representam 50% das observações expressas como *n*-diferenças entre os grupos (R/S) em relação ao gene controle. As linhas pontilhadas repreentam a expressão gênica média. As extremidades de cada caixa representam as observações mínimas e máximas. Nota: *P<0,05 **P<0,01

De acordo com os gráficos acima, pode-se verificar que há diferença na expressão gênica entre tratamentos, ou seja, entre os animais resistentes e susceptíveis nos tecidos do abomaso e nódulos linfáticos abomasais.

Em relação ao tecido do abomaso, sabe-se que o parasita do gênero *Haemonchus* se aloja neste órgão, podendo-se inferir que a resposta neste local é provavelmente devido à infecção por este nematódeo. Além disso, as análises de coprocultura (Figura 4) e as análises de recuperação e contagem da carga parasitária (Tabela 7) confirmaram a presença de *Haemonchus* no abomaso dos animais estudados.

De acordo com as análises de expressão gênica realizadas na mucosa do abomaso, pôde-se verificar aumento nos níveis de expressão de IL-4 ($P<0,018$), IL-13 ($P<0,002$), e TNF-α ($P<0,0001$): IL-4 e IL-13 apresentaram maior expressão no grupo resistente, e TNF-α foi maior nos animais susceptíveis. Já nos nódulos linfáticos abomasais foi detectado aumento dos níveis de expressão de IL-4 ($P<0,019$) e IFN-γ ($P<0,007$): IL-4 apresentou maior expressão nos animais resistentes e IFN-γ nos susceptíveis.

IL-4 e IL-13 são citocinas indutoras da resposta imune T_H2, auxiliando na expulsão dos nematódeos, contribuindo para a eliminação do organismo hospedeiro; em contraste, IFN-γ é uma citocina pertencente à resposta T_H1, que tem como função inibir a produção de IL-4, e consequentemente, das células T_H2 (DESCHOOLMEESTER et al., 2003); e TNF-α, importante em estimular a resposta T_H2 da mucosa durante a infecção por helmintos, também produzida por células T_H1, mas com raros efeitos inibidores da proliferação das células T_H2 (ARTIS et al., 1999).

Analisando os resultados de expressão gênica na mucosa do abomaso, nota-se que a resposta foi T_H2 polarizada nos animais resistentes, devido ao aumento de IL-4 (3,9x) e IL-13 (13,5x), embora diminuição de TNF-α (10,5x).

Claerebout et al. (2005) estudando bovinos infectados por *O. ostertagi*, um outro nematódeo característico do abomaso de ruminantes, verificaram aumento de IL-4 e nenhuma alteração da expressão de IL-13 na mucosa do abomaso. Artis et al. (1999) mostraram que em camundongos naturalmente resistentes, o bloqueio de TNF-α preveniu a expulsão dos parasitas até 21 dias após a infecção, sem entretanto, alterar a magnitude da resposta T_H2, mantendo os níveis de IL-4 e IL-13. Esse perfil de expressão pode ser atribuído ao comportamento de tais genes no tecido do abomaso. Vale ressaltar que, nos animais submetidos a *knockout* para o

receptor do TNF-α, a infecção tornou-se crônica com a geração de uma resposta T_H1 (ARTIS et al., 1999).

Nos nódulos linfáticos abomasais a resposta foi T_H2 polarizada nos animais resitentes, com aumento de IL-4 (4,8x), e T_H1 polarizada nos animais susceptíveis, caracterizada pelo aumento de IFN-γ (20,9x).

Claerebout et al. (2005) ao estudarem bovinos infectados por vermes adultos de *O. ostertagi*, verificaram aumento na expressão de IL-4 e diminuição de IFN-γ nos nódulos linfáticos abomasais de animais previamente imunizados. Assim, nos nódulos linfáticos dos animais imunizados houve polarização da resposta imune T_H2. Esses resultados diferem dos obtidos por Canals et al. (1997), que verificaram aumento de IFN-γ e IL-4 em animais previamente imunizados e infectados por *O. ostertagi*. Entretanto, tais diferenças podem ser quanto ao tipo de infecção: Canals et al. (1997), infectaram os animais com uma dose única de larvas, ao contrário de Claerebout et al. (2005) que infectaram os animais várias vezes, assemelhando-se a uma infecção natural.

Gill et al. (2000) estudaram os níveis de citocinas T_H1 (IFN-γ) e T_H2 (IL-4) em ovinos jovens resistentes e susceptíveis a *H. contortus*. Dentro de cada grupo estudado, alguns animais foram mantidos sem infecção para constituírem dois grupos controle. Esses autores verificaram que os animais constituintes dos grupos controle apresentaram níveis semelhantes de IFN-γ. Em contraste, os animais infectados de ambos grupos apresentaram diminuição de IFN-γ entre os dias 5 e 28 após a infecção. A expressão de IL-4 aumentou nos dois grupos infectados, embora esse aumento foi maior nos animais resistentes. Assim, a resistência contra as infecções por *Haemonchus* em ovinos envolve a resposta de linfócitos T_H2, incluindo o aumento na produção de IL-4 nos nódulos linfáticos abomasais dos animais resistentes.

Entretanto, Meeusen, Balic e Bowles (2005) estudaram a infecção primária de ovinos por *H. contortus* e verificaram não haver forte indução T_H2 tanto na mucosa do abomaso quanto nos nódulos linfáticos abomasais. Nos animais geneticamente resistentes houve aumento de citocinas T_H2 e T_H1: 3 dias após a infecção houve aumento de IL-13 e IFN-γ, retardando a expulsão da larva, enquanto no quinto dia, houve aumento somente de IL-4, que promoveu a expulsão da larva.

Estudos de análise da expressão de citocinas em bovinos infectados artificialmente com larvas (L4) de *O. ostertagi*, verificaram diminuição dos níveis de expressão de citocinas relacionadas ao crescimento e diferenciação, tais como IL-4 e IFN-γ após 18 horas do desafio.

Depois da exposição primária ao parasita, foi verificado aumento do níveis de IL-4 e a diminuição dessa citocina em animais previamente imunizados (GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2004). Assim, em infecções por *Ostertagia* spp., a aplicação do paradigma T_H1/T_H2 torna-se difícil de ser concretizado. Além disso, a concomitante resposta T_H1/T_H2 em bovinos não é bem definida. Mesmo assim, infecções primárias com esse nematódeo parecem induzir a resposta T_H2, caracterizada por elevados níveis de IL-4, mas sem promover uma imunidade protetora. Esse fato pode ser explicado por uma possível inibição da fase efetora da resposta nos tecidos adjecentes ao parasita (GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2004).

Em bovinos criados livre de parasitas desde o nascimento e infectados naturalmente por *O. ostertagi*, o aumento da concentração de IgE e IL-4 foi correlacionada com baixas cargas parasitárias, porém demonstrando uma grande variabilidade entre os animais (THATCHER; GERSHWINI; BAJER, 1989).

Em relação ao intestino delgado, de acordo com a Figura 27, pode-se verificar que há diferença na expressão gênica entre tratamentos, ou seja, entre os animais resistentes e susceptíveis.

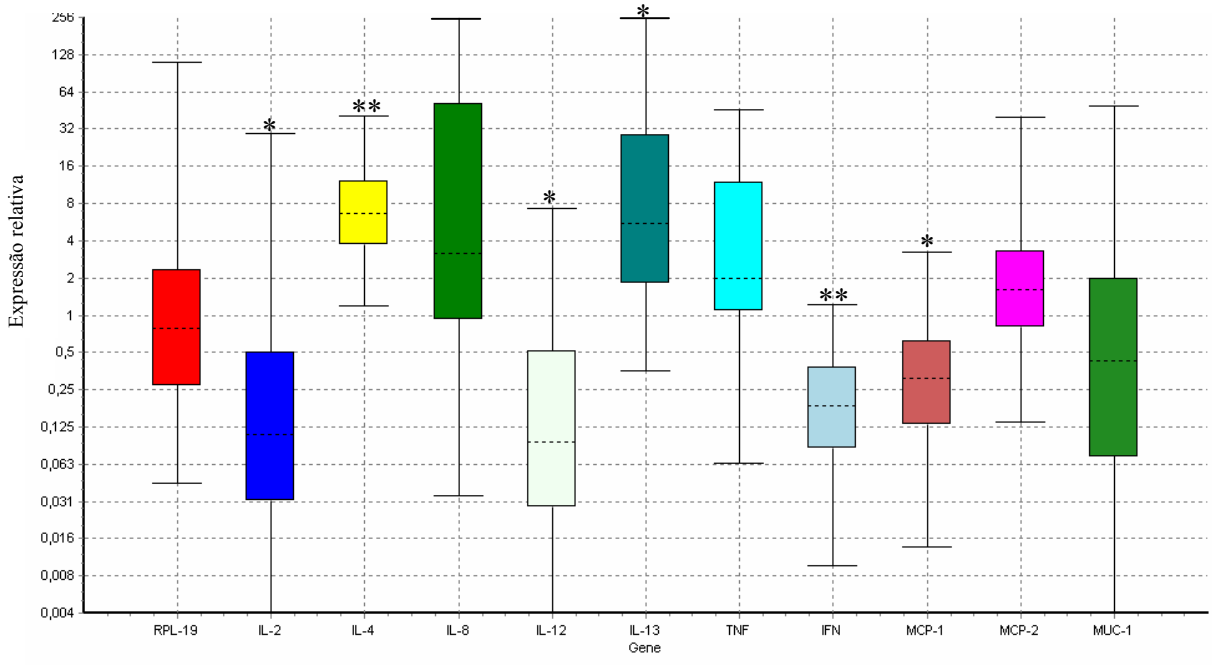

Figura 27 – Razão da expressão gênica no intestino delgado entre os grupos resistente e susceptível (R/S), normalizado para o gene controle (RPL-19). As caixas representam 50% das observações expressas como *n*-diferenças entre os grupos (R/S) em relação ao gene controle. As linhas pontilhadas repreentam a expressão gênica média. As extremidades de cada caixa representam as observações mínimas e máximas. Nota: *P<0,05 **P<0,01

Sabe-se que o parasita do gênero *Cooperia* se aloja neste órgão, podendo-se inferir que a resposta neste local é provavelmente devido à infecção por esse nematódeo. Além disso, as análises de coprocultura (Figura 4) e as análises de recuperação e contagem da carga parasitária (Tabela 7) confirmaram a presença de *Cooperia* no intestino delgado dos animais estudados.

De acordo com as análises de expressão gênica realizadas no intestino delgado, pôde-se verificar diferença nos níveis de expressão de IL-2 ($P<0,047$), IL-4 ($P<0,01$), IL-12p35 ($P<0,029$), IL-13 ($P<0,045$), IFN-γ ($P<0,004$) e MCP-1 ($P<0,03$): IL-4 e IL-13 apresentaram maior expressão no grupo resistente, ao contrário de IL-2, IL-12p35, IFN-γ e MCP-1 que foi maior nos animais susceptíveis.

Analisando os grupos de animais, nota-se que, a resposta nos animais resistentes foi T_H2 polarizada, devido ao aumento de IL-4 (7,6x) e IL-13 (6,8x).

Assim como no tecido do abomaso, IL-4 e IL-13 apresentaram maior expressão no grupo resistente. O intestino é o maior local periférico onde células efetoras T_H2 poderiam ser encontradas, porém, sendo capazes de migrarem e se acumularem em outros locais, persistindo por prolongados períodos de tempo, mesmo após o término da infecção, constituindo células de memória (MOHRS et al., 2005).

A maior evidência da importância das citocinas T_H2, e especificamente da IL-4, na resistência a infecções, veio de modelos animais infectados com *H. polygyrus* e *T. muris*. Nesses modelos foi verificada que a habilidade de camundongos em expelir os nematódeos pode ser bloqueada por pelo menos 17 dias após a infestação, usando um agente inibidor de IL-4 ou de seu receptor. Esse bloqueio de IL-4 leva à cronicidade da infecção, que é acompanhada pelo aumento da resposta T_H1 (ELSE; FINKELMAN, 1998).

Fortes evidências sugerem que IL-4 pode mediar a proteção contra pelos menos alguns estágios de helmintos intestinais. Assim, se camundongos infectados por *H. polygyrus* são tratados com IL-4, ocorre uma diminuição da fecundidade e número de parasitas observados. Esses efeitos anti-parasitários são acompanhados por mudanças na fisiologia gastrintestinal, incluindo aumento da secreção fluida e contração da musculatura lisa (ELSE; FINKELMAN, 1998).

IL-13 também tem importante papel na imunidade T_H2. Estudos realizados em camundongos com *knockout* para o gene da IL-4 e antagonista para o seu receptor, mostraram que tais animais expelem normalmente os parasitas. Assim, IL-13 é o candidato mais provável em desempenhar essa função independente de IL-4, podendo mediar a resistência a infecção na

ausência de IL-4. Complexos de IL-4 administrados a camundongos deficientes de CD4+ tornam-se suficientes em expulsar *N. brasiliensis* (FINKELMAN et al., 2004). IL-13 também é importante na resistência a *T. muris*. Camundongos com *knockout* para esse gene são susceptíveis a *T. muris*, ao contrário dos animais normais, demonstrando a importância dessa citocina no desenvolvimento da imunidade protetora (FINKELMAN et al, 2004); outros estudos também realizados com camundongos submetidos a *knockout* para o gene IL-13 detectaram níveis reduzidos de citocinas T_H2, tais como IL-5 e IL-9, e elevados níveis de citocinas T_H1, tais como IFN-γ (BANCROFT; MCKENZIE; GRENCIS, 1998).

Diversos estudos mostram que a resposta imune a parasitas entéricos requer a produção de citocinas T_H2, particularmente IL-4 e IL-13, que induz a expulsão do parasita através do aumento da contração muscular lisa. Estas citocinas podem induzir a expulsão do parasita *H. polygyrus* através da ativação via receptor IL4-α, resultando em modificações na fisiologia do intestino através de diferentes mecanismos (ZHAO et al., 2003). Tais mecanismos envolvem o aumento da secreção fluida e diminuição de sua absorção, que acarretaria na expulsão do parasita, ou interferência em sua alimentação a partir da mucosa do intestino, por aumentar a quantidade de fluido no lúmen intestinal (SHEA-DONOBUE et al., 2001).

Estes últimos autores também verificaram que IL-4 tem efeito inibidor de IFN-γ em animais infectados por *H. polygyrus.* Nossos resultados confirmam esses achados, já que a expressão de IFN-γ foi menor nos animais resistentes, provavelmente devido a um efeito inibidor dessa citocina por IL-4.

Análises de expressão de citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TNF-α e IFN-γ em ovinos resistentes e susceptíveis a *Trichostrongylus colubriformis*, mostraram que na mucosa do intestino delgado e nódulos linfáticos mesentéricos dos animais resistentes, houve polarização da resposta imune tipo T_H2, devido aos elevados níveis de IL-5, IL-13 e TNF- α, promovendo elevados níveis de imunidade protetora aos animais. IL-4, IL-10 e IFN-γ não apresentaram expressão diferencial entre os grupos, sugerindo que os animais resistentes são capazes de responder a infecções experimentais, mesmo na presença de IFN-γ, através do estímulo da secreção de citocinas T_H2 (PERNTHANER et al., 2005).

Nos animais susceptíveis, citocinas T_H1, como IL- 2 (7,7x), IL-12p35 (8,1x), IFN-γ (5,9x), e MCP-1 (3,6x) tiveram maiores níveis de expressão em relação ao grupo resistente.

IFN-γ é uma importante citocina que potencializa a resposta T_H1 e inibe a T_H2 (COLTMAN et al., 2001), sendo seus efeitos potencializados pela presença de IL-12. Finkelman

et al (2004), ao estudarem camundongos resistentes a *N. brasiliensis* verificaram que esses parasitas são expulsos em 12 dias. Quando tratados com IL-12, que estimula a produção de IFN-γ, há o aumento do tempo de expulsão dos parasitas, além do aumento da produção de ovos.

IL-12 também atua inibindo a resposta T_H2 por suprimir a produção de IL-4 (KHAN et al., 2001; JANEWAY et al., 2002). Estudos realizados em camundongos infectados por *T. spirallis* mostraram que a administração de IL-12 diminuiu a contratibilidade da musculatura intestinal e hiperplasia das células caliciformes, prolongando assim, o tempo de sobrevivência do parasita. Além disso, foram verificados os níveis de expressão de citocinas, constatando-se a diminuição de IL-4 e IL-13 e aumento de IFN-γ nos animais submetidos ao tratamento com IL-12 (KHAN et al., 2001).

IL-12 também tem influência sobre a secreção de MCP-1, sem entretanto, depender da presença de IFN-γ para agir. Helmby e Grencis (2003) observaram que em camundongos submetidos à infestação artificial por *T. spirallis* e tratados com IL-12, houve aumento da expressão de MCP-1, tanto na presença quanto ausência de IFN -γ. Nossos resultados mostram que em infecções por *Cooperia*, houve aumento de MCP-1 nos animais susceptíveis, concomitante ao aumento de IL-12 e IFN-γ.

IL-2 é uma citocina secretada por células T_H0, T_H1 e T citotóxicas. Sem a produção de IL-2, há a inibição da proliferação e diferenciação das células T ao encontrarem um antígeno. Entretanto, uma vez ativadas, podem sintetizar todas as moléculas efetoras necessárias às suas funções especializadas como células T citotóxicas ou células T auxiliares (T_H) (JANEWAY et al., 2002). Estudos realizados em camundongos geneticamente susceptíveis a *N. brasiliensis* mostram que a infecção induziu aumento nos níveis de expressão de IL-2, confirmando seu papel na susceptibilidade à infecção (MATSUDA et al., 1995). Este fato foi confirmado em nossos estudos, uma vez que sua expressão foi maior nos animais suceptíveis (7,71x) que nos resistentes.

São escassos, principalmente em bovinos, os estudos sobre as funções de IL-2 na resposta imune a nematódeos gastrintestinais. Em estudos realizados em camundongos infectados por *N. brasiliensis*, Liu et al. (2005), sugeriram nova função para IL-2: ativar a diferenciação de células T_H2, e estabilizar a acessibilidade ao gene IL-4. Tem sido observado que o bloqueio no gene da IL-2 inibe a diferenciação das células T_H2. Entretanto, se IL-2 é importante no desenvolvimento *in vivo* das células T_H2 durante a potente resposta imune, ainda é incerto.

Entretanto, não são somente os efeitos das células T_H1 ou T_H2 responsáveis pela resistência ou susceptibilidade do hospedeiro a nematódeos gastrintestinais. A genética do hospedeiro tem um importante papel na resposta imunológica a esses parasitas. A expulsão de parasitas é dependente das células T. Citocinas T_H2 são reconhecidas por serem importantes em mediar a infecção por nematódeos gastrintestinais, e a desregulação dessa resposta é vista em animais susceptíveis (HAYES; BANCROFT. GRENCIS, 2004).

Há uma generalização de que a resposta T_H2 protege contra infecção por helmintos. No ambiente intestinal citocinas do tipo T_H2, incluindo IL-3, IL-4, IL-9 e IL-13 agem nos mastócitos, células epiteliais não-linfóides e células caliciformes para induzir a expulsão de parasitas através de reações fisiológicas, tais como a produção de muco e hipercontração muscular.

Cada espécie de parasita é susceptível a diferentes vias de expulsão. Assim, mastócitos da mucosa tem papel na resistência a *T. muris* e as células caliciformes mediam a resistência a *N. brasiliensis,* com ambos tipos de células dependentes de IL-4. Eosinófilos não tem um papel na expulsão de vermes adultos. Assim, diferentes mecanismos são evocados não somente para eliminar diferentes espécies de parasitas, mas também para matar diferentes estágios do ciclo de vida da mesma espécie.

Embora, em alguns casos, uma combinação da resposta T_H1 e T_H2 seja necessária para a eliminação da infecção, uma resposta de ambos os tipos é danosa ao hospedeiro. A resposta T_H2 tem efeitos limitantes na adesão do parasita, exercendo uma enorme influência na sobrevivência do hospedeiro. Assim, células T_H2 protegem o hospedeiro não da infecção por si, mas dos danos patogênicos em potencial, causados por inflamação mediada por células T_H1. Todavia, há também circunstâncias em que as células T_H2 causam patologias, tais como severa atrofia do vilo intestinal e hiperplasia das células da cripta dependentes de IL-4, que acompanha a infecção por *T. muris* (MAIZELS; YAZDANBAKHSH, 2003).

Citocinas e quimiocinas tais como MCP-1 citada anteriormente, são envolvidas nas respostas imune adaptativa e inata, e assim, não é surpreendente que patógenos têm desenvolvido diferentes estratégias para interferir nessa função. Helmintos têm genes ancestrais adaptados presentes em estágio de vida livre para codificar proteínas que podem interagir funcionalmente com os receptores de citocinas do hospedeiro e bloquear sua função. Além disso, os parasitas podem desenvolver agentes miméticos de citocinas: uma proteína semelhante a IFN-γ é secretada por *T. muris*, cuja produção prolonga sua sobrevivência no parasita (MAIZELS; YAZDANBAKHSH, 2003).

Embora a expressão de TNF-α no intestino delgado não seja significativa (P<0,22), vale ressaltar sua maior expressão nos animais resistentes, diferente do tecido do abomaso, cuja expressão aumentou nos animais susceptíveis. Benhke et al. (2003), estudando duas linhagens de camundongos, uma naturalmente resistente e outra susceptível a *H. polygyrus*, verificaram aumento da expressão de TNF-α nos animais resistentes. Uma possível razão para menores níveis dessa citocina nos animais susceptíveis seja devido à inibição da atividade dos mastócitos pelo parasita, uma vez que essas células são as maiores fontes de TNF-α intestinal.

O mesmo fato foi observado por Pernthaner et al. (2005) ao estudarem ovinos resistentes e susceptíveis a *T. colubriformis.* Estes autores associaram a maior expressão de TNF-α nos animais resistentes à uma forma de contribuição para uma resposta inflamatória aguda. Entretanto, se a diminuição dessa citocina nos animais susceptíveis é mediada pelos antígenos parasitários, ou para prevenir os danos associados à patologias causadas pelo TNF-α, ou se isto ocorre por outro mecanismo, ainda não se tem certeza.

Hayes, Bancroft e Grencis (2004) mostraram que o bloqueio de TNF-α em animais resistentes os tornam susceptíveis, sem alterar o fenótipo T_H2. Entretanto, o envolvimento de TNF-α na resistência não tem sido observado em outros nematódeos gastrintestinais. Estudos mostram que TNF- α provoca cronicidade da doença, tendo a capacidade de suprimir a resposta das células T_H1 e T_H2 a antígenos, além de atenuar o reconhecimento pelo receptor da célula T (TCR). TNF-α, embora seja uma citocina produzida tanto por células T_H1 como T_H2, é requerida nos estágios iniciais da infecção para sinergizar os mecanismos efetores T_H2 que expulsam *T. muris* do intestino. Embora uma combinação da resposta T_H1 e T_H2 seja necessária para a expulsão da infecção, uma resposta de ambos os tipos é danosa ao hospedeiro (MAIZELS; YAZDANBAKHSH, 2003).

Até o presente, o entendimento e conhecimento sobre as interações imunológicas que ocorrem entre nematódeos gastrintestinais e seus hospedeiros são derivados de modelos laboratoriais, embora mecanismos efetores precisos que levam à remoção do parasita, ainda estão em processo de definição (PERNTHANER et al., 2005).

Definitiva evidência que os ruminantes podem ter uma resposta T_H1/T_H2 polarizada é ainda discutível: O fato deste trabalho ter encontrado uma resposta imune polarizada em bovinos é inédito, e isto provavelmente seja devido à separação dos animais em grupos resistentes e susceptíveis. Acredita-se que, se o trabalho fosse realizado em grupos de animais com nenhuma

separação prévia, provavelmente a resposta não seria polarizada. Alguns animais poderiam apresentar uma resposta T_H1 enquanto outros, uma resposta T_H2.

Na literatura há apenas um trabalho que caracteriza a resposta imune utilizando ovinos resistentes e susceptíveis, infectados artificialmente por *Haemonchus contortus* (GILL et al., 2000), cujo delineamento experimental é semelhante ao utilizado neste trabalho, entretanto difere no tipo de infecção utilizada (artificial) e na unidade animal. A maioria dos trabalhos publicados tem em seu delineamento, dois grupos de animais: um grupo controle, ou seja, animais livres de endoparasitas, e um grupo tratamento, constituído por animais submetidos à infecção, que apresentam uma resposta imune não polarizada.

Além disso, há muitas pesquisas que utilizam espécies de *Bos taurus* infectados artificialmente por nematódeos de regiões temperadas. Nosso estudo apresenta resultados de pesquisas realizadas em espécies de *Bos indicus* infectados naturalmente por nematódeos de regiões tropicais, o que permite extrapolar, com maior flexibilidade, os resultados obtidos às nossas reais condições ambientais, parasitológicas e produtivas.

5 CONCLUSÕES

A partir das análises de bioinformática realizadas para as sequências válidas (1664 para ER1 e 1898 para ES1), foram identificados produtos gênicos relacionados a resposta imune, característicos de cada biblioteca (resistente e susceptível) e/ou compartilhado entre elas.

As análises de expressão gênica permitiram inferir que, embora diferentes perfis de citocinas estejam envolvidos na resposta imune a nematódeos gastrintestinais, foi verificada resposta T_H2 polarizada nos animais do grupo resistente e T_H1 no susceptível.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M.D.; KELLY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.; McCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C. Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. **Science,** Washington, DC, v.252, p.1651-1656, 1991.

AGNISWAMY, J.; LEI,B., MUSSER, J.M., SUN, P.D. Insight of Host Immune Evasion Mediated by Two Variants of Group A *Streptococcus* Mac Protein. **Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, MD, v.10, p.1074, 2004.

AHO, A.D.; McNULTRY, A.M.; COUSSENS, P.M. Enhanced expression of interleukin-1α and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. p*aratuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.11, p.6479-6486, 2003.

AL-BADER, M.D.; AL-SARRAF, H.A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v.156, p.38- 45, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p.403-410, 1990.

ANUALPEC 2006 Anuário da pecuária brasileira. Coord. by Nehmi, I. M. D. ; Nehmi Filho, V. A.; Ferraz, J. V. FNP Consultoria & Comércio. São Paulo:Ed. Argos, 2000. 369 p.

ARTIS, D.; HUMPHREYS, N.E.; BANCROFT, A. J.; ROTHWELL, N.J.; POTTEN, C.S.; GRENCIS, R.K. Tumor necrosis factor α is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 response during helminth infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.190, n.4, p.953-962, 1999.

ASBIA, 2006: www.asbia.org.br acesso em 13 jul.2006.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Research,** New York, v.7, p.986-995, 1997.

BANCROFT, A.J.; McKENZIE, A.N.J.; GRENCIS, R.K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **Journal of Immunology,** Bethesda, v.160, p.3453-3461, 1998.

BARGER, I.A. Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.32, p.21-35, 1989.

BAUS-LONCAR, M., KAYADEMIR, T., TAKAISHI, S., WANG, T. Trefoil factor family 2 deficiency and immune response. **Cellular and Molecular Life Sciences,** Basel, v.62, p.2947-2955, 2005.

BEH, K.L.; MADDOX, J.F. Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.26, p.879-897, 1996.

BENHKE, J.M.; LOWE, A.; CLIFFORD, S.; WAKELIN, D. Cellular and serological responses in resistant and susceptible mice exposed to repeated infection with *Heligosomoides polygyrus bakeri*. **Parasite Immunology**, Oxford, v.25, p.333-340, 2003.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR); tends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology,** Bristol, v.29, p.23-39, 2002.

BUSTIN, S.A.; BENES, A.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v.34, p.597-601, 2005.

CANALS, A.; ZARLENGA, D.S; ALMERIA, S.; GASBARRE, L.C. Cytokine profile induced by a primary infection with *Ostertagia ostertagi* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.58, p.63-75, 1997.

CARRASCO, L.; PERA, M.; MAY, F.E.B.; WESTLEY, B.R.; MARTINEZ, A.; MORALES, L. Trefoil factor family peptideo 3 prevents the development and promotes healing ischemia-reperfusion injury in weanling rats. **Journal of Pediatric Surgery**, Philadelphia, v.39, n.11, p.1693-1700, 2004.

CHARLES, T.P., FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.65, n.1/2, p.66-73, 1996.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. **Analytical Biochemistry**, New York, v.162, p.156-159, 1987.

CLAEREBOUT, E.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; OLBRECHTS, A.; ZARLENGA, D.S.; GODDEERIS, B.M.; VERCRUYSSE. Cytokine response in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. **Parasite Immunology**, Oxford, v.27, p.325-331, 2005.

COLLINS, S.M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.111, p.1683-1699, 1996.

COLTMAN, D.W., WILSON, J.G., PILKINGTON, J.G., STEAR, M.J.PEMBERTON, J.M. A microssatellite in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parsitized population of Soay sheep. **Parasitology**, Cambridge, v.122, p.571-582, 2001.

CONNARIS, S.; GREENWELL, P. Glycosidases in mucin-dwelling ptotozoans. **Glycoconjugate Journal**, Hampshire, v.14, p.879-882, 1997.

CORWIN, R.M. Economics of gastrointestinal parasitism in cattle. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.72, p.451-460, 1997.

COUSSENS, P.M.; NOBIS, W. Bioinformatic and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology.**Veterinary Immunology and Immunophatology**, Amsterdam, v.86, p.229-244, 2002.

DAINICHI, T., MAEKAWA, Y., ISHII, K., ZHANG, T., NASHED, B.F., SAKAI, T., TAKASHIMA, M., HIMENO, K. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. **Infection and Immunity**, Washington, v**.** 69, n.12, p.7380-7386, 2001.

DESCHOOLMEESTER, M.L.; LITTLE, M.C.; ROLLINS, B.J.; ELSE, K.J. Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection**. Journal of Immunology,** Bethesda, v.170, p. 4693-4700, 2003.

DIEZ-TASCÓN, C., KEANE, O.M., WILSON, T., ZADISSA, A., HYNDMAN, D.L., BAIRD, D.B., McEWAN, J.C., CRAWFORD, A.M. Microarray analysis of selection lines from outbred population to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. **Physiological Genomics,** San Diego, v.21, n.1, p.59-69, 2005.

DOMINGUÉZ-BELLO, M.G., ACHECO, M.A., RUIZ, M.C.MICHELANGELI, F., LEIPPE, M., PEDRO, M.A. Resistance of rumen bacteria murein to bovine gastric lysozyme**. BMC Ecology,** Washington, v.4**,** p.21-27, 2004.

DONG, B.; ZHOU, Q.; ZHAO, J.; ZHOU, A.; HARTY, R.N.; BOSE, S.; BANERJEE, A.; SLEE, R.; GUENTHER, J.; WILLIAMS, BR.; WIEDMER, T.; SIMS, P.J.; SILVERMAN, R.H. Phospholipid scramblase 1 potentiates the antiviral activity of interferon**. Journal of Virology**, Washington, v.78, n.17, p.8983-93, 2004.

DUNPHY, J., HORVATH, A., BARCHAM, G., BALIC, A.,BISCHOF, R, MEEUSEN, E. Isolation, characterization and expression of mRNAs encoding the ovine CC chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1α e 2. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v.82, p.153-164, 2001.

ECHEVARRIA, F.A.M., BORBA, M..F.S, PINHEIRO, A.A.C., WALLER, P., HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistence in nematode parasites of sheep in Southern Latim America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.199-206, 1996.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D.; MALISZEWSKI, C.R.; GRENCIS, R.K. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.179, p.347-351, 1994.

ELSE, K.J.; FINKELMAN, F.D. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. **International Journal for Parasitology,** Oxford, v.28, p.1145-1158, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbour, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research,** Cold Spring Harbour, v.8, n.3, p.186-194, 1998.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; MORRIS, S.C.; GILDEA, L.; STRAIT, R.; MADDEN, K.B.; SCHOPF, L.; URBAN JR, J.F. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunologycal Reviews,** Copenhagen, v.201, p.139-155, 2004.

GANGUR, V., BIRMINGHAM, N.P., THANESVORAKUL, S. Chemokines in health and disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v.86, p.127-166. 2002.

GASBARRE, L.C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.72, p.327-343, 1997.

GASBARRE, L.C.; LEIGHTON, E. A.; SONSTEGARD, T. Role of the bovine system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.98, p.51-64, 2001.

GILL, H.S.; ALTMANN, K.; CROSS, M.L.; HUSBAND, A.J. Induction of T helper 1 and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, Oxford, v.99, p.458-463, 2000.

GINGINZER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.30, p.503-512, 2002.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DACALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantifiy cytokine gene expression. **Methods**, New York, v.25, p.386-401, 2001.

GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; CANALS-CABALLERO, A.; ALMERIA, S.; PASQUALI, P.; ZARLENGA, D.S.; GASBARRE, L.C. Inhibition of bovine T lymphocyte response by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.120, p.199-214, 2004.

GORDON, H.M.; WITHLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council Science Industry Research,** London, v.12, p.50-52, 1939.

GRAY, G.D.; GILL, H.S. Host genes, parasites and parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.23, n.4, p.485-494, 1993.

GUIMARÃES, M.P.; COSTA, H.M.; LIMA, W.S. Prevalence of *Cooperia punctata, C. pectinata and C. oncophora* infections in dairy calves in Brazil. **Journal of Helminthology,** London, v.64, n.4, p.319-322, 1990.

GUPTA, P.K.; BIND, R.B.; WALUNJ, S.S.; SAINI, M. High nucleotide and amino acid sequence similarities in tumor necrosis factor-α amongst Indian buffalo (*Bubalis bubalis*), Indian cattle (*Bos indicus*) and other ruminants. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v.31, p.89-193, 2004.

HAGENBEEK,T. J.; NASPETTI, M.; MALERGUE, F.; GARÇON, F.; NUNÈS, J. A.; CLEUTJENS, K. B.J.M.; TRAPMAN, J.; KRIMPENFORT, P.; SPITS, H. The Loss of PTEN Allows TCR Lineage Thymocytes to Bypass IL-7 and Pre-TCR–mediated Signaling**. Journal of Experimental Medicine**, New York, v.200, n.7, p.883-894, 2004.

HANSEN, C.; FU, A.; MENG, Y.; OKINE, E.; HAWKEN, R.; BARRIS, W.; LI, C.; MOORE, S.S. Gene expression profiling of the bovine gastrointestinal tract. **Genome,** Ottawa, v. 47, p.639-649, 2004.

HAYES, K.S.; BANCROFT, A.J.; GRENCIS, R.K. Immune mediated regulation of chronic intestinal nematode infection. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.210, p.75-88, 2004.

HELMBY, H.; GRENCIS, R.K. IFN-γ-independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.171, p.3691-3696, 2003.

HILL, D.P.; DAVIS, A.P.; RICHARDSON, J.E.; et al. Strategies for Biological Annotation of Mammalian Systems: Implementing Gene Ontologies in Mouse Informatics. **Genomics**, San Diego, v.74, p.121-128, 2001.

HÓLMEN, J.M., OLSON, F.J., KARLSSON, H., HANSSON, G.C. Two glycosylation alterations of mouse intestinal mucins due to infection caused by parasite Nippostrongylus brasiliensis. **Glycoconjugate Journal,** Hampshire, v.19, p. 67-75, 2002.

HOSTE, H. Adaptative physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **International Journal for Parasitology,** Oxford, v.31, p.231-244, 2001.

HUANG, X.; MADAN, A. Cap3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research,** Cold Spring Harbour, v.9, n.9, p.868-877, 1999.

HUSBAND, A.J.; BAO, S.; BEAGLEY, K.W. Analysis of the mucosal microenvironment: factors determining succesful response to mucosal vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.72, p.135-142, 1999.

JABRANE-FERRAT, N.; NEKREP,N.; TOSI, G.; ESSERMAN,L.J.; PETERLIN, B.M. Major Histocompatibility Complex Class II Transcriptional Platform: Assembly of Nuclear Factor Y and Regulatory Factor X (RFX) on DNA Requires RFX5 Dimers. **Molecular Cell Biology,** San Diego, v.22, n.15, p.5615-5625, 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença. 5ed. Porto Alegre: Artemed, 2002. 767p.

JOHNSON, D.R.; SALES, J.; MATTHEWS, J.B. Local cytokine response in *Dictyocaulus viviparous* infection. **Veterinary Parasitology** Amsterdam, v.128, p.309-318, 2005.

KE, L.D.; CHEN, Z.; YUNG, W.K.A. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. **Molecular and Cellular Probes,** London, v.14. p.127-135, 2000.

KEITH, R.K. The differentiation of infective larvae of some common nematode parasites of cattle**. Australian Journal of Zoology**, Victoria, v.1, p.223-235, 1953.

KHAN, W.I.; BLENNERHASSETT, P.A.; DENG, Y.; GAULDIE, J.; VALLANCE, B.A.; COLLINS, S.M. IL-12 gene transfer alters gut physiology and host immunity in nematode-infected mice. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology,** Washington, v. 288, n.1, p.143-150, 2001.

KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.94, p.283-294, 2003.

LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C.N.; SIGRIST,B.; EHRENGRUBER, M.U.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for measurement of feline cytokine mRNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.71, p.291-305, 1999.

LIEW, F.Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews,** London, v.2, p. 55-59, 2002.

LIMA, W.S. Seasonal infection pattern of gastrintestinal nematodes of beef catlle in Minas Gerais State- Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.74, n2-4, p. 203-214, 1998.

LIU, W.; SPERO, D.M. Cysteina protease cathepsin S as a key step in antigen-presentation. **Drugs New Perspective**, New York, v.17, n.6, p.357-363, 2004.

LIU, Z.; LIU, Q.; HAMED, H.; ANTHONY, R.M.; FOSTER, A.; FINKELMAN, F.D.; URBAN JR, J.F.; GAUSE, W.C. IL-2 and autocrine IL-4 drive the in vivo development of abtigen-specific TH2 cells elicited by nematodes parasites. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.174, p.2242-2249, 2005.

LIU, Q.; LIU, Z.; WHITMIRE, J.; ALEM, F.; HAMED, H.; PESCE, J.; URBAN JR, J.F.; GAUSE, W.C. IL-18 stimulates IL-13-mediated IFN-c-sensitive host resistance in vivo. **European Journal of Immunology,** Weinheim, v.36, p.1187-1198, 2006**.**

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v.25, p.402-408, 2001.

LUKOV, G.L.; MYUNG, C.S.; McINTIRE, W.E.; SHAO, J.; ZIMMERMAN, S.S.; GARRISON, J.C.; WILLARDSON, B.M. Role of the isoprenyl pocket of the G protein $\beta\gamma$ subunit complex in the binding of phosducin and phosducin like protein. **Biochemistry**, Easton, Pa, v.43, p.5651-5660, 2004.

MAIZELS, R.M.; YAZDANBAKHSH, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews**, London, v.3, p.733-744, 2003.

MATSUDA, S.; UCHIKAWA, R.; YAMADA, M.; ARIZONO, N. Cytokine mRNA expression profiles in rats infected with the intestinal nematode *Nippostrongylus brasiliensis.* **Infection and Immunity**, Washington, v.63, n.2, p.4653-4660, 1995.

MEEUSEN, E.N.T.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v.108, p.121-125, 2005.

MENGE, D.M.; BEHNKE, J.M.; LOWE, A.; GIBSON, J.P.; IRAQI, F.A.; BAKER, R.L. Mapping of chromosomal regions influencing immunological responses to gastrointestinal nematode infections in mice. **Parasite Immunology,** Oxford, v.25, p.341-349, 2003.

MOHRS, K.; HARRIS, D.P.; LUND, F.E.; MOHRS, M. Systemic dissemination and persistence of TH2 and type 2 cells in response to infection with a strictly enteric nematode parasite. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.175, p.5306-5313, 2005.

MONCADA D. M., KAMMANADIMINTI, S. J., CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.19, n.7, p.305-311, 2003.

NEWLANDS, G.F., MILLER, H.R., JACKSON, F. Immune exclusion of Haemonchus contortus larvae in the sheep: effects on gastric mucin of immunization, larval challenge and treatment with dexamethasone. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.102, n.04, p.433-442, 1990.

NICOLAU, C. V. J., AMARANTE, A. F. T., ROCHA, G. P., GODOY, W. A. C. Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, p.351-357, 2002.

OLSSON, N.; TAUB, D.D.; NILSSON, G. Regulation of mast cell migration by TH1 and TH2 cytokines: Identification of tumor necrosis factor -α and IL-4 as mast cell chemotaxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.59, p.267-272, 2004.

ONTSOUKA, E.C.; KORCZAK, B.; HAMMON, H.M.; BLUM, J,W. Real-time PCR quantification of bovine lactase mRNA: Localization in the gastrointestinal tract of milk –fed calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87. p.4230-4237, 2004.

PERNTHANER, A.; COLE, S.; MORRISON, L.; HEIN, W.R. Increased of Interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. **Infection and Immunity,** Washington, v.73, n.4, p.2175-2183, 2005.

PETROVSKY, N.; BRUSIC, V. Virtual models of the HLA class I antigen processin pathway. **Methods,** New York, v.34, p.429-435, 2004.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, n.9, p.1-10, 2002

PIMENTEL NETO, M.; FONSECA, A.H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bovinos de leite na microregião homogênea do Vale do Paraíba Fluminense. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n.112, p.41-46, 1999.

PIMENTEL NETO, M.; FONSECA, A.H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Rio de Janeiro, v.22, n.4, p.148-152, 2002.

PROSDOCIMI, F.; FARIA-CAMPOS, A.C.; PEIXOTO, F.C.; PENA, S.D.J.; ORTEGA, J.M.; FRANCO, G.R. Clustering of *Schistossoma mansoni* mRNA sequences and analysis of the most transcribed genes: implications in metabolism and biology of different developmental stages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.1, p.61-69, 2002.

ROBERTS, F.H.S. & O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg count and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.1, p.99-102, 1949.

ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the T_H1/T_H2 balance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology,** Saint Louis, v.113, n.3, p.395-400, 2004.

ROSBOTTOM, A., KNIGHT, P.A., McLACHLAN, G., THORNTON, E.M., WRIGHT, S.W., MILLER, H.R.P., SCUDAMORE, C.L. **Parasite Immunology,** Oxford, v.24, p.67-75, 2002.

ROZEN, S., SKALETZKY, H.J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. 568p.

RUAS, J.L.; BERNE, M.E.A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. Doenças de ruminantes e equinos. São Paulo, 2001. cap.5, p.89-105.

SAS, Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 6, 4th ed., version 2, SAS Institute Inc., Cary, NC; 1980. 943 p.

SCOTT, I.; DICK, A.; IRVINE, J.; STEAR, M.J.; McKELLER, Q.A. The distribution of pepsinogen within the abomasa of cattle and sheep infected with *Ostertagia* spp. and sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, p.145-159, 1999.

SHEA-DONOHUE, T.; SULLIVAN, K.; FINKELMAN, F.D.; MADDEN, K.B.; MORRIS, S.C.; GOLDHILL, J.; PINEIRO-CARRERO, V.; URBAN JR, J.F. The role of IL-4 in *Heligosomoides polygyrus*-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. **The Journal of Immunology,** Baltimore, v.167, p.2234-2239, 2001.

SHI, H.Z. Eosinophils function as antigen-presenting cell. **Journal of Leukocyte Biology,** New York, v.76, p.520-527, 2004.

SMITH, P.L.; GROSSE, W.M.; FREKING, B.A., et al;. Sequence Evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. **Genome Research**, Cold Spring Harbour, v.11, p.626-630, 2001.

SOBOSLAY, P.T.; HAMM, D.M.; PFÄFFLIN, F.; FENDT, J.; BANLA, M.; SCHULZ-KEY, H. Cytokine and chemokine responses in patients co-infected with *Entamoeba istolytica/dispar, Necator americanus* and *Mansonella perstans* and changes after anti-parasite treatment. **Microbes and Infection,** Paris, v.8, p.238-247, 2006

SONSTEGARD, T.S., GASBARRE, L.C. Genomic tools to improve parasite resistence. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p.387-403, 2001.

SONSTEGARD, T.S.; CAPUCO, A.V.; WHITE, J.; VAN TASSEL, C.P.; CONNOR, E.E.; CHO, J.; SULTANA, R.; SHADE, L.; WRAY, J.E.; WELLS, K.D.; QUACKENBUSH, J. Analysis of bovine mammary gland EST and functional annotation of *Bos taurus* gene index. **Mammalian Genome,** New York, v.13, p. 373-379, 2002.

SOUTELLO, R.V.G.; CONDI, G.K.; PAES, F.; FONZAR, J.F. Influência do parasitismo e da suplementação protéica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e da raça Guzerá. **Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v.2, p.21-27, 2002.

SOUTELLO, R.V.G. **Eficácia de albendazol, levamisol, ivermectina e moxidectina em bovinos naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais, no noroeste do Estado de São Paulo**. 2005. 75p. Tese (Doutorado na área de Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2005.

STEAR, M.J.; INNOCENT, G.T.; BUITKAMP, J. The evolution and maintenance of polymorphism in the major histocompatibility complex. **Veterinary Immunology and Immunophatology,** Amsterdam, v.108, p.53-57, 2005.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Bacteriology,** Washington, v.76, p.1-31, 2000.

SUAREZ, V.H.; BUSETTI, M.R.; LORENZO, R.M. Comparative effects of nematode infection on *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbres calves grazing on Argentina's Western Pampas.**Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.58, p.263-271, 1995.

SUZUKI, T.; HIGGENS, P.J.; CRAWFORD, D.R. Control selection for RNA quantification. **Biotechniques,** Natick, v.29, p.332-337, 2000.

THATCHER, E.F.; GERSHWIN, L.J.; BAJER, N.F. Levels of serum IgE in response to gastrointestinal nematode in cattle. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.32, p.153-161, 1989.

THEODOROPOULOS, G.; HICKS, S. J.; CORFIELD, A.P.; MILLER, B.G.; CARRINGTON, S.D. The role of mucins in host-parasite interactions: Part II- helminth parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.17, n.3, p.130-135, 2001.

TICHOPAD, A.; PFAFFL, M.W.; DIDIER, A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. **Molecular and Cellular Probes,** London, v.17, p.5-10, 2003.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4.ed. Tokio: Japan International Cooperation Agency, 1994. 143p.

VUADENS, F.; RUFHER, N.; KRESS, A.; CORTHESSY, P.; SCHENEIDER, P.; TISSOT, J.D. Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes. **Proteomics,** Weinheim, v.4, p.2216-2220, 2004.

WALDVOGEL, A.S.; LEPAGE, M.F.; ZAKHER, A.; REICHEL, M.P.; EICHER, R.; HEUSSLER, V.T. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in claves experimentally infected with *Fasciola hepatica.* **Veterinary Immunology and Immunopathology,** Amsterdam, v.97, p.53-63, 2004.

WENPE, F.; KLEINE, K.; SCHEIT, K.H. Characterization of bovine monocyte chemoattractant protein-1 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** Orlando, v.202, n.3, p.1272-1279, 1994.

WILKENING, S.; BADER, A. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: Methodical Analysis and Mathematical Model. **Journal of Biomolecular Technology,** Utah, v.15, p.107-111, 2004.

WITTWER, C.T.; RIRIE, K,M.; ANDREW, R.V.; DAVID, D.A.; GUNDRY, R.A.; BALIS, U.J. The LightCycler TM: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. **BioTechniques**, Natick, v. 22, p.176-181, 1997.

ZHANG, B.; SU, Y.P.; WANG, T.; WANG, F.C.; AI, G.P.; XU, H.; WANG. J.P.; HUANG, Y-S.; JIANG, J-X. Cloning and expression of mouse peroxiredoxin I in IEC-6 cells. **World Journal of Gastroenterology**, Beijiing, v.10, n.14, p.2109-1212, 2004.

ZHAO, A.; McDERMOTT, J.; URBAN JR, J.F.; GAUSE, W.; MADDEN, K.B.; YEUNG, K.A.; MORRIS, S.C.; FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOUBE,T. Dependence of IL-4, IL-13 and nematode induced alterations in murine small intestine smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.171, p.948-954, 2003.

ANEXOS

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Precursor de apolipoproteína A-I	5	0	0,03
Citocromo oxidade subunidade III	4	0	0,05
Proteína hipotética	3	0	0,10
Complexo protéico 3 anéis de hidroxilação	3	0	0,10
Antígeno de tumor CTCL	3	0	0,10
Fator trefoil 2	3	0	0,10
No hits	3	0	0,10
Preproteina translocase	3	0	0,10
Histidina quinase transdutora de sinal	3	0	0,10
Proteína Ssb	3	0	0,10
Homólogo a serina protease	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Apolipoproteína A-IV	2	0	0,30
Proteína hipotética conservada	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Histidina kinase	2	0	0,30
MHC classe II- DR-ALPHA	2	0	0,30
Proteína sintase carreador de 3-oxoacil-	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Hipotética proteína transdutora de sinal	2	0	0,30
Proteína de resistência a bacitracina não caracterizada	2	0	0,30
Antienzima ODC- ORF2	2	0	0,30
Família transportador *	2	0	0,30
Proteína hipotética	2	0	0,30
Proteína GekBS044	2	0	0,30
Hipotética	2	0	0,30
Lipoproteína de superfície	2	0	0,30
Proteína de membrana ligante de progesterona	2	0	0,30
Proteína quimiotática aceptora de grupo metil	2	0	0,30
Subunidade beta da ATPase H+/K+ gástrica	2	0	0,30
Serina L-deaminase	2	0	0,30
Serina/treonina kinase 11	2	0	0,30
Proquimiosina	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Via de biossíntese flagelar	2	0	0,30
Proteína de efluxo de cátion	2	0	0,30
Transgelina	2	0	0,30
Uréia amidoliase	2	0	0,30
Manitol desidrogenase	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
ORF 147	2	0	0,30
Similar a proteína ribossomal L27a	2	0	0,30
Desconhecida	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Similar a proteína NHP2	2	0	0,30
ATP sintase	2	0	0,30
Proteína de junção de pilo	2	0	0,30
H+/K+ ATPAse	2	0	0,30
GDDR	2	0	0,30
Fator de transcrição associado a HLA-B	2	0	0,30
Proteína hipotética	2	0	0,30
Adenosina deaminase	2	0	0,30
Similar a proteína 20S ribossomal	2	0	0,30
ATPase domínio	2	0	0,30
Translocase ATP/ADP	2	0	0,30
Antígeno de classe I do MHC	2	0	0,30
Similar ao RNAm para KIAA012	2	0	0,30
Similar a proteína hipotética de senescência	2	0	0,30
Proteína FP18798	2	0	0,30
Citocromo oxidade subunidade VIa	2	0	0,30
IL-5	2	0	0,30
Arilsulfatase A	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Proteína de membrana (externa)	2	0	0,30
Pioverdine sintetase A	2	0	0,30
Proteína transportador ABC	2	0	0,30
Isomerase tiol-disulfato	2	0	0,30
Citocromo oxidade subunidade II	2	0	0,30
Coenzima F420 dependente de N5	2	0	0,30
Similar a proteína ribossomal S13	2	0	0,30
Citocromo tipo quinol oxidativo	2	0	0,30
Proteína histidina kinase	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Proteína sem nome	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Proteína ribossomal L4	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
Prolina pro-colágeno	2	0	0,30
No hits	2	0	0,30
IgM	2	0	0,30
Precursor do MHC classe II DRB3	2	0	0,30
Proteína associada a surfactante pulmonar	2	0	0,30
Proteína sem nome	2	0	0,30
Similar a cDNA Riken	2	0	0,30
ATPase H+/K+ gástrica subunidade beta	2	0	0,30
MCP-1	2	0	0,30
IL-4	2	0	0,30
Receptor de IL-4	2	0	0,30

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Mucina 5	2	0	0,30
IL-10	2	0	0,30
IL-9	2	0	0,30
Proteína hipotética 18K	7	1	0,03
Proteína hipotética	4	1	0,20
Antígeno do MHC classe I	4	1	0,20
Fosfoglicerato kinase	3	1	0,30
No hits	3	1	0,30
Ubiquinona/Menaquinona	3	1	0,30
Mucina gástrica 6	2	1	0,60
Transportador fosfato ABC	2	1	0,60
Regulador transcricional	2	1	0,60
Lisozima 2d	2	1	0,60
No hits	2	1	0,60
Estrutura cristal mitocondrial, cadeia C	2	1	0,60
Proteína HSPC023	2	1	0,60
glicoproteína de membrana	2	1	0,60
Proteína sem nome	2	1	0,60
No hits	2	1	0,60
Similar ao fator 1 de ribosilação de ATP	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Cadeia leve de miosina	1	1	1,0
Proteína desconhecida	1	1	1,0
Proteína KRT8	1	1	1,0
Xantina desidrogenase	1	1	1,0
Elemento de resposta a apoptose	1	1	1,0
Supresor de glioma	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Precursor de fator trefoil 3	1	1	1,0
Fator de interação com tireodoxina	1	1	1,0
Precursor de grelina *	1	1	1,0
Proteína desconhecida	1	1	1,0
-6-pyruvoyl-tetrahydropterina sintase	1	1	1,0
Proteína 4 associada a imunidade	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Permeases da superfamília facilitador	1	1	1,0
Subunidade D de amidotransferase	1	1	1,0
Desuccinilase	1	1	1,0
Sistema transportador de peptídeo tipo ABC	1	1	1,0
Calreticulina	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Similar a cadea leve de miosina	1	1	1,0
Fator 600 associado a retinoblastoma	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Similar a proteína ribossomal L3	1	1	1,0
H+/K+ ATPAse	1	1	1,0
Semelhante a transcriptase reversa	1	1	1,0
Lectina	1	1	1,0
Cadeia pesada de IgA	1	1	1,0
Similar a poliubiquitina	1	1	1,0
Proteína transportador ABC	1	1	1,0
Proteína hipotética	1	1	1,0
ATP sintase subunidade F0 6	1	1	1,0
Peptídeo sintetase não ribossomal	1	1	1,0
N-acetilglucosamina 1- fosfotransferase	1	1	1,0
Seril sintetase RNAt	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Hipotética porina	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Diubiquitina	1	1	1,0
Complemento C1q	1	1	1,0
Fator de elongação da tradução eucarioto	1	1	1,0
NADH desidrogenase subunidade 4	1	1	1,0
Subunidade maior de3-isopropilmalato desidratase	1	1	1,0
Peptídeo transportador de antígeno	1	1	1,0
Proteína dilocil-difosfooligosacarídeo	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Coativador transcricional Sp110b	1	1	1,0
Antígeno específico a transplantação de tumor P198	1	1	1,0
Proteína de bissíntese flagelar	1	1	1,0
Hidrolase amido ácido graxo	1	1	1,0
Esterase A	1	1	1,0
Proteína BCOR	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
NADH desidrogenase subunidade 5	1	1	1,0
Beta espectrina	1	1	1,0
Sistema xilase de transporte tipo ABC	1	1	1,0
Poliubiquitina	1	1	1,0
Acil CoA desidrogenase	1	1	1,0
Proteína 1 de ligação a poli (rC)	1	1	1,0
Similar a transcriptase reversa	1	1	1,0
Hipotético regulador arilsulfatase	1	1	1,0
Cadeia pesada de Ig alpha	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Cadeia B do complexo GS-Alpha	1	1	1,0
Metiltioadenosina fosforilase	1	1	1,0
Enolase 1	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Proteína de biosíntese de lipopolissacarídeo	1	1	1,0
Proteína ribossomal L6	1	1	1,0
Proteínas contendo domínio de adesão DNA	1	1	1,0
Hipotética acil CoA sintetase	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Aminotransferase	1	1	1,0
Proteína RABC1	1	1	1,0
Domínio EAL	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
No hits	1	1	1,0
Receptor de IL-13	0	2	0,40
Interferon alpha	0	2	0,40
IL-12	0	2	0,40
Receptor de IL-12	0	2	0,40
Receptor de interferon alpha	0	2	0,40
Receptor de interferon gamma	0	2	0,40
Mucina 1	0	2	0,40
Proteína tumoral	5	2	0,30
cDNA RIKEN 1190003M12	4	2	0,40
Proteína ribossomal S3a, 40S	4	2	0,40
Proteína de ligação à região constante (Fc) da IgG	2	2	1,0
Proteína ITLN2	2	2	1,0
No hits	2	2	1,0
Proteína ribossomal L7a	2	2	1,0
No hits	2	2	1,0
Proteína ACTB	1	2	0,80
Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferase A	1	2	0,80
Proteína associada a surfactante pulmonar	1	2	0,80
Similar a transcriptase reversa	1	2	0,80
No hits	1	2	0,80
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1	2	0,80
Precursor do trefoil fator 1	1	2	0,80
Proteína ribossomal L7, subunidade 60S	1	2	0,80
Desmina	1	2	0,80
Proteína VDUP1	1	2	0,80
Regulador transcricional	1	2	0,80
Proteína conservada não caracterizada	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Similar a dupla C2	0	2	0,40
Acetil coenzima A desidrogenase	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Proteína Dxd5	0	2	0,40
Proteína kinase 1 específica a testículo	0	2	0,40
Transferase O-linked-GlcNAc isoforma 2	0	2	0,40
Proteína KIAA0807	0	2	0,40
Hipotética proteína precursora de amilóide	0	2	0,40

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Proteína transduora de sinal associada a tumor	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Proteína desconhecida	0	2	0,40
Similar a subunidade 26S do poteassoma	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Inibidor de ribonuclease	0	2	0,40
Proteína Mat2a	0	2	0,40
Centaurino beta 1	0	2	0,40
Queratina	0	2	0,40
Proteína integral de membrana 2B	0	2	0,40
Proteína Map4k6	0	2	0,40
Proteína de ligação à glicina	0	2	0,40
Acil-CoA desidrogenase	0	2	0,40
ATP sintase subunidade F0 6	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase	0	2	0,40
Metiltransferase	0	2	0,40
Anexina A13	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Proteína MTA2	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Thiol-disulfato isomerase	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Bacteriofitocromo	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Fator de ativação da transcrição	0	2	0,40
Antígeno do MHC classe I	0	2	0,40
Proteína TLN	0	2	0,40
Calreticulina	0	2	0,40
Similar à proteína CGI-125	0	2	0,40
Proteína GTF3C5	0	2	0,40
Complexo piruvato desidrogenase	0	2	0,40
Proteína hipotética	0	2	0,40
TAF-Ibeta2	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Similar a proteína tolerante a cátion divalente CUPA	0	2	0,40
No hts	0	2	0,40
Proteína ribossomal S12	0	2	0,40
Proteína associada a surfactante pulmonar	0	2	0,40
Progastricsina	0	2	0,40
Similar a transcriptase reversa	0	2	0,40
Gene 15 relacionado a MORF	0	2	0,40

Anexo A – Análise comparativa (*Northern* digital) das bibliotecas ER1 e ES1 quanto ao número de ESTs

(continua)

Sequências	Número de *EST*s ER1	Número de *EST*s ES1	Probabilidade de significância
Produto gênico de elevada lactação 1	0	2	0,40
Provável proteína de adesão periplasmática	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Cadeia A, E175s mutante de HSP 70KDa	0	2	0,40
Heme oxigenase 2	0	2	0,40
Proteína kinase ativador de mitose	0	2	0,40
No hits	0	2	0,40
Proteína PA4127	0	2	0,40
Proteína UQCRH	0	2	0,40
Ferritina	5	3	0,40
Microglobulina beta2	3	3	1,0
Proteína ribossomal P0, subunidade 60S	1	3	0,50
Proteína ribossomal L10, subunidade 60S	1	3	0,50
Desmina	1	3	0,50
Inibidor de serina protease	1	3	0,50
Proteína TCCE514	1	3	0,50
No hits	0	3	0,20
Fator secretor da cadeia pesada de IgM	0	3	0,20
CDNA RIKEN 1190003M12	0	3	0,20
Antígeno do MHC- BOLA de classe I	0	3	0,20
Poliubiquitina	0	3	0,20
Cadeia pesada MHc classe I	0	3	0,20
ATP sintase subunidade F0 6	13	4	0,02
NADH desidrogenase subunidade 1	6	4	0,50
Anticorpo anti-testosterona	4	4	0,90
Cadeia leve de Ig lambda	3	4	0,90
Queratina	3	4	0,90
Precursor de flaveolina	1	4	0,30
Enhancer da transcrição do gene relacionado ao testículo	0	4	0,09
Similar a proteína 4631422O05Rik	5	5	0,90
Citocromo oxidade subunidade I	8	6	0,50
Hensina	3	6	0,50
Receptor de laminina 1	7	7	0,80
Fator de elongação da tradução de eucarioto	2	7	0,20
Proteína de adesão ao promotor do RNAr	9	11	0,90
Precursor de lisozima C-1	24	12	0,01
Lisozima, macrófago; lisozima 2d	18	12	0,20
Receptor de imunoglobulina polimérica	7	13	0,40
Proteína hipotética 2	6	14	0,20
Pepsinogênio A	7	21	0,02
Citocromo oxidase subunidade 1	21	23	0,90
Lisozima; macrófago; lisozima 2d	81	47	0,01
Proteína hipotética associada a senescência	82	58	0,006