

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PROSPECÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM A  
RESITÊNCIA AO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* EM BOVINOS DE CORTE**

**Thaís de Oliveira Rodrigues**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PROSPECÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM A  
RESISTÊNCIA AO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* EM BOVINOS DE CORTE**

**Thaís de Oliveira Rodrigues**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan**

**Co-orientadora: Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal - UNESP, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia (Produção Animal).

Agosto – 2007

Jaboticabal – SP

R696p Rodrigues, Thaís de Oliveira  
Prospecção de genes relacionados com a resitência ao carrapato  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos de corte / Thaís de  
Oliveira Rodrigues. -- Jaboticabal, 2007  
vii, 81 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Luiz Roberto Furlan

Banca examinadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro, Maribel  
Elisabeth Funes Huacca

Bibliografia

1. Bovinos de corte. 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.  
3. *Microarray*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 636.2:577.2

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**THAÍS DE OLIVEIRA RODRIGUES** – nascida em Araraquara (SP), em 30 de dezembro de 1982. Em março de 2001, iniciou o Curso de Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Araraquara (UNIARA) em Araraquara – SP. Durante os dois últimos anos da graduação foi bolsista de Iniciação Científica no programa PIBIC/CNPq na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Pecuária Sudeste em São Carlos (SP). Em março de 2005 iniciou o Mestrado, no curso de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Produção Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal (SP).

**"I CAN ASSURE YOU THAT ABOVE THE CLOUDS IN  
YOUR LIFE THE SUN IS SHINING. GOD IS STILL  
THERE DESPITE ANY TRAGEDY THAT YOU MAY BE  
EXPERIENCING."  
BILLY GRAHAM**

*A Deus, por ter suprido todas as minhas necessidades, não me deixando faltar nada,*

*Aos meus pais Ulysses e Laura, que com muito amor me têm  
guiado até aqui, fazendo parte desse sonho e me ajudando a  
subir a escada da vida,*

*À minha mãe Sylvia e aos meus irmãos Daniel e  
Mariana, pelos momentos de felicidade, alegria e  
companhia,*

*À minha tia Heloisa e minha prima Anna Luisa, que  
acompanharam tudo bem de perto, me ajudando a superar os  
momentos difíceis,*

*Ao meu namorado Marco Aurélio, que durante todo o tempo  
tem me dado muito amor e carinho, sendo meu companheiro  
de todas as horas,*

*Dedico com carinho*

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) e aos professores do curso de pós-graduação, pelo aperfeiçoamento profissional;

À fazenda Bela Vista por ter cedido os animais e todos os subsídios necessários para a realização desse trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo;

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pela concessão de auxílio financeiro, para execução desta dissertação;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Roberto Furlan e minha co-orientadora Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira pela oportunidade de desenvolver este trabalho; pelas orientações, ensinamentos, apoio, amizade e principalmente paciência;

Aos amigos André Julien Ferraz, Leonardo Bernardes da Rocha e Julio César Bortolossi pelo apoio científico, conselhos, e pela amizade;

Aos funcionários do setor de confinamento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP – Botucatu (SP) que me ajudaram no manejo diário dos animais;

Ao meu estagiário Eduardo Pegorer Gonçalves que encarou o árduo trabalho de banhar todos os animais;

À Profa Dra Maria Inês Tiraboschi Ferro, por ceder o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM), e principalmente pelos conselhos e a amizade nos momentos difíceis;

Às minhas amigas de laboratório, Daniele, Karina, que compartilharam das conquistas, alegrias e tristezas.

A todos os colegas do LBM que tornaram o convívio no laboratório sempre muito agradável e divertido;

Os meus “irmãos”, companheiros de lar Cristina, Celso Eduardo, Ana Carolina, Giselle, Elaine e Patrícia que dia a dia estiveram comigo, dividindo cada pedacinho das conquistas, e com quem aprendi muito;

Ao meu namorado Marco Aurélio, por estar sempre presente tanto nas horas tristes, como nas alegres e, por além de namorado, amigo;

Aos meus pais, Ulysses e Laura, pelo exemplo de vida, pelo amor, incentivo e apoio em todas as decisões;

A minha mãe, meus irmãos, tia, prima e demais parentes que sempre estão na arquibancada da vida, torcendo por mim;

Aos amigos Fernanda e Fábio, por estarem sempre presentes e pela infinita amizade;

Às famílias Ludovico Mastria, Miquilini da Silva que sempre estiveram dispostos a me ouvir e me aconselhar;

Ao meu pastor Reverendo Ezequiel Ozanan dos Santos, por estar sempre presente nas minhas conquistas;

Aos meus amigos Celi e Milton, que com um simples sorriso e um abraço sempre alegraram meus finais de semana;

A todos os membros do Coral e do Departamento Infantil que durante todo o tempo estiveram comigo, me abençoando e me ensinando como viver na dependência de Deus;

A todos os amigos e colegas que fiz na UNESP-FMVZ e também na cidade de Botucatu – SP. Não vou citar nomes, por medo de não ser justa e esquecer de alguém, mas, aqui deixo meu muito obrigado de coração, pela amizade, confiança e gratidão;

A todos os que contribuíram com esse  
trabalho...

Aos que também de alguma forma  
contribuíram com o meu crescimento profissional...

MUITO OBRIGADA

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>VI</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2. Resistência dos bovinos ao carrapato	8
2.2.1 Resistência entre raças	8
2.2.2 Resistência imunológica	10
2.3. As raças	12
2.3.1. A raça Nelore	12
2.3.2 A raça Aberdeen Angus	14
2.4. Genômica Funcional	15
2.4.1. Microarrays	15
<b>III OBJETIVO</b>	<b>19</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1. Animais	20
4.2.Obtenção das larvas de <i>R. (B.) microplus</i> e infestações	21
4.3.Colheita e armazenamento das amostras de linfonodos	22
4.4.Escolha das amostras utilizadas para extração de RNA total	23
4.5.Extração de RNA total das amostras de lifonodo	23
4.5.1.Quantificação e verificação da qualidade dos RNAs extraídos	24
4.6.Síntese e marcação do cDNA para as Híbridizações	29
4.7.Híbridização das amostras	30

4.7.1.Hibridização das lâminas de microarray com cDNAs marcados com fluoróforos	31
4.8. Normalização e Análise Estatística dos dados de microarray	32
4.9. Validação dos dados de microarray	33
4.9.1.Síntese de cDNA para técnica de PCR em tempo real	33
4.9.2. Reação de PCR em tempo real	34
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
5.1. Infestações	35
5.2. Resultados da análise da expressão gênica por “microarrays”	36
5.3. Categorização dos genes	40
5.4. Resultados do PCR em tempo real	49
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>VII. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>55</b>
<b>VIII. ANEXO</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Imagem de um carrapato macho de <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> (A) e de uma fêmea ingurgitada ainda na pelagem do hospedeiro (B) (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM).....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> . <b>Fase parasitária:</b> 1- larva infectante realizando a fixação no bovino; 2- ninfa; 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento. <b>Fase de vida livre:</b> 4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5- ovos, no solo, em período de incubação; 6- larva, no solo, em período de incubação.....	<b>5</b>
<b>Figura 3</b> – Exemplo de macho da Raça Nelore (A) e de uma fêmea (B).....	<b>13</b>
<b>Figura 4</b> – Exemplo de macho da Raça Angus (A) e de uma fêmea com bezerro(B).....	<b>14</b>
<b>Figura 5</b> – Imagem de uma lâmina de <i>microarray</i> com alguns “spots” no centro.....	<b>16</b>
<b>Figura 6</b> – Esquema de hibridização dos <i>microarrays</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 7</b> -Organograma da seleção das amostras utilizadas no experimento.....	<b>23</b>
<b>Figura 8</b> – Eletroforese para verificação da integridade do RNA total. A - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Angus (Tratamento e Controle) B - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Nelore (Tratamento) C - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Nelore (Controle).....	<b>26</b>
<b>Figura 9</b> – Eletroforese no Lab-on-a-Chip Agilent 2100 Bioanalyzer.....	<b>27</b>
<b>Figura 10</b> – Gel virtual gerado no Bioanalyzer, marcando as bandas 28S e 18S.....	<b>28</b>

<b>Figura 11</b> – Eletroferograma de um RNA que foi considerado de boa qualidade.....	<b>28</b>
<b>Figura 12.</b> Validação da infestação em animais da Raça Nelore (A) e em animais da Raça Angus.....	<b>35</b>
<b>Figura 13.</b> Análise por <i>Hierarchical clustering</i> (Sanchez-Carbayo <i>et al.</i> , 2002) de genes diferencialmente expressos no grupo controle (A) e no grupo tratado (B) nos bovinos da raça Angus. Os blocos em verde indicam genes altamente expressos no tecido; em vermelho, aqueles de baixa expressão.....	<b>37</b>
<b>Figura 14.</b> Análise por <i>Hierarchical clustering</i> (Sanchez-Carbayo <i>et al.</i> , 2002) de genes diferencialmente expressos nos bovinos da raça Nelore. Os blocos em verde indicam genes altamente expressos no tecido; em vermelho, aqueles de baixa expressão. Os animais N04, N02, N14, N09, N03 fazem parte dos animais do grupo controle e o restante do grupo tratado.....	<b>38</b>
<b>Figura 15.</b> Análise da expressão gênica da citocina IL-12p40 em linfonodos de bovinos da Raça Angus da Raça Nelore, onde NC corresponde aos bovinos da Raça Nelore que não foram infestados, NT aos bovinos da Raça Nelore que foram infestados, AC que corresponde aos bovinos da Raça Angus que não foram infestados e AT aos bovinos da Raça Angus que foram infestados.....	<b>50</b>
<b>Figura 16.</b> Análise da expressão gênica da citocina IL-5 em linfonodos de bovinos da Raça Angus da Raça Nelore, onde NC corresponde aos bovinos da Raça Nelore que não foram infestados, NT aos bovinos da Raça Nelore que foram infestados, AC que corresponde aos bovinos da Raça Angus que não foram infestados e AT aos bovinos da Raça Angus que foram infestados.....	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Concentração de RNA (animais da Raça Angus) extraído com o kit Micro-to-Midi (Invitrogen) quantificado em NanoDrop.....	<b>25</b>
<b>Tabela 02</b> – Concentração de RNA (animais da Raça Nelore) extraído com o kit Micro-to-Midi (Invitrogen) quantificado em NanoDrop.....	<b>25</b>
<b>Tabela 3</b> – Distribuição dos animais das raças Angus e Nelore, conforme o score atribuído 21 dias após a infestação.....	<b>36</b>
<b>Tabela 04</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Processo Biológico.....	<b>40</b>
<b>Tabela 05</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Função Molecular.....	<b>42</b>
<b>Tabela 06</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Componente Celular.....	<b>43</b>
<b>Tabela 07</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Processo Biológico.....	<b>43</b>
<b>Tabela 08</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Função Molecular.....	<b>44</b>
<b>Tabela 09</b> – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Componente Celular.....	<b>45</b>
<b>Tabela 10</b> – Expressão de Moléculas CD encontradas na Raça Angus (Extraído de: JANEWAY <i>et al.</i> , 2002).....	<b>47</b>
<b>Tabela 11</b> – Expressão de Moléculas CD encontradas na Raça Nelore (Extraído de: JANEWAY <i>et al.</i> , 2002).....	<b>48</b>

## PROSPECÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA AO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* EM BOVINOS DE CORTE

**RESUMO** - Os prejuízos causados à pecuária brasileira pelo carrapato (*Rhipicephalus (B.) microplus*) são significativos e, uma das estratégias utilizadas para aumentar a produtividade dos rebanhos nas regiões tropicais tem sido a utilização de raças mais resistentes a esse ectoparasita. O objetivo desse projeto foi aplicar a tecnologia de microarray de DNA para a prospecção de genes relacionados com os mecanismos de resistência/tolerância ao carrapato, mediante a análise da expressão gênica diferencial em linfonodos de bovinos suscetíveis (Aberdeen Angus) e resistentes (Nelore) infestados artificialmente com este parasita. Os bezerros foram mantidos livres de carrapato desde o nascimento e foram infestados artificialmente com larvas de carrapato aos quatro meses de idade. As biópsias de linfonodo foram realizadas antes e após a infestação e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento. Essas amostras foram submetidas a extração de RNA, síntese de cDNA e marcação. Depois elas foram submetidas a hibridização pela técnica de microarray. Foram identificados 341 genes diferencialmente expressos nos bovinos da Raça Angus e 254 para bovinos da Raça Nelore, os quais foram agrupados em categorias funcionais. Foram identificadas diferenças no padrão de expressão de genes de resposta imune entre as raças, tais como: Moléculas CD, Imunoglobulinas, Fator de Necrose tumoral, Integrinas e Interferon- $\gamma$ . Para validação dos resultados de expressão diferencial foi empregada a técnica de PCR em tempo real, onde se verificou a expressão dos genes das citocinas IL-5 e IL12p40 nas duas Raças estudadas.

**Palavras-Chave:** Expressão Gênica, Gado de Corte, *Microarray*, PCR em tempo real, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## **PROSPECTION OF GENES RELATED TO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* RESISTANCE IN BEEF CATTLE**

**SUMMARY** – Significant losses are brought by ticks (*Rhipicephalus (B.) microplus*) to Brazilian beef farming. One of the strategies to increase yield in tropical regions is the use of resistant breeds. This study was undertaken to apply the DNA microarray technology for the prospection of genes related to tick resistance/tolerance mechanisms, through differential gene expression analysis in lymphonodes of susceptible (Aberdeen Angus) and resistant (Nelore) breeds artificially infested with the parasite. Calves were kept tick-free since birth and infested with tick larvae when they reached four months of age. Lymphonode biopsies were performed before and after infestation and kept at -80°C until analyses. Samples were subjected to RNA extraction, cDNA synthesis and labelling. Hybridization was then performed through the microarray technique. In Angus, 341 differentially expressed genes were found against 254 in Nelore, which were grouped in functional categories. Different expression patterns were identified immune response genes between breeds, such as: CD molecules, Immunoglobulines, Tumor Necrosis Factor, Integrins and Interferon- $\gamma$ . Real-time PCR was used to validate results, which showed the expression of cytokines IL-5 and IL12p40 in both breeds.

**Key words:** Microarray, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Beef Cattle, Real-Time PCR

## I. INTRODUÇÃO

Em regiões de clima tropical, a exploração comercial de bovinos depende, entre outros fatores, do potencial de produção dos animais e da sua capacidade de adaptação ao ambiente. Cerca de um bilhão de bovinos, sendo a grande maioria criada nas regiões de clima tropical, estão sujeitos a sofrerem infestações por carrapatos e doenças transmitidas por eles (PEGRAM et al., 1993). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ocorre em uma ampla faixa, situada entre os paralelos 32 N e 32 S, sendo que quase todo o território do Brasil está inserido na área de distribuição desse carrapato (OLIVEIRA-SEQUEIRA & AMARANTE, 2002). Esses parasitos atuam nos hospedeiros provocando principalmente anemia, imunossupressão, redução na ingestão de alimentos, alterações no número de células brancas do sangue e da concentração de proteínas como globulinas e albumina (JONSSON, 2006). Atualmente o método de controle desse parasita mais utilizado, é aquele baseado na aplicação de produtos químicos. O uso de carrapaticidas tem vários inconvenientes, como os altos custos para os produtores, a iminente resistência dos carrapatos às drogas mais utilizadas e a possível ocorrência de resíduos na carne e no ambiente (JONSSON et al., 2007., JONSSON & HOPE, 2007., RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2007). Devido aos grandes prejuízos provocados pelos carrapatos e todas as dificuldades encontradas para o seu adequado controle, existe a necessidade da pesquisa de novos métodos alternativos.

Foi verificado que animais puros *Bos indicus* apresentam maior resistência ao carrapato *R. (B.) microplus*, quando comparado a animais puros *Bos taurus*, e que animais cruzados *Bos taurus X Bos indicus*, apresentam resistência

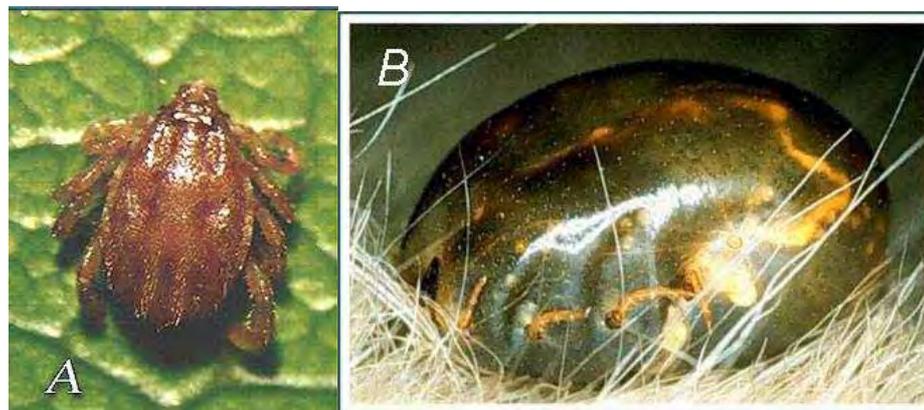
intermediária (SUTHERST and UTECH, 1981., WHEARTHON et al., 1978a). A criação de animais zebuínos ou produtos de cruzamentos com raça taurinas, em regiões tropicais, tem sido uma opção para os produtores, a fim de reduzir os prejuízos gerados pelos carrapatos. Segundo FRISCH et al. (2000), uma alternativa viável para se contornar todos os problemas provocados pelo parasitismo pelo carrapato, seria a seleção de animais geneticamente resistentes e a introdução de genes principais relacionados a resistência a esses ectoparasitos. No entanto, esses genes não são ainda conhecidos. Por isso, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de identificar genes relacionados à resistência e suscetibilidade ao carrapato *R. (Boophilus) microplus*, utilizando animais puros *B.taurus* (Angus) que são suscetíveis a esse parasito e animais puros *B. indicus* (Nelore), que apresentam maior resistência a infestações por esses carrapatos.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

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

O *R. (B.) microplus* é um carrapato originário da Ásia e foi introduzido no Brasil juntamente com os bovinos trazidos pelos colonizadores portugueses, ainda no século XVI (LABRUNA et al., 1997). Atualmente ele se distribui amplamente entre os paralelos 32° N e 32° S, região que apresenta climas mais apropriados ao seu desenvolvimento (GONZALES, 1993). O único país da América do Sul livre desse carrapato é o Chile. Praticamente todo o território brasileiro está dentro da zona de ocorrência desse parasito e de acordo com as informações disponíveis sobre a dinâmica das populações desse ácaro na Região Sudeste do Brasil, o parasitismo ocorre ao longo de todo o ano (FONSECA et al., 1997).

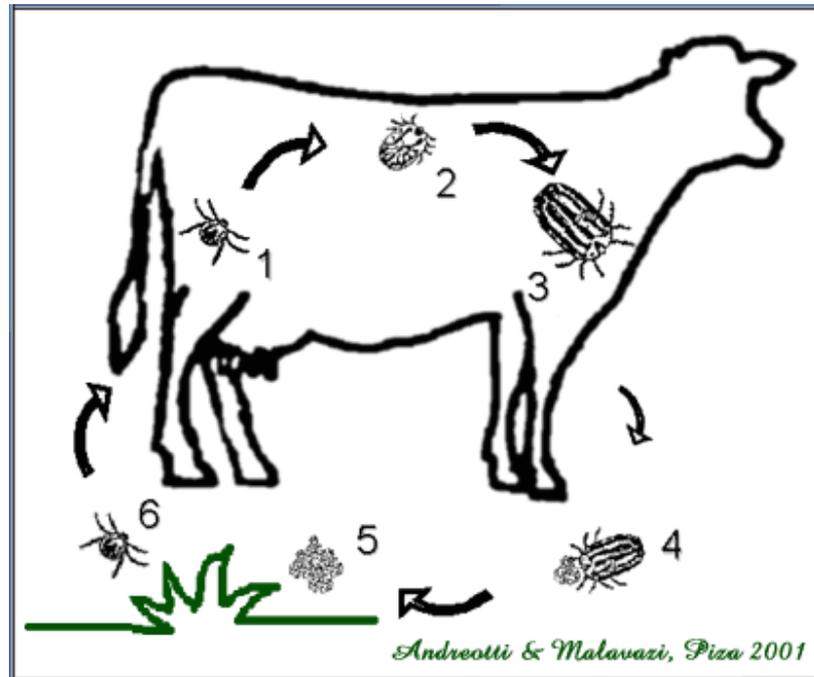
O carrapato *R. (B.) microplus* é um artrópode da classe Arachnida, ordem Acarina, família Ixodidae (**Figura 1**). Esses ácaros caracterizam-se por não apresentarem segmentação corporal e por possuírem três pares de patas quando larvas e quatro quando ninfas e adultos, sendo hematófagos obrigatórios. No Brasil esse carrapato é um importante vetor de doenças, sendo responsável pela transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a rickettsia *Anaplasma marginale*, causadores da Tristeza Parasitária Bovina.



**Figura 1** – Imagem de um carrapato macho de *Rhipicephalus (B.) microplus* (A) e de uma fêmea ingurgitada ainda na pelagem do hospedeiro (B) (extraído de: Sequeira e Amarante, 2002, CD-ROM)

O carrapato *R. (B.) microplus* apresenta uma fase de vida livre e outra fase de vida parasitária (**Figura 2**). Seu ciclo pode durar entre 45 e 50 dias, dependendo das condições do ambiente (umidade acima de 70% e temperatura em torno de 27°C são as condições ideais para o seu desenvolvimento). A fase de vida livre se inicia logo após o desprendimento da teleógina do animal, quando ela cai no solo para fazer a postura. Cada fêmea transforma cerca de 60% de sua massa corporal em ovos e chega a produzir 3.000 ovos. O período de pré-postura dura aproximadamente três dias, dependendo das condições climáticas.

A postura não ocorre em temperaturas abaixo de 15°C. Em condições ótimas de temperatura (27°C) o período de postura é de cerca de 15 dias. O período de incubação dos ovos também é dependente da temperatura e dura cerca de 14 dias a 36°C. Após a eclosão das larvas, estas permanecem na vegetação até encontrar o hospedeiro. A longevidade das larvas nas pastagens pode chegar a 6 meses (OLIVEIRA-SEQUEIRA & AMARANTE, 2002). As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação onde podem localizar o hospedeiro pelo odor ou vibrações (OLSEN, 1974). O início da fase de vida parasitária se dá quando as larvas se fixarem no hospedeiro.



**Figura 2.** Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*. **Fase parasitária:** 1- larva infectante realizando a fixação no bovino; 2- ninfa; 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento. **Fase de vida livre:** 4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo; 5- ovos, no solo, em período de incubação; 6- larva, no solo, em período de incubação.

Elas se fixam em regiões corporais propícias para seu desenvolvimento, tais como posterior da coxa, perineal e perivulvar. Após sua fixação ocorre a muda e transformam-se em metalarvas, ninfas e metaninfas em aproximadamente 13 dias. Na fase de ninfa ocorre a diferenciação sexual: os machos jovens são chamados neandros e ao atingirem a maturidade sexual, gonandros (14° dia). As fêmeas jovens são denominadas neóginas, e ao se tornarem maduras sexualmente, partenógenas. Nessa fase, ocorre a fecundação das fêmeas, ao redor do 18° dia. A teleógina é a fêmea já ingurgitada de sangue, que cai nos pastos para fazer a postura ao redor do 21° dia (GONZALES,1974).

A ocorrência de infestações de *R. (B.) microplus* nos rebanhos bovinos em regiões tropicais tem causado grandes prejuízos à pecuária de corte. Uma fêmea

de carrapato pode aumentar 200 vezes o seu tamanho pela ingestão de sangue do hospedeiro (JONSSON, 2006). Os maiores prejuízos ocorrem em razão da transmissão de agentes da Tristeza Parasitária Bovina, principalmente em animais de raças européias (GUGLIEMONE, 1995; GONÇALVES et al., 1999).

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais de bovinos do mundo, cerca de 170 milhões de cabeças, sendo aproximadamente 140 milhões exploradas para a produção de carne e 30 milhões para a produção de leite (MARTINEZ et al., 2004). Segundo dados do IPEADATA (2004), a agropecuária representou 9,1% do PIB total do país em 2003, empregando 19% do pessoal ocupado (trabalhadores com registro em carteira), mostrando a importância desta atividade no cenário socioeconômico do país.

As infestações por ectoparasitos são responsáveis por perda produtiva da ordem de 26 milhões de arrobas de carne/ano (MARTINEZ et al., 2004). Outro prejuízo causado pelas infestações de carrapatos e bernes em bovinos, diz respeito aos danos causados ao couro, sendo que somente 8% do couro produzido no Brasil sejam de primeira qualidade, o que diminui seu valor (TUNIN, 2004). O carrapato, ao se fixar no corpo do animal, produz um pequeno orifício na pele, pelo qual inocula saliva, com a função de evitar a coagulação do sangue, introduzindo ao mesmo tempo outras substâncias estranhas ao organismo do hospedeiro. No local onde o couro foi lesionado são produzidas cicatrizes irreversíveis (SUTHERST et al., 1983; OLIVEIRA., 1983). Na tentativa de se prevenir contra as perdas causadas pelos ectoparasitos, estima-se que no Brasil sejam gastos em torno de R\$ 800 milhões em parasiticidas por ano, segundo dados da EMBRAPA – Gado de Leite (MARTINEZ et al., 2004).

Existem vários estudos relacionados a cálculos de perdas na produção de bovinos, ocasionados pelas infestações por carrapatos. No México estimou-se que a infestação por carrapatos, ocasione redução de, aproximadamente 48% na produção de leite e perda de 40 à 50 kg de peso durante a vida produtiva em novilhos (BELTRAN, 1977). Em Cuba, foi verificada perda de 182 litros de leite por lactação e queda de 20% no índice de natalidade (CORDOVÉS, 1996). Na

Austrália, FRISCH et al. (2000) estimaram que a média da perda de peso por ano de um animal de 12 a 18 meses de idade e com carga parasitária de 40 carrapatos/dia seria equivalente a 20 Kg.

No Brasil, HORN (1983) estimou que o carrapato pode causar perdas anuais da ordem de um bilhão de dólares, em virtude da desvalorização do couro, desgaste nos animais, estresse pelo manejo adotado para o seu controle, intoxicação pelos antiparasitários, redução da taxa de natalidade, custos quimioterápicos, de instalações e de mão-de-obra e transmissão dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina.

No Brasil, o principal método de controle de carrapatos é feito pelo uso de substâncias acaricidas. Porém, o uso contínuo desses acaricidas tem promovido o aparecimento de carrapatos resistentes e, desta maneira, mesmo com o desenvolvimento de novas substâncias químicas de ação acaricida, novas cepas de carrapatos resistentes aparecem, se transformando num ciclo vicioso (MARTINEZ et al.,2004a)

O uso de acaricidas não é um método economicamente viável de prevenção e controle de carrapatos (PEGRAM et al, 1991). Assim o desenvolvimento de novas opções de prevenção deste ectoparasito se faz necessária e a procura por bovinos que sejam resistentes a este parasito é uma alternativa nessa busca por menores prejuízos (TUNIN, 2004).

Segundo MARTINEZ et al (2004a), um bovino infestado por carrapatos e parasitado por vermes, se não for tratado, pode sofrer perdas de 18 a 47 kg de peso/ano. Segundo esse, um animal pode morrer devido à infestação se estiver parasitado por mais de 200 carrapatos por um período de seis semanas.

Os problemas causados pela infestação variam de acordo com a idade do animal, o nível de infestação e se o parasito em questão está atuando como vetor para outras enfermidades (TUNIN, 2004). Um bovino, apresente um grande números de parasitos, pode apresentar uma anemia leve a moderada e morte. Os carrapatos acarretam um aumento na taxa de morbidade e mortalidade durante o período de seca, onde as infestações tendem a ser maiores, além de retardar os

resultados de terminação de animais que se destinarão à venda (TUNIN, 2004). Porém o que mais preocupa em relação ao carrapato é sua atuação como vetor de outras enfermidades sanguíneas como a babesiose, anaplasmosose e a brucelose (RADOSTITS et al, 2000).

Assim, tornam-se bastante compreensíveis e desejáveis que os esforços para que se encontre uma forma eficaz e economicamente viável de controle de carrapatos na bovinocultura brasileira (TUNIN, 2004). Buscando um aumento na produtividade de nosso rebanho e diminuição nos gastos com produtos químicos que além de caros, deixam resíduos indesejáveis no animal e no ambiente.

## **2.2. Resistência dos bovinos ao carrapato**

### **2.2.1 Resistência entre raças**

De acordo com MARQUES (1969), os animais *B. indicus* apresentam alta capacidade de tolerância ao calor tropical e de resistência aos ecto e endoparasitos. Esses animais apresentam pêlos curtos e lisos que favorecem a eliminação do calor, e desenvolvimento corporal mais lento que as raças européias. Já o gado *B. taurus* apresentam características muito diferentes daquelas observadas em gado zebuino: baixa capacidade de tolerância ao calor tropical quando exposto à radiação solar intensa, baixa capacidade de resistência aos ecto e endoparasitos; mais exigente quanto às pastagens e seu valor nutritivo; não pasta nas horas de muito sol, preferindo abrigar-se nas sombras; menor período de gestação (280 dias); pele geralmente espessa, esticada, e coberta de longos pêlos; aparelho digestivo com maior capacidade; membros curtos e com boa cobertura muscular, não resistindo às grandes caminhadas; crescimento rápido, chegando ao abate em idade bastante jovem.

HANSEN (2004) verificou que a maioria das adaptações dos zebuínos ao clima tropical ocorre tanto ao nível fisiológico quanto ao celular. A habilidade superior desses animais de manter a temperatura corporal mesmo durante períodos de stress térmico é o resultado de taxas metabólicas mais baixas, assim como maior capacidade de dissipar calor, seja por possuírem glândulas sudoríparas maiores, ou mesmo por terem pelagem com propriedades que maximizam a condutividade de calor e minimizem a absorção de radiação solar.

Existe uma marcada diferença entre *B. indicus* e *B. taurus* em relação a resistência ao carrapato (UTECH 1978, THIESEN 1979, OLIVEIRA et al. 1989, OLIVEIRA & ALENCAR 1990, PENNA 1990, TEODORO et al. 1994, WAMBURA 1998, TEODORO et al. 2004). No entanto, variações entre raças e dentro de raças também são observadas. De acordo com THIESEN (1979) e LEMOS (1986), o gado indiano tem convivido há milhares de anos com o carrapato *Rhiphicephalus (B) microplus* ocorrendo, provavelmente, uma eliminação natural dos animais mais sensíveis, o que permitiu maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes.

TEODORO et al. (1994) verificaram que animais *B. taurus* da raça Jersey apresentaram menos carrapatos em relação às outras raças taurinas. Os animais *Bos indicus* convivem há milhares de anos com o carrapato *R. (B.) microplus*, e uma teoria é que os animais muito sensíveis tenham sido eliminados naturalmente, tendo persistido somente aqueles mais resistentes (TEODORO et al., 2004).

FRISCH & O'NEILL (1989), na Austrália, compararam a resistência de diversas raças *B. indicus* e *B. taurus* puros e seus cruzamentos. Eles classificaram as raças em ordem decrescente de resistência, e o resultado foi: gado zebu indiano e africano, animais cruzados, *B. taurus* africano e, por último, *B. taurus* de origem européia. Em animais cruzados geralmente quanto maior a proporção de *B. indicus* no mestiço, maior sua resistência aos parasitos (WAMBURA et al., 1998). No Brasil, VERÍSSIMO et al. (1997), estudando bovinos das raças Holandesa e Gir, bem como seus mestiços, observaram diferenças significativas na infestação

por carrapatos nesses animais, sendo a raça Holandesa a mais susceptível, e a Gir a mais resistente.

VILARES (1941) verificou a maior resistência do Zebu ao comparar o número de carrapatos encontrados em bovinos de diversas raças. Neste estudo foi observado que apenas 5% do total de carrapatos encontrados eram provenientes de animais Zebu, 7% de raças nacionais ou crioulas e 88% de raças européias e que havia também diferença na resistência entre as raças indianas, sendo a Nelore mais resistente que a Gir e a Guzerá. Por outro lado, o gado europeu é menos resistente ao carrapato, provavelmente devido ao pouco contato com este parasita, mas existem raças com diferentes níveis de resistência. De acordo com RIEK (1956) e UTECH et al. (1978), a raça Jersey é mais resistente do que outras raças européias.

As diferenças de resistência entre os *Bos taurus* e os cruzamentos *B. taurus* x *B. indicus* foram demonstrados por BYFORD et al. (1976) que observaram nos animais oriundos do cruzamento, em geral, uma resistência moderada alta. promissora.

Em bovinos, vários estudos (TEODORO *et al.* 1984, MADALENA *et al.* 1985, CARDOSO 2000, FRAGA *et al.* 2003) demonstraram que a herdabilidade da característica resistência ao carrapato é baixa a moderada, variando entre 0,15 e 0,49. ANDRADE (1996) observou que a herdabilidade para resistência ao carrapato possui variação genética aditiva, indicando que há possibilidade de avanço genético da população para a característica em questão.

### **2.2.2 Resistência imunológica**

A origem da resistência ao carrapato é um fenômeno pouco conhecido, apesar do grande número de trabalhos enfocando principalmente os aspectos imunológicos ligados ao hospedeiro. De acordo com RIEK (1962) os mecanismos de resistência aos carrapatos podem ser classificados em resistência inata e

adquirida. Os mecanismos de resistência inata são aqueles característicos da espécie animal e que já estão presentes no hospedeiro quando ocorre a primeira infestação. Os principais mecanismos envolvidos na imunidade inata são: as barreiras físicas e químicas representadas pelos tecidos e substâncias produzidas por eles, certas células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos e as células conhecidas como “Natural Killer” (NK), por eliminarem antígenos sem informação prévia do sistema imune; proteínas do sistema de complemento do soro, mediadores de inflamação e citocinas (TIZARD, 1998. ABBAS et al., 2000).

A imunidade adquirida é aquela que resulta do contato entre o parasita e o hospedeiro. Ela pode ser dividida em imunidade humoral e celular (TIZARD, 1998). Os linfócitos B produzem proteínas denominadas imunoglobulinas ou anticorpos, que são responsáveis pela imunidade humoral. Essas proteínas são especializadas na promoção de inúmeros mecanismos moleculares ligados a imunidade como: fagocitose, liberação de substâncias mediadoras da resposta inflamatória e fixação das proteínas do sistema de complemento. Os linfócitos T (CD4 e CD8) são as células efetoras da imunidade celular e a resposta dessas células a antígenos específicos, pode desencadear a produção de anticorpos ou a sensibilização de outros tipos celulares especializados na resposta imune.

A resistência adquirida ao carrapato envolve numerosos componentes reguladores e efetores do sistema imune, tais como as células de Langerhans que detectam antígenos na epiderme, proteínas do sistema de complemento, linfócitos T e B, citocinas, anticorpos, granulócitos e mediadores bio-ativos derivados desses últimos, como a histamina (WIKEL, 1996; BROSSARD, 1997). Os linfócitos T são considerados importantes reguladores e efetores da resposta imune do hospedeiro ao carrapato. A análise imunofenotípica dos infiltrados de linfócitos presentes nos sítios de ligação dos carrapatos revelaram uma predominância de células do tipo CD4 sobre as CD8, sendo que essa relação aumentou durante a segunda e terceira infestações. Linfócitos B não são encontrados na pele de animais infestados ou controles não infestados por carrapatos (MBOW et al., 1994). As análises dos infiltrados celulares contidos em pele de animais infestados pelo

carrapato *Ixodes ricinus* foram positivas para mRNAs de interleucina-4 (IL-4) e interferon gama nas primeiras 72 horas. Durante infestações sucessivas foram observadas expressões de IL-4, IL-2 e interferon gama (GANAPAMO et al., 1995). Alguns autores têm relatado que carrapatos que se alimentam em animais imunes, sofrem redução do número total de ovos produzidos, redução da viabilidade dos ovos e morte (TIZARD, 1998; WIKEL, 1999). Por outro lado, a saliva dos Ixodidae produz uma grande quantidade de substâncias imunomoduladoras, de modo a debelar a defesa do hospedeiro (ANGUITA et al., 2002; HANNIER et al., 2003).

O entendimento das bases moleculares das estratégias utilizadas pelos carrapatos para evasão sistema imune do hospedeiro, e os mecanismos imunológicos que levam à proteção do hospedeiro, devem abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de vacinas ou produtos alternativos para controlar os ectoparasitos.

### **2.3. As raças**

#### **2.3.1. A raça Nelore**

Os zebuínos (*Bos taurus indicus*), introduzidos no Brasil, no século passado, foram largamente utilizados em cruzamentos absorventes nos rebanhos de gado Crioulo no País. Atualmente a raça Nelore é a mais difundida no Brasil, sendo ela aproximadamente 53% do rebanho nacional (**Figura 3**). Essa raça se expandiu lentamente no país, primeiro no Rio de Janeiro e na Bahia, depois em Minas Gerais e por último em São Paulo. Em 1938, com a criação do Registro Genealógico, começaram a ser definidas as características raciais do gado Nelore (SANTIAGO, 1970). É uma raça que se adaptou muito bem às condições tropicais brasileiras, por possuir excelente capacidade de aproveitar alimentos grosseiros.



**Figura 3** – Exemplo de macho da Raça Nelore (A) e de uma fêmea (B)

Apresenta resistência natural a parasitos, devido às características de seus pêlos, que impedem ou dificultam a penetração de pequenos insetos na superfície da pele ou que aí tentam se fixar. A pele escura, fina e resistente, dificulta a ação de insetos sugadores, além de produzir secreção oleosa repelente, que se intensifica quando os animais estão expostos ao calor. As características de seus pêlos também facilitam o processo de troca com o ambiente. Além disso, o trato digestivo é 10% menor em relação aos europeus. Portanto seu metabolismo é mais baixo e gera menor quantidade de calor. Os machos e as fêmeas apresentam elevada longevidade reprodutiva. Touros da Raça Nelore possuem instinto muito forte de proteção de seu harém de matrizes. As vacas apresentam facilidade de parto, por terem garupa com boa angulosidade, boa abertura pélvica e, principalmente, por produzir bezerros pequenos, o que elimina a incidência de distocia. Outras características das fêmeas são a excelente habilidade materna, oferecendo condições de desenvolvimento aos bezerros até o desmame, instinto de proteção ao bezerro, rusticidade, e baixo custo de manutenção. Os bezerros Nelore são espertos. Logo após o parto, já procuram as mães para fazer a mamada do colostro, que lhes fornece imunidade nos primeiros 30 dias de vida. (<http://www.nelore.org.br/Default3.asp>)

### 2.3.2 A raça Aberdeen Angus

A raça Aberdeen Angus tem sua origem na Escócia e seu nome foi tomado dos condados onde começou o seu desenvolvimento: Aberdeen e Angus. A história registra a existência dos "vacuns mochos pretos", no condado de Angus, antes do século XVI e sua origem é tão remota que não é possível precisar como e quando apareceram. Já naquela época tornaram-se famosos pela excelente qualidade de carne, rapidez de engorde e singular rusticidade (**Figura 4**).



**Figura 4** – Exemplo de macho da Raça Angus (A) e de uma fêmea com bezerro(B)

A "raça da vaca mãe", como hoje é popularmente conhecida por sua grande habilidade materna, tem seus principais centros criatórios estabelecidos nos Estados Unidos, Canadá, Argentina, Austrália, Inglaterra e Nova Zelândia, estando, porém, espalhada por todo o mundo. A raça tem como características fundamentais a precocidade, a fertilidade e a qualidade da carne. Influenciada pelo desenvolvimento atingido nos países do Prata, a raça Angus se expandiu rapidamente no Rio Grande do Sul, como demonstram os registros PO e PPC, e o sucesso da comercialização de reprodutores machos e fêmeas. Atualmente é acentuado o crescimento do Angus em vários Estados brasileiros por ser uma raça de predados ímpares: fertilidade, longevidade, precocidade, rusticidade, facilidade de parto e, em especial, qualidade de carne. Há grande procura de

reprodutores Angus para formação de plantéis PO, para rebanhos puros por cruzamento (<http://www.angus.org.br/raca/apresentacao.php>)

#### **2.4. Genômica Funcional**

Genômica funcional é a vertente da genômica cujo foco está voltado para a elucidação das funções que cada gene exerce no organismo e, ao mesmo tempo, como esses genes interagem entre si dentro das “redes” biológicas que controlam as características fenotípicas (MUTCH, et al., 2005). As duas abordagens mais utilizadas nesse campo de estudo têm sido a análise do perfil global da expressão gênica (transcriptoma) e a análise sistemática das proteínas (proteoma).

Dentre as metodologias utilizadas nos estudos do transcriptoma, a mais difundida é a análise da expressão gênica por microarrays, uma vez que permite a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos, provenientes de indivíduos que foram submetidos a condições contrastantes ou que se encontram em diferentes estágios do desenvolvimento (SCHENA et al., 1995).

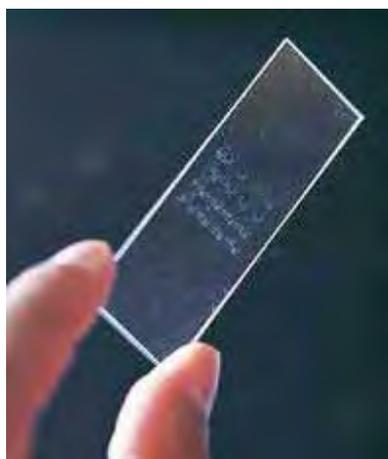
##### **2.4.1. Microarrays**

Nos últimos anos inúmeras técnicas de biologia molecular foram descobertas e hoje nos permitem estudar alguns genes de interesse isoladamente ou em determinadas situações, decifrando suas funções dentro dos sistemas biológicos e ainda entender a interação genótipo\ambiente, que são responsáveis pela diversidade fenotípica.

A tecnologia de microarrays, ou microarranjos de DNA, possibilita a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos de um determinado organismo, e em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais (ROSA, et al, 2007). Devido seu caráter prospectivo, essa

tecnologia tem sido largamente utilizada em experimentos de genômica funcional projetados para estudar as funções e as interações dos genes dentro do contexto global do genoma de diversas espécies animais e vegetais (ROSA, et al, 2007)

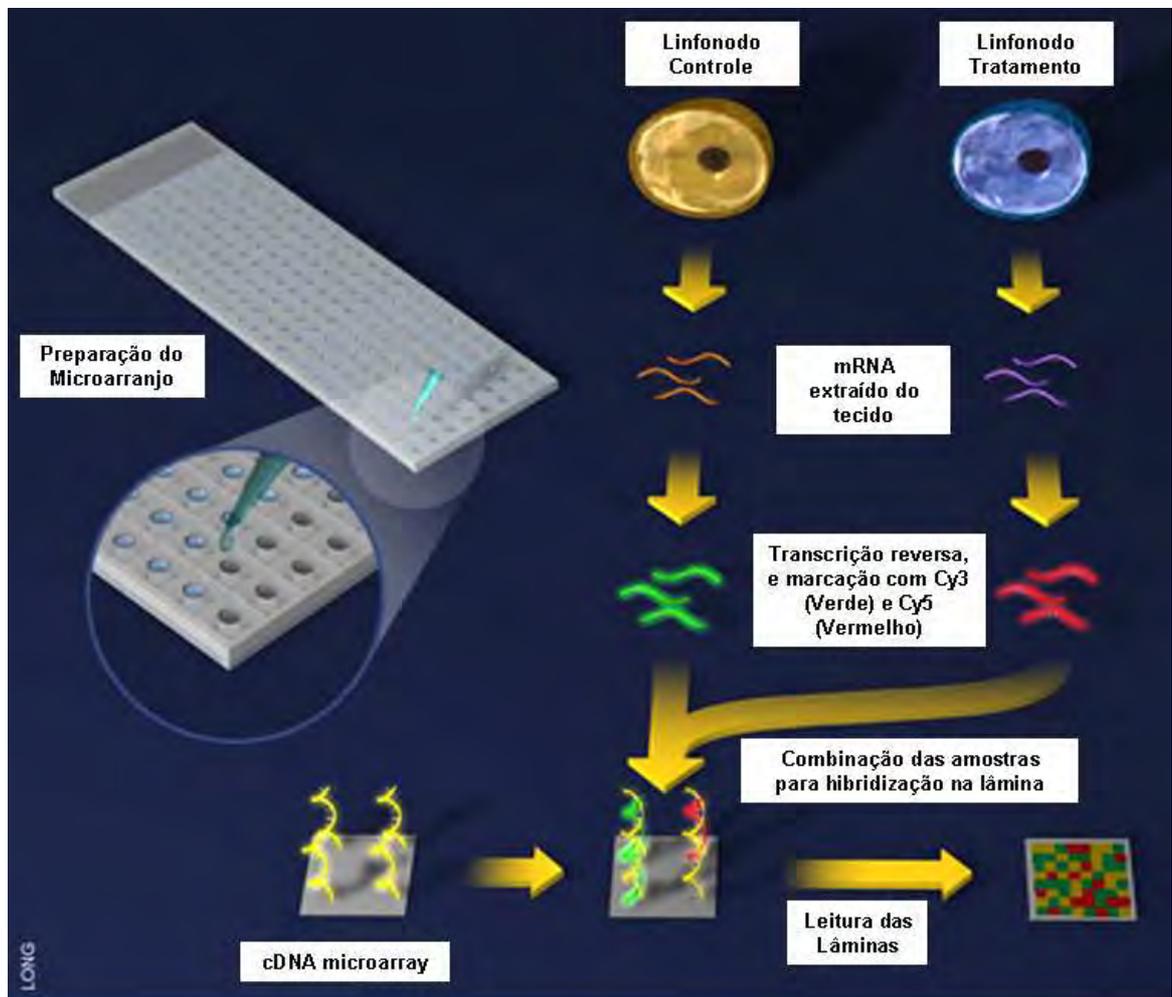
A técnica de *microarrays* consiste na utilização de um slide (lâmina ou microarranjo) no qual as sondas (amostras de DNA) foram imobilizadas em quantidades e em posições precisamente definidas (spots) através de um equipamento automatizado (**Figura 5**). As fontes de DNA mais comumente utilizadas como sondas são os produtos de PCR amplificados de cDNAs ou oligonucleotídeos sintetizados a partir de seqüências depositadas no GenBank (FURLAN, et al, 2007).



**Figura 5** – Imagem de uma lâmina de *microarray* com alguns “spots” no centro

Paralelamente, duas populações de mRNA obtidas em condições experimentais distintas são submetidas a reações de transcrição reversa na presença de citosinas ou uracilas contendo diferentes fluorocromos fotossensíveis (**Figura 6**), Cy3 (emissão de fluorescência verde) e Cy5 (emissão de fluorescência vermelha), de forma a marcar diferencialmente cada população de cDNA gerada (HEDGE et al, 2000). Estes alvos são então misturados e hibridizados contra as seqüências complementares depositadas na lâmina, permitindo inferir a abundância relativa de transcritos em cada um dos tratamentos realizados

(SCHENA et al, 1996). As lâminas são expostas a raios laser para excitação dos fluoróforos, fazendo com que estes emitam luz (fluorescência).



**Figura 6** – Esquema de hibridização dos *microarrays*

Quanto maior a expressão de um determinado gene, maior será a quantidade de alvos marcados com o fluoróforo e, conseqüentemente, maior será a intensidade da fluorescência do complexo alvo-sonda após a hibridização (HIENDLEDER et al., 2005). Após o processamento das imagens é possível aplicar ferramentas computacionais para extrair informações sobre o padrão de expressão de cada gene sob as condições experimentais amostradas, a partir da razão entre

a emissão de fluorescência verde ou vermelha observada em cada posição na lâmina (KERR & CHURCHILL, 2001). Os Microarranjos de DNA podem revelar a alteração na expressão gênica decorrente da inibição ou superexpressão de alguns fatores regulatórios, e mesmo que os passos intermediários pós-transcricionais e pré-traducionais não possam ser visualizados, é possível uma análise quantitativa dessas alterações (QUEIROZ, 2004).

### **III OBJETIVO**

O objetivo desse projeto é a prospecção em larga escala de genes potencialmente relacionados com os mecanismos de imunidade ao carrapato, mediante a análise da expressão gênica diferencial em amostras de linfonodos de bovinos suscetíveis (Aberdeen Angus) e resistentes (Nelore) a este parasita.

A expectativa é que os resultados deste projeto venham contribuir de forma significativa para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos, bioquímicos e fisiológicos envolvidos na manifestação da resistência ao carrapato, permitindo o desenvolvimento de produtos e/ou tecnologias para combater este parasita, tais como: utilização dos conhecimentos gerados em programas de melhoramento genético (seleção assistida por marcadores moleculares, introgressão gênica ou mesmo a produção de animais geneticamente modificados) e no desenvolvimento de produtos biotecnológicos (vacinas, medicamentos, diagnóstico) empregados no combate ao carrapato, o que deve levar a ganhos de produtividade na produção de carne e de couro bovino.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados 34 bezerros “naives” com idades aproximadas de 4 meses, sendo 17 da raça Angus e 17 da raça Nelore. Para obtenção desses bezerros, 40 fêmeas no terço final da gestação, foram mantidas nas dependências do setor de confinamento do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP. Esses animais foram alojados em baias coletivas, tipo céu aberto, com área livre de 18 m<sup>2</sup>/cabeça e disponibilidade de cocho de 1,0 m /cabeça. As baias eram providas de bebedouros e cochos para fornecimento de água e de mistura mineral. Anexo às instalações para confinamento, havia um centro de manejo com tronco de contenção, balança e demais estruturas necessárias para a condução do experimento. Durante todo o período experimental, os animais receberam uma dieta à base de feno, mistura concentrada de milho e soja, além de mistura mineral, balanceada para atender as exigências de vacas adultas em lactação.

Desde o terço final da gestação, preventivamente, todas as vacas foram pulverizadas quinzenalmente com medicamento a base de Amitraz (Triatox® Schering-Plough), com a finalidade de prevenir a infestação por carrapatos. Após o nascimento os bezerros foram tratados com uma dose de doramectina (Dectomax®) e, obedecendo ao calendário sanitário, vacinados contra a febre aftosa, salmoneloses, pasteureloses e clostridioses. A partir dos 20 dias de idade os bezerros foram incluídos no controle quinzenal de ectoparasitos, junto com as

vacas. A aplicação do carrapaticida foi suspensa trinta dias antes da realização das coletas de linfonodos, com o objetivo de eliminar o efeito residual do carrapaticida.

#### **4.2. Obtenção das larvas de *R (B.) microplus* e infestações**

As larvas de *R (B.) microplus* foram obtidas a partir de posturas de teleóginas coletadas na Fazenda Demétria, situada no município de Botucatu-SP. As teleóginas coletadas foram levadas para a Embrapa Pecuária Sudeste na cidade de São Carlos, onde foram lavadas com água, separadas em grupos de 10 e colocadas em placas de Petri. Essas placas foram incubadas em estufa incubadora tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) a  $27\pm 1$  °C e umidade superior a 70%, para realização da postura. Foram utilizados somente os ovos postos no primeiro e segundo dias, a fim de evitar-se a transmissão das babesioses aos animais experimentais. Com o mesmo fim, antes das infestações os animais foram tratados com imidazol (Imizol® Schering-Plough) na proporção de 1mL do produto para cada 40 kg de peso corporal, por via subcutânea.

Foram pesados 2g de ovos, ou cerca de 40.000 ovos (LABRUNA et al., 1997) que foram armazenados em seringas descartáveis e novamente incubados até a eclosão das larvas. Foram usadas para as infestações dos animais, somente as seringas cujas taxas de eclosão por exame visual, foram superior a 90%. As infestações foram feitas colocando-se todo o conteúdo das seringas na região dorsal dos animais.

No 20º dia após a infestação, os animais foram avaliados quanto a infestação, atribuindo-se um escore visual comparativo correspondente ao número de carrapatos com diâmetro superior a 4,5 mm, presente em cada animal.

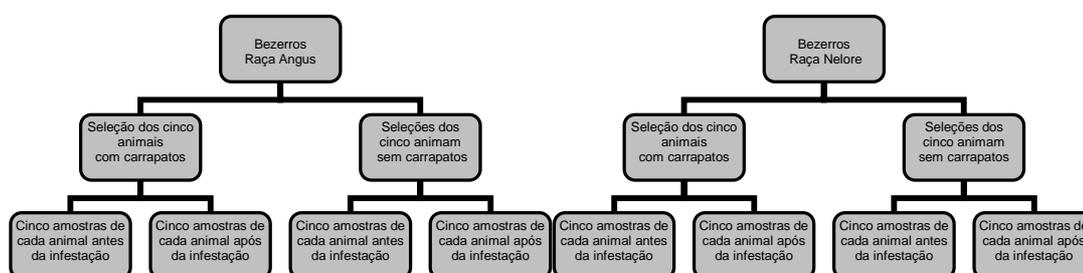
### **4.3. Colheita e armazenamento das amostras de linfonodos**

Os linfonodos utilizados nesse experimento foram os inguinais superficiais, devido ao fácil acesso cirúrgico. Foram realizadas duas coletas de linfonodos: a primeira antes da infestação por carrapatos, quando os animais tinham três meses de idade e a segunda no 21º dia após a infestação (dia modal para teleóginas). Para evitar a detecção de expressão de genes relacionados ao processo de cicatrização, a primeira coleta foi realizada do lado direito e a segunda do lado esquerdo do animal.

Os linfonodos foram removidos mediante procedimento cirúrgico, no qual os animais foram sedados com xilasina (Rompun® Bayer) na dose de 1mL para cada 100 kg de peso vivo, por via intramuscular. Foi feita a tricotomia e antissepsia da região inguinal, utilizando solução a base de iodo. A anestesia local foi feita pela infiltração de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet® Bravet) na dose média de 10 mL. A técnica cirúrgica consistiu na incisão elíptica da pele, com cerca de 7 cm de comprimento. Com a tesoura de ponta romba, fez-se a divulsão, contornando-se o linfonodo. Procedeu-se a hemostasia dos vasos utilizando-se o fio categute número 01 e, então, o linfonodo foi removido. O espaço morto foi reduzido com o fio categute, e a pele foi suturada com fio de algodão número 10 (Brasmédica), utilizando-se a sutura de Wolf. O pós operatório consistiu de aplicação de antibiótico à base de penicilinas na dosagem de 10 mL/100 Kg de peso e curativos diários com solução iodada. A retirada dos pontos foi feita no décimo dia. Esses linfonodos foram imediatamente divididos em amostras de aproximadamente 0,25g, embalados em papel alumínio, devidamente identificados e congelados em nitrogênio líquido.

#### 4.4. Escolha das amostras utilizadas para extração de RNA total

As amostras de linfonodos utilizadas no experimento foram selecionadas tendo como base, o escore de infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus*, conforme o organograma representado na **Figura 7**. Foram escolhidos para análise, os cinco animais de cada raça com maior escore de infestação e os cinco animais que não foram infestados (grupo controle). De cada animal escolhido foram utilizadas duas amostras, uma colhida antes da infestação e outra colhida 21 dias após a infestação, totalizando 40 amostras.



**Figura 7**-Organograma da seleção das amostras utilizadas no experimento

#### 4.5. Extração de RNA total das amostras de linfonodo

Para extração do RNA total, utilizou-se o reagente Trizol (Invitrogen) e o kit PureLink Micro-to-Midi System (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em síntese, aproximadamente 0,2g de tecido foram transferidos para um tubo de polipropileno descartável de 15mL contendo 3mL Trizol (Invitrogen) e homogeneizado em ultra-turrax por 3 x de 40 segundos, com intervalos de 40 segundos no gelo.

Após a homogeneização, a amostra foi dividida em três tubos de polipropileno descartável de 1,5mL e incubadas a temperatura ambiente por 5

minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Adicionou-se 200µL de BCP (1-bromo-3-chloropropane, Molecular Research Center, Inc. USA), incubando novamente a amostra, à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugando por 15 minutos a 12.000 x g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno descartável de 1,5mL e adicionou-se 500µl de etanol 70% (v/v), sob leve agitação. A solução foi transferida para uma coluna com membrana a base de sílica, sendo centrifugada por 15 segundos a 12,000 x g. Descartou-se a solução contida no tubo coletor. Novamente adicionou-se 500µL de Wash Buffer I e centrifugou-se por 15 minutos a 12,000 x g, descartando-se novamente o conteúdo do tubo coletor.

Para eliminar fragmentos de DNA residuais, utilizou-se 20µL da enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega), 8µL de 10X Reaction Buffer e 52µL de água DEPC foram adicionados na coluna. Incubou-se por 30 minutos a 38°C. Após esse período adicionou-se 350µL de Wash Buffer I e centrifugou-se por 15 minutos a 12,000 x g. Todo o conteúdo do tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente transferida para um outro tubo e foi lavada por duas vezes com 500µL de Wash Buffer II e centrifugado por 15 minutos a 12,000 x g. O tubo coletor e seu conteúdo foram descartados. O RNA foi eluído de cada coluna, adicionando-se 50µL de água miliQ livre de RNase e centrifugou-se por dois minutos a 12.000 x g a temperatura.

As amostras de RNA assim obtidas foram armazenadas em freezer a -80°C, até o momento da síntese DNA complementar.

#### ***4.5.1. Quantificação e verificação da qualidade dos RNAs extraídos***

Para determinação da qualidade e quantidade dos RNAs extraídos, todas as amostras foram quantificadas por meio da medida das absorbâncias nos comprimentos de ondas 260 e 280nm (**Tabelas 1 e 2**), em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies).

**Tabela 1** – Concentração de RNA (animais da Raça Angus) extraído com o kit Micro-to-Midi (Invitrogen) quantificado em NanoDrop

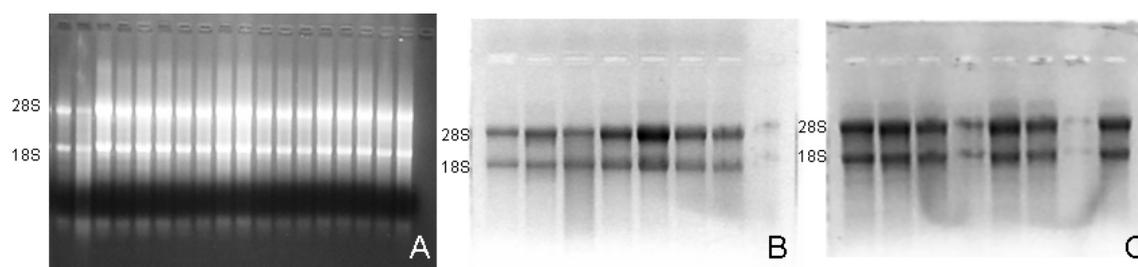
Amostras	[ ] ng/μl
TLA 02 (1ª Biópsia)	2037,1
TLA 02 (2ª Biópsia)	1886,3
TLA 04 (1ª Biópsia)	3671,3
TLA 04 (2ª Biópsia)	2649,6
TLA 06 (1ª Biópsia)	2496,1
TLA 06 (2ª Biópsia)	2853,0
TLA 08 (1ª Biópsia)	2166,8
TLA 08 (2ª Biópsia)	1377,1
TLA 10 (1ª Biópsia)	1191,6
TLA 10 (2ª Biópsia)	1166,2
TLA 11 (1ª Biópsia)	3061,5
TLA 11 (2ª Biópsia)	2453,5
TLA 14 (1ª Biópsia)	1728,7
TLA 14 (2ª Biópsia)	2030,9
TLA 16 (1ª Biópsia)	2384,2
TLA 16 (2ª Biópsia)	2069,7
TLA S/N(1ª Biópsia)	2811,1
TLA S/N(2ª Biópsia)	2616,0

**Tabela 2** – Concentração de RNA (animais da Raça Nelore) extraído com o kit Micro-to-Midi (Invitrogen) quantificado em NanoDrop

Amostras	[ ] ng/μl
TLN 01 (1ª Biópsia)	1961,3
TLN 01 (2ª Biópsia)	3900,1
TLN 02 (1ª Biópsia)	1868,7
TLN 02 (2ª Biópsia)	1846,4
TLN 03 (1ª Biópsia)	2056,5
TLN 03 (2ª Biópsia)	1320,1
TLN 04 (1ª Biópsia)	1328,5
TLN 04 (2ª Biópsia)	1351,3
TLN 07 (1ª Biópsia)	2329,8
TLN 07 (2ª Biópsia)	2292,6
TLN 09 (1ª Biópsia)	1961,5
TLN 09 (2ª Biópsia)	1373,6
TLN 12 (1ª Biópsia)	2834,3
TLN 12 (2ª Biópsia)	1937,6
TLN 14 (1ª Biópsia)	1553,7
TLN 14 (2ª Biópsia)	1362,0
TLN 15 (1ª Biópsia)	3019,7
TLN 15 (2ª Biópsia)	1854,3
TLN 16 (1ª Biópsia)	2710,5
TLN 16 (2ª Biópsia)	1421,8

A integridade do RNA total foi avaliada através de eletroforese em géis de agarose (1,5%) em condições desnaturantes (**Figura 8**). A agarose foi fundida em tampão de corrida (MOPS 20 mM, pH 7,0, acetato de sódio 5 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0). Foi adicionado formaldeído, a fim de se obter a concentração final de 2,2 M (8%). A adição foi realizada quando a temperatura do gel atingiu 60 °C.

Uma alíquota correspondente a 2,5 µg de RNA total foi desidratada a vácuo, dissolvida em uma solução contendo 2 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC, 1 µl de brometo de etídeo (1 mg/mL) e 9 µl de tampão de amostra (formamida 66,7%, formaldeído 8%, azul de bromofenol 0,4% dissolvidos em tampão de corrida), incubada a 65 °C durante 7 minutos e imediatamente aplicadas no gel.



**Figura 8** – Eletroforese para verificação da integridade do RNA total.

A - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Angus (Tratamento e Controle)

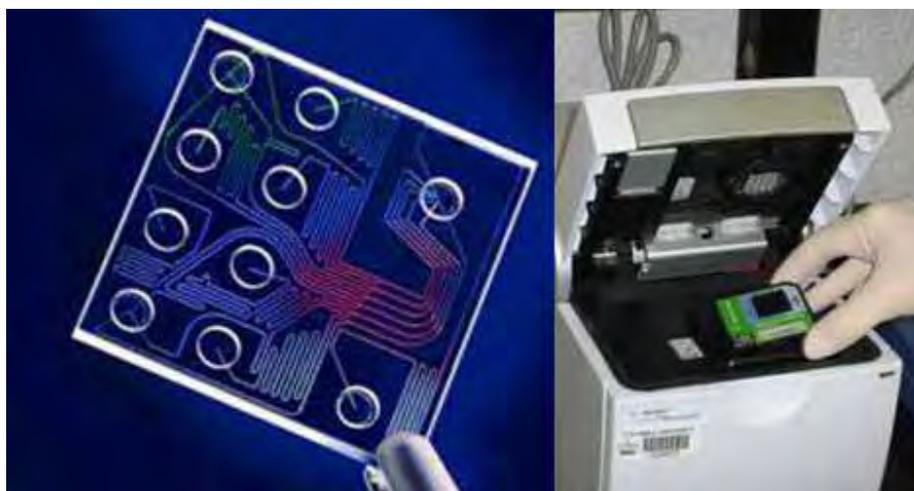
B - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Nelore (Tratamento)

C - RNA total extraído de tecido linfonodos de Bovinos da Raça Nelore (Controle)

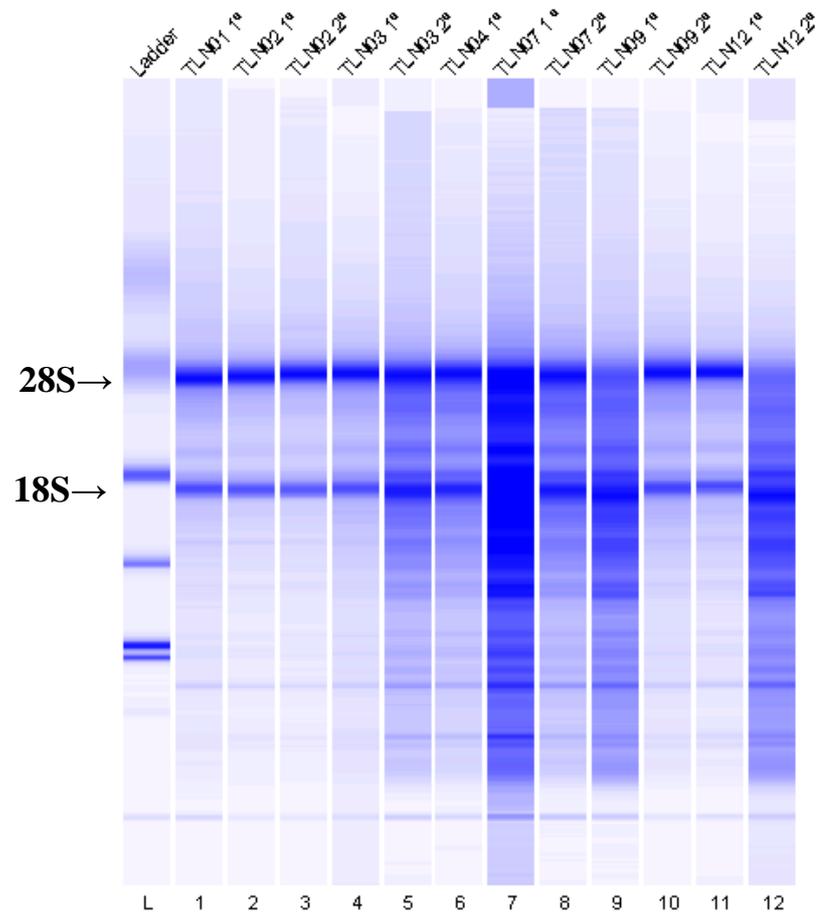
As amostras de RNA foram também submetidas a uma eletroforese capilar utilizando-se o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para determinação simultânea da quantidade e integridade das moléculas de RNA. Essas análises baseiam-se na observação dos perfis dos eletroferogramas, e na

comparação com um padrão (Kit RNA 600 ladder-Agilent Technologies) (**Figura 9**). Para utilização desse equipamento, seguiu-se detalhadamente o protocolo de manipulação de preparo do chip de separação em eletroforese em gel (**Figura 10**), introdução dos marcadores de tamanho, amostras e corantes, conforme as especificações do fabricante. Em cada reservatório indicado no chip, foram aplicados o gel de poliacrilamida com intercalador fluorescente (9  $\mu\text{L}$ ), o marcador de corrida (5  $\mu\text{L}$ ) com cada amostra (1  $\mu\text{L}$ ) e o padrão de tamanho de corrida. O microchip foi introduzido no equipamento, que contém um detector de fluorescência induzida a laser. O tempo de análise para 12 amostras foi de aproximadamente de 30 minutos entre a preparação, a aplicação de amostra, a análise e a coleta dos dados.

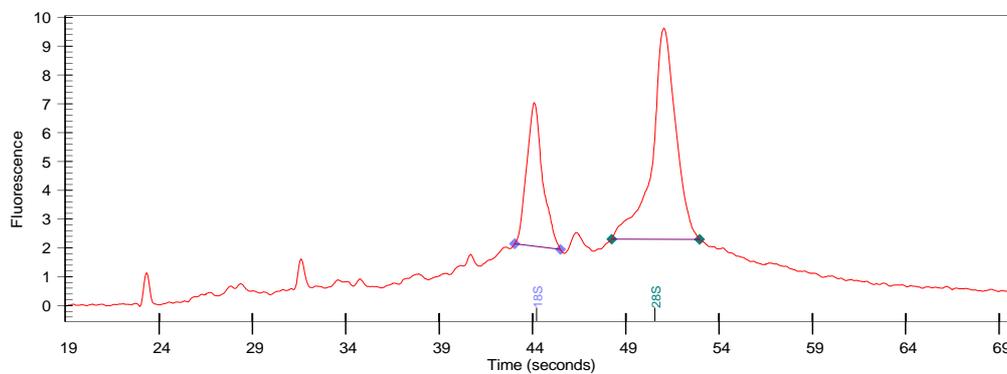
Os dados obtidos foram analisados no software da Agilent Biosizing (Versão A. 02.12). Foi considerado RNA de boa qualidade quando nos eletroferogramas pode se observar os dois picos das bandas 28S e 18S, sendo o 28S maior que o 18S (**Figura 11**).



**Figura 9** – Eletroforese no Lab-on-a-Chip Agilent 2100 Bioanalyzer.



**Figura 10** – Gel virtual gerado no Bioanalyzer, marcando as bandas 28S e 18S



**Figura 11** – Eletroferograma de um RNA que foi considerado de boa qualidade

#### **4.6. Síntese e marcação do cDNA para as Híbridizações**

Para realizar a síntese das fitas de DNA complementar, utilizou o kit SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen) que contém um nucleotídeo aminoallyl-modificado e uma aminohexyl-modificada junto com outros dNTPs. Foram utilizados 10µg de RNA total combinado com 2µL de oligo-dT que foram incubados a 70°C por 5 minutos e em seguida colocados no gelo por 1 minuto. No gelo adicionou-se 6µL de 5X First-Strand buffer, 1,5µL de 0.1M de DTT, 1,5µL de dNTP mix (incluído os nucleotídeos amino-modificados), 40 unidades da enzima RNaseOUT™ e 800 unidades da enzima para transcriptase reversa (SuperScript™III RT). Todas as amostras foram então incubadas a 46°C, durante 3 horas.

Os moldes de RNA foram removidos por hidrólise alcalina adicionando-se 15µL de 1N NaOH a 70°C por 10 minutos e em seguida as reações foram neutralizadas com 15µL de 1N HCl.

Para a remoção dos nucleotídeos não incorporados as amostras foram purificadas pelo sistema PureLink™PCR Purification System (Invitrogen), onde adicionou-se 700µL de Binding Buffer. A solução cDNA/ Binding Buffer foi transferida para uma coluna de afinidade para obtenção de um cDNA puro. A coluna foi centrifugada a 3.300 x g por 1 minuto. Foi adicionado 600µL da solução Wash Buffer no centro da coluna e então, centrifugou-se a 12.000 x g por 30 segundos. Trocou-se o tubo coletor e centrifugou-se novamente na mesma velocidade e mesmo tempo, para que fosse removido o resíduo da solução. A coluna foi transferida para um tubo âmbar e adicionou-se 20µL de água tratada com DEPC. Incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida centrifugou-se a 12.000 x g por 1 minuto.

Nas reações de acoplamento o cDNA amino-modificado foi ligado com o corante fluorescente N-hydroxysuccinimide (NHS)-éster. Utilizou 5µL 2X Coupling Buffer nas amostras de cDNA purificadas e adicionou-se 2µL de AlexaFluor

647(molecular probes)e de 2µL de AlexaFluor 555(molecular probes) em 2 µL de DMSO. As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

O produto do acoplamento também foi purificado para remoção dos corantes que não reagiram pelo sistema PureLink™PCR Purification System (Invitrogen). Para isso adicionou-se 700µL de Binding Buffer. A solução cDNA/ Binding Buffer foi transferida para uma coluna de afinidade para obtenção de um cDNA puro. A coluna foi centrifugada a 3.300 x g por 1 minuto. Foram adicionados 600µL da solução Wash Buffer no centro da coluna e centrifugado na velocidade máxima por 30 segundos. O tubo coletor foi trocado por um novo que foi novamente centrifugado na velocidade máxima por 30 segundos para remoção resíduo da solução. A coluna foi transferida para um tubo âmbar e adicionou-se 20µL de água tratada com DEPC incubada a temperatura ambiente por 1 minuto seguida de centrifugação na velocidade máxima por 1 minuto. As amostras foram mantidas protegidas da luz e estocadas a -20°C até o momento do uso.

#### **4.7.Hibridização das amostras**

Foram realizados dois ensaios de hibridização competitiva, cada um com dez lâminas.

No primeiro ensaio, foram utilizadas as amostras provenientes dos animais da Raça Angus. Cada lâmina continha uma amostra da primeira biópsia, e uma da segunda biópsia, marcadas com fluoróforos Alexa Flúor® 674 e Alexa Flúor® 555, nas colorações vermelha e verde respectivamente.

No segundo ensaio utilizou-se amostras provenientes dos animais da Raça Nelore. Como no primeiro ensaio, cada lâmina continha uma amostra da primeira biópsia, e uma da segunda biópsia, marcadas com fluoróforos Alexa Flúor® 674 e Alexa Flúor® 555, nas colorações vermelha e verde respectivamente.

#### **4.7.1. Hibridização das lâminas de microarray com cDNAs marcados com fluoróforos**

Na realização dessas análises foi utilizado um chip long oligo de alta densidade (“microarrays”), no qual estão representados 8.400 genes bovinos (em duplicata) com anotação completa (GeneLink database - <http://cafg.msu.edu>). O “chip” dispõe também de múltiplos “spots” que servem como controles positivos, nos quais estão depositados seqüências de genes que não apresentam variação no padrão de expressão (PPIA, GAPDH, PGK1, RPL19, B2M, GUSB, RFLP2, 28S RNA, ACTB, 60S RNA), bem como de múltiplos “spots” para o controle negativo, nos quais estão depositados 10 seqüências artificiais cuidadosamente elaboradas (Stratagene “Alien” Genes) para não apresentem hibridização. Os “long oligos” (70 mers) que compõem o “microarrays” foram sintetizados pela Operon Biotechnologies, Inc., com base em seqüências consenso depositadas no TIGR (The Institute for Genomic Research). Este “chip” foi adquirido junto ao Center for Animal Functional Genomics - Michigan State University, local onde foi desenvolvido o “chip” de DNA bovino utilizado nos projetos do National Bovine Functional Genomics Consortium dos Estados Unidos.

No processo de hibridização utilizou uma estação de hibridização (GeneTAC Hybridization Station microarray hybridization chamber, Genomic Solutions, USA). Adicionou-se às sondas finais, 100µL de solução SlideHib 3 (Ambion) pré-aquecida a 70°C, e mantidas a essa temperatura até o momento da aplicação nos “microarrays”.

Após a aplicação das sondas marcadas, as hibridizações foram realizadas em sistema “stepdown” durante 18 horas, em temperaturas variando de 30 a 42 °C. Após esse processo, a estação realizou lavagens automáticas para a remoção das sondas não incorporadas, sendo a primeira com tampão de alta estringência (2 x SSC + 0,5% SDS), em seguida com tampão de média estringência (0,5 x SSC), passando para um tampão pós lavagem (0,05 x SSC) e por último com água MilliQ.

Todos os tampões foram preparados no momento do uso. Cada lavagem foi realizada cinco vezes com duração de dois minutos, antes de passar para próxima solução. Posteriormente as lâminas foram secas por centrifugação a 1.000rpm, em temperatura ambiente por 2 minutos, dentro de tubos cônicos de polipropileno com capacidade de 50mL.

As lâminas foram estocadas protegidas da luz até o momento da leitura em scanner GMS418 Arrayer Scanner (Genetic Microsystem/Affimetrix). Foi utilizado o protocolo padrão de obtenção de imagem de lâminas segundo a recomendação do fabricante. O programa de análise de imagens do scanner transforma o sinal de fluorescência dos fluoróforos Alexa Flúor® 674 e Alexa Flúor® 555, nas colorações vermelha e verde respectivamente, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à intensidade da coloração.

#### **4.8. Normalização e Análise Estatística dos dados de microarray**

Na etapa de elaboração de modelos estatísticos apropriados para a análise dos dados e interpretação dos resultados, o projeto contou com a colaboração de pesquisadores do Center for Animal Functional Genomics (CAFG) da Michigan State University.

Efeitos sistemáticos dos fluoróforos nas intensidades observadas em cada hibridização foram estudados utilizando-se o gráfico de dispersão M vs A construído para cada um dos *microarrays*, no qual cada par de ordenadas (X,Y) representa o logarítmico da relação de intensidades  $M = \log(Cy3/Cy5) = \log Cy3 - \log Cy5$  em função das médias das intensidade na escala logarítmica  $A = (\log Cy3 + \log Cy5)/2$  para cada um dos pontos (spots) do micro arranjo, como descrito por YANG et al. (2002).

A correção de possíveis efeitos sistemáticos observados nos diagramas M vs A, usualmente denominada normalização dos dados, foi realizada considerando-se a técnica de regressão local robusta LOWESS (CLEVELAND &

DEVLIN, 1988). A eficiência da normalização com a técnica LOWESS foi avaliada pela monitoração dos gráficos M vs A e dos diagramas de dispersão logCy3 vs logCy5 em cada um dos arranjos, antes e depois da normalização.

Os valores normalizados (ajustados) de M, logarítmico das relações de intensidades, foram então analisados estatisticamente utilizando-se um teste F moderado, no qual as estimativas dos erros-padrão para cada gene foram obtidas a partir de uma técnica de “shrinkage” utilizando-se um procedimento Bayesiano empírico para maior estabilidade nas inferências (SMYTH, 2004). Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o pacote computacional LIMMA, desenvolvido em linguagem R (<http://www.r-project.org/>), o qual é oferecido sem qualquer custo a partir da website do projeto BioConductor (<http://www.bioconductor.org/download>).

Para o ajuste do nível e significância em decorrência da multiplicidade de testes, referente a cada gene considerado no microarray, os valores p (p-values) obtidos foram convertidos em valores q (q-values) para controle da taxa de falsos positivos (False Discovery Rate - FDR; Storey, 2002) em 5%.

#### **4.9. Validação dos dados de microarray**

##### **4.9.1. Síntese de cDNA para técnica de PCR em tempo real**

Os cDNAs utilizados nas análises de PCR em tempo real foram sintetizados através de reação de transcrição reversa (RT), com a utilização do kit comercial SUPERSRIPT III FIRST-STRAND SYNTESIS SUPER MIX (Invitrogen). Para isso, em uma alíquota de 5µg de RNA total foi adicionado 1µL de Oligo dT, 1µL de Anneling buffer e se necessário, água tratada com DEPC completando o volume de 8µl. A amostra foi incubada a 65°C por cinco minutos e em seguida colocada no gelo. Foi adicionado 10µL de 2X first-strand reaction Mix e 2 µL de Super script III RNA out enzyme MIX e incubado a 50°C por 1 hora. Esse período, para a

inativação da enzima, as amostras foram incubadas a 85°C por 5 minutos. O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies) e em seguida foi estocado a -20°C até o momento do uso.

#### **4.9.2. Reação de PCR em tempo real**

A expressão dos genes B-ACT (beta-actina), IL-5 (Interleucina 5) e IL-12p40 (Interleucina 12p40) foram avaliadas pela técnica de PCR em tempo real. Para isso foram utilizadas 12,5 µl do reagente POWER SYBR Green (Applied Biosystems), 15µM de cada iniciador específico para cada gene, 30ng de cDNA (molde) e água MiliQ (ultrapura) autoclavada completando o volume final para 25µl. A reação foi submetida ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante em um aparelho GeneAmp 7500 (Applied Biosystems), descrito a seguir: dois minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e quarenta ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Por fim, foi empregado um ciclo final de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação.

Os resultados foram analisados com base no valor de threshold cycle (Ct) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este ponto correspondente ao momento da reação, onde a amplificação atinge um limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação ao gene constitutivo.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Infestações

Na tabela 8 encontram-se os *scores* de infestação atribuídos 21 dias após a transferência das larvas para o corpo dos animais, que evidenciam o maior número de carrapatos fixados nos bezerros da raça Angus, como pode ser visualizado na **Figura 12**. Estes resultados comprovam a maior suscetibilidade da raça Angus às infestações por carrapatos e confirmam que os animais utilizados no presente trabalho eram, de fato, contrastantes para esta característica.



**Figura 12.** Visualização do grau de infestação por carrapatos em animais das raças Nelore (A) e Aberdeen Angus (B).

Os *scores* relativos aos graus de infestação variaram de 1 a 5, correspondendo às quantidades de carrapatos presentes no corpo do animais: muito pequena, pequena, intermediária, abundante e muito abundante.

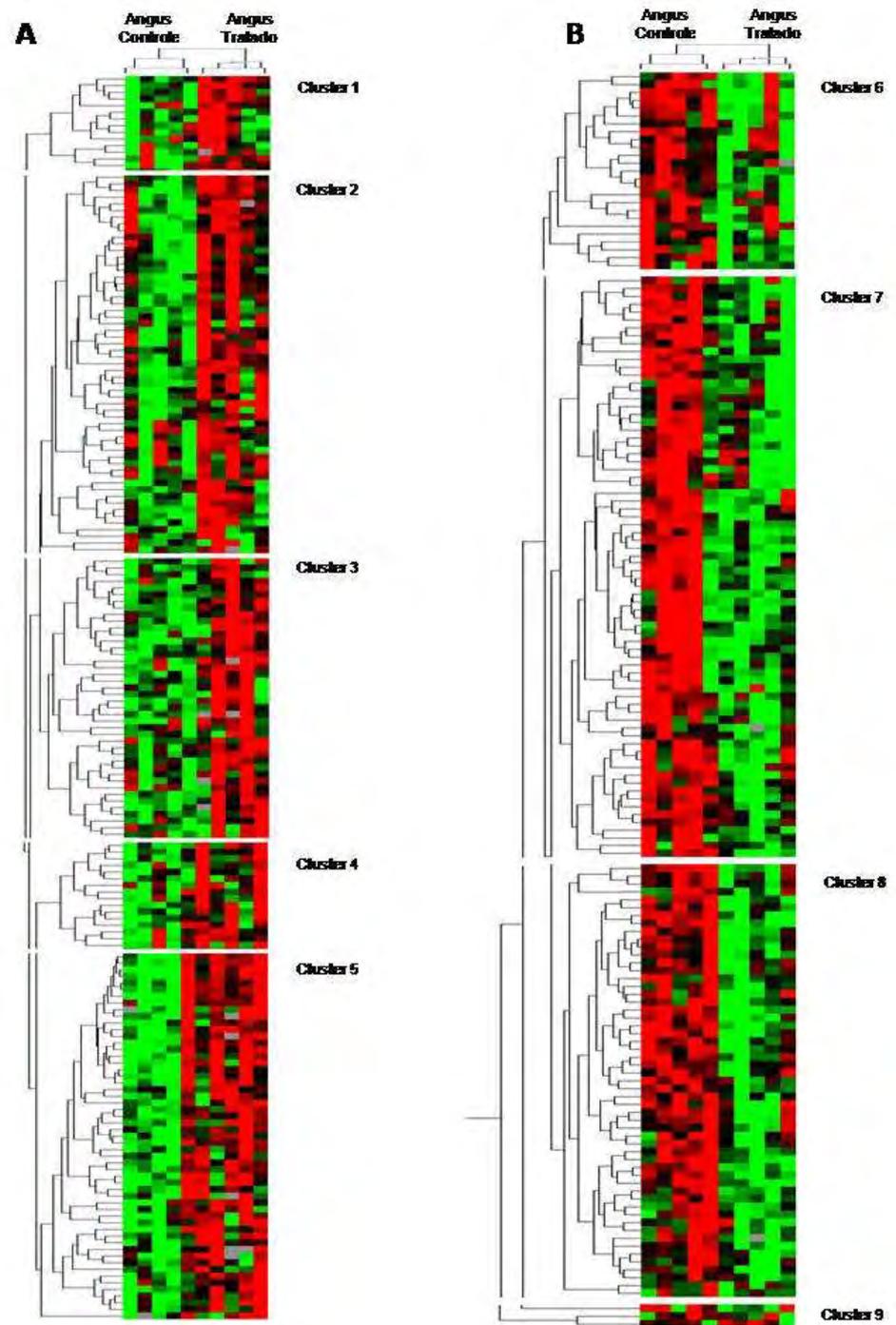
**Tabela 3** – Distribuição dos animais das raças Angus e Nelore, conforme o *score* atribuído 21 dias após a infestação.

<b>Score</b>	<b>Angus (n=12)</b>	<b>%</b>	<b>Nelore (n=12)</b>	<b>%</b>
1	-	-	6	50,0
2	3	25,0	5	41,6
3	2	16,7	1	8,4
4	2	16,7	-	-
5	5	41,6	-	-

Como pode ser visto na **Tabela 3**, 75% dos animais da raça Angus receberam *scores* entre 3 e 5 (quantidade de carrapatos variando de intermediária a muito abundante), enquanto que 91,6% dos animais da raça Nelore foram classificados com os *score* 1 e 2 (quantidade de carrapatos entre muito pequena e pequena). Contudo, é preciso assinalar que as variações nos *scores* atribuídos, notadamente para os animais da raça Angus, podem ser interpretadas como indicativo da existência de variabilidade genética para esta característica.

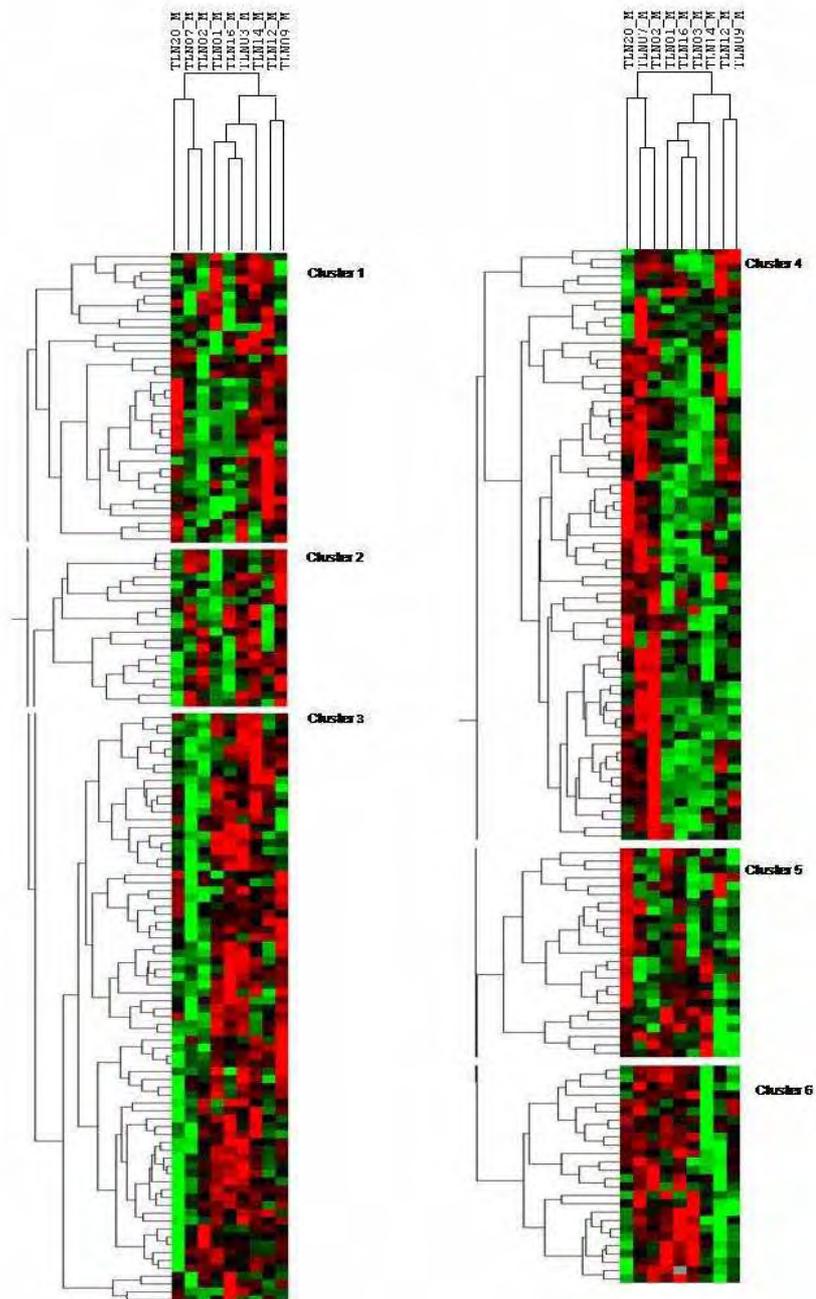
### **5.2. Resultados da análise da expressão gênica por “microarrays”**

Na análise estatística dos resultados da expressão gênica por *microarrays*, comparando animais tratados (infestados) com seus respectivos controles (não infestados), foram identificados 341 genes diferencialmente expressos na raça Angus e 254 genes na raça Nelore ( $p < 0,05$ ). Com o objetivo de verificar a existência de eventuais interações biológicas dentro desses grupos de genes foi realizada uma análise de *Hierarchical clustering* não supervisionada (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2002), cujos mapas podem ser visualizados nas **Figuras 13 e 14**.



**Figura 13.** Análise por *Hierarchical clustering* (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2002) de genes diferencialmente expressos no grupo controle (A) e no grupo tratado (B) nos bovinos da raça Angus. Os blocos em verde indicam

genes altamente expressos no tecido; em vermelho, aqueles de baixa expressão.



**Figura 14.** Análise por *Hierarchical clustering* (Sanchez-Carbayo *et al.*, 2002) de genes diferencialmente expressos nos bovinos da raça Nelore. Os blocos

em verde indicam genes altamente expressos no tecido; em vermelho, aqueles de baixa expressão. Os animais N04, N02, N14, N09, N03 fazem parte dos animais do grupo controle e o restante do grupo tratado.

Como pode ser observado nessas figuras, foram identificados seis agrupamentos (*clusters*) de transcritos para os genes diferencialmente expressos no linfonodo dos animais da raça Nelore e nove para os da raça Angus, cujos componentes estão identificados individualmente nas tabelas suplementares 1 e 2 (**Anexo**), respectivamente.

No caso da raça Angus, o perfil de expressão das 10 amostras analisadas evidenciou a existência de uma “assinatura gênica” diferenciada para os animais tratados (infestados) e controle (não infestados), que foram agrupados conjuntamente, demonstrando que o linfonodo desses animais responde à infestação por carrapatos com um padrão de expressão gênica diferenciado. Entretanto, o mesmo não se observou para os animais da raça Nelore, cujos perfis de expressão gênica dos animais tratados e controle não apresentaram uma diferenciação clara, sugerindo que a infestação por carrapatos não afeta a expressão gênica no linfonodo dos animais dessa raça.

Contudo, é preciso lembrar que tais afirmações podem não ser verdadeiras, pois é possível que estes resultados sejam o produto da variação ao acaso, os chamados “falsos positivos”.

De maneira que para se evitar erros de interpretação decorrentes da análise estatística do resultados da expressão gênica por microarrays, é bastante comum a correção dos resultados pelos métodos de Bonferroni ou da False Discovery Ratio (FDR).

Aplicando-se a correção por FDR no presente experimento, verifica-se que tanto os 341 genes inicialmente identificados como diferencialmente expressos no linfonodo de animais da raça Angus, como os 254 no da raça Nelore ( $p < 0,05$ ), podem ser simplesmente “falsos positivos”.

Assumindo valor de  $\alpha = 0,05$  e o total de 8.329 genes estudados neste experimento, espera-se que 417 dos genes detectados como diferencialmente expressos sejam resultantes da variação ao acaso. Após o ajuste dos *p-values* pela FDR, não foi encontrado nenhum gene diferencialmente expresso (*q-value* < 0,05).

### 5.3. Categorização dos genes

Os genes apontados como diferencialmente expressos pela análise estatística (desconsiderando a correção por False Discovery Ratio – FDR) foram categorizados de acordo com a categorização proposta pelo Gene Ontology através do programa de Bioinformática FatiGoPlus (AL-SHAHROUR et al. 2006). Assim, dos 341 genes identificados nos animais da Raça Angus, 115 foram categorizados, sendo 34 genes classificados como Processo Biológico (**Tabela 4**), 40 genes como Função Molecular (**Tabela 5**) e 41 genes como Componente Celular (**Tabela 6**). Dos 254 genes identificados nos animais da Raça Nelore, 63 genes foram categorizados, sendo que 22 genes foram classificados como Processo Biológico (**Tabela 7**), 25 genes como Função Molecular (**Tabela 8**) e 16 genes como Componente Celular (**Tabela 9**), bem como suas subcategorias

**Tabela 4** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Processo Biológico

Processos Biológicos	Nº de genes envolvidos
Processo metabólico celular	23
Processo metabólico primário	20
Processo metabólico de macromoléculas	19
Processo biológico de regulação	11
Localização Celular	10

---

Gene estrutura	8
Organização celular	8
Processo celular	8
Processo biossintético	7
Desenvolvimento celular	7
Comunicação celular	4
Localização celular	4
Morte	4
Proliferação celular	4
Resposta a estímulo externo	3
Regulação da função molecular	3
Processo catabólico	3
Resposta ao estress	3
Divisão celular	2
Resposta a estímulo químico	2
Reprodução sexual	2
Sistema imunológico	2
Comportamento	2
Processo Neurológico	2
Adesão celular	2
Metabolismo de compostos nitrogenados	1
Desenvolvimento da maturação	1
Processo metabólico secundário	1
Reposta de defesa	1
Processo reprodutivo	1
Homeostase	1
Regeneração de tecido	1
Regulação biológica qualitativa	1
Localização proteína	1

---

Ciclo celular	1
Regulação de fluídos do corpo	1
Segregação de cromossomo	1
Ciclo de regeneração do exoesqueleto	1
Homeostase celular	1
Estímulos de resposta biótica	1
Desenvolvimento e crescimento	1
Coagulação	1

---

**Tabela 5** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Função Molecular

Função Molecular	Nº de genes envolvidos
Proteína de ligação	12
Transferase	6
Carriadores	4
Oxidurretase	4
Ligação de nucleotídeos	4
Transporte de íons	3
Hidrolase	3
Ligação de íons	2
Atividade de liase	2
Ligação de vitaminas	1
Ligação de Isoprenóides	1
Enzima de inibição de atividade	1
Enzima de ativação de atividade	1
Receptor	1

Ligação de esteróides	1
Ligação de ácidos nucléicos	1

**Tabela 6** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Angus classificados como Componente Celular

Componente Celular	Nº de genes envolvidos
Componente celular	38
Organela ligada à membrana	18
Componente de organela	12
Organela não ligada à membrana	8
Componente extracelular	4
Componente da sinapse	1
Vesícula	1

**Tabela 7** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Processo Biológico

Processo Biológico	Nº de genes envolvidos
Processo Metabólico Celular	11
Processo Metabólico Primário	11
Localização Celular	10
Processo metabólico de macromoléculas	6
Regulação do processo Biológico	5
Comunicação celular	4
Desenvolvimento de estrutura anatômica	3

Desenvolvimento multicelular	3
Processo de desenvolvimento celular	3
Organização celular e Biogênese	3
Localização protéica	3
Reprodução sexual	2
Processo metabólico de compostos nitrogenados	2
Resposta ao estímulo externo	2
Processo catabólico	2
Resposta ao estress	2
Proliferação celular	2
Processo Biosintético	2
Célula de localização	1
Desenvolvimento de maturação	1
Resposta a estímulo endógeno	1
Regulação da Função Molecular	1
Morte	1
Comportamento	1
Processo neurológico	1
Circulação	1
Reconhecimento celular	1

**Tabela 8** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Função Molecular

Função Molecular	Nº de genes envolvidos
Proteína de ligação	12
Transferase	6
Carriadores	4

Oxidurretase	4
Ligação de nucleotídeos	4
Transporte de íons	3
Hidrolase	3
Ligação de ínos	2
Atividade de liase	2
Ligação de vitaminas	1
Ligação de Isoprenóides	1
Enzima de inibição de atividade	1
Enzima de ativação de atividade	1
Receptor	1
Ligação de esteróides	1
Ligação de ácidos nucléicos	1

**Tabela 9** – Categorização por subcategorias dos genes encontrados na Raça Nelore classificados como Componente Celular

Componente Celular	Nº de genes envolvidos
Componente celular	16
Organela ligada à membrana	8
Componente de organela	8
Organela não ligada à membrana	3
Componente extracelular	2
Vesícula	1
Parte da sinapse	1

Componente da matriz  
extracelular

---

1

Dos genes obtidos das análises, foi determinada a presença de vários genes relacionados com a resposta imune, embora não classificados diretamente como componentes da resposta imune na categorização proposta pelo Gene Ontology.

Assim, na Raça Angus dos 219 genes não classificados destacam-se:

- ✓ Integrinas, são proteínas heterodimericas de superficie celular, envolvidas nas interações célula-célula e célula-matriz. São importantes nas interações adesivas entre linfocitos e células apresentadoras de antígeno e na migração de linfócitos e leucócitos nos tecidos(JANEWAY et al., 2002).
- ✓ Imunoglobulinas são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B. Suas principais funções são a neutralização de toxinas, opsonização (recobrimento) de antígenos, destruição celular e fagocitose auxiliada pelo sistema complemento. São elas que vão dar início a um complexo sistema de defesa contra infecções.
- ✓ Interferon- $\gamma$ , é um produto das células T CD4 inflamatórias, das células CD8 e das células matadoras (NK). Esta citocina tem como ação primária ativação de macrófagos (JANEWAY et al., 2002).
- ✓ Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), é uma citocina produzida por macrófagos e linfócitos T e que possui multiplas funções na resposta imune. Este fator é o membro definidor da familia TNF das citocinas (JANEWAY et al., 2002).

- ✓ Moléculas CD (Conjuntos de diferenciação), são moléculas de superfície celular, identificadas por anticorpos monoclonais.

**Tabela 10** – Expressão de Moléculas CD encontradas na Raça Angus (Extraído de: JANEWAY et al., 2002)

Antígeno CD	Expressão celular	Funções
CD36	Plaquetas, monócitos, células endoteliais	Molécula de adesão de plaquetas. Envolvida no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas
CD74	Células B, macrófagos, monócitos, células MHC de classe II positivas	Cadeia Invariável associada com MHC de classe II
CD81	Linfócitos	Associa-se com CD19, CD21 para formar co-receptor de célula B

E na Raça Nelore dos 164 genes não classificados destacam-se:

- ✓ Imunoglobulina G, a região FC da imunoglobulina G realiza ativação de complemento (quando unida ao antígeno) e auxilia a fagocitose por se ligar a macrófagos. Com a ativação do sistema complemento, há geração de quimiotaxia de neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular e amplificação da resposta inflamatória.

- ✓ Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), é uma citocina produzida por macrófagos e linfócitos T e que possui múltiplas funções na resposta imune. Este fator é o membro definidor da família TNF das citocinas (JANEWAY *et al.*, 2002).
- ✓ Linfócito é um tipo de leucócito, ou glóbulo branco, do sangue. Há duas categorias: os linfócitos grande granulares e os pequenos linfócitos. Os linfócitos grande granulares são conhecidos como *Natural Killer* (células NK ou exterminadoras naturais) e os pequenos podem ser linfócitos T ou linfócitos B.
- ✓ Moléculas CD (Conjuntos de diferenciação), são moléculas de superfície celular, identificadas por anticorpos monoclonais.

**Tabela 11** – Expressão de Moléculas CD encontradas na Raça Nelore (Extraído de: JANEWAY *et al.*, 2002).

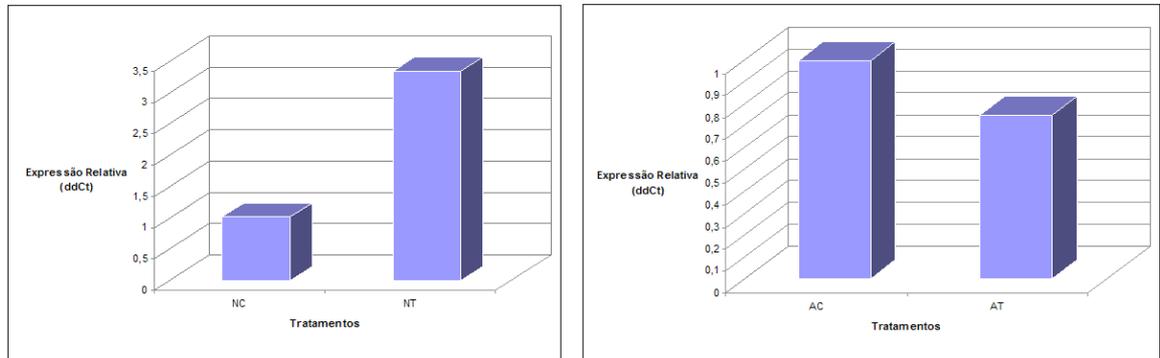
Antígeno CD	Expressão celular	Funções
CD1	Timócitos corticais, células de Langerhans, células dendríticas	Molécula semelhante a MHC de classe I associada com microglobulina $\beta_2$ . Tem papel especializado na apresentação de antígenos lipídicos.
CD37	Células B e T maduras, células	Desconhecidas; pode estar envolvida na

	mielóides	transdução de sinal. Forma complexos com CD53, CD81, CD82 e MHC de classe II
CD81	Linfócitos	Associa-se com CD19, CD21 para formar co- receptor de célula B
CD96	Células T ativadas, células INK	Desconhecidas

#### **5.4. Resultados do PCR em tempo real**

Para confirmar os dados de expressão gênica diferencial encontrados nas análises de microarray utilizou-se a técnica de PCR em tempo real para confirmar a expressão de duas citocinas e um gene controle. Escolheu-se a interleucina-12 (IL-12p40) por ela ser o principal mediador da resposta imune inata inicial. Homólogo a IL-6, ela estimula a síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos e desse modo contribui para os efeitos sistêmicos da inflamação. Já a interleucina-5 (IL-5) faz parte das interleucinas que medeiam e regulam a imunidade adquirida. As principais ações da IL-5 são estimular o crescimento e diferenciação dos eosinófilos e ativar os eosinófilos maduros para destruir parasitas. Também estimula a produção de células B e a produção de anticorpos específicos.

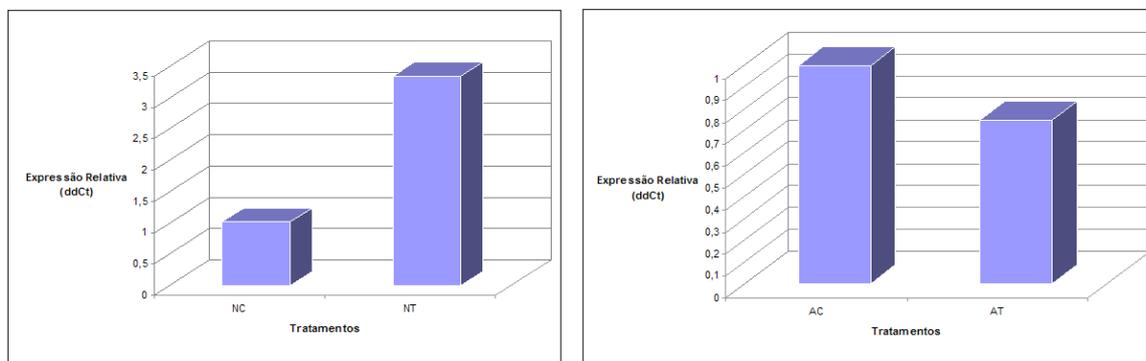
A expressão de mRNA para citocinas IL-5 e IL-12p40 nos linfonodos dos bovinos demonstrou diferentes padrões nas diferentes situações experimentais.



**Figura 15.** Análise da expressão gênica da citocina IL-12p40 em linfonodos de bovinos da Raça Angus da Raça Nelore, onde NC corresponde aos bovinos da Raça Nelore que não foram infestados, NT aos bovinos da Raça Nelore que foram infestados, AC que corresponde aos bovinos da Raça Angus que não foram infestados e AT aos bovinos da Raça Angus que foram infestados.

Nos bovinos da Raça Angus foi detectado a mensagem para IL-12p40 oito vezes maior nos linfonodos de animais infestados. Nos animais da Raça Nelore não houve expressão diferencial entre os tratamentos para essa citocina (**Figura 15**).

A intensidade de mensagem para IL-5 apresentou uma tendência de aumento de três vezes quando se comparou animais infestados com os não infestados na Raça Nelore. A Raça Angus não apresentou diferença quando os grupos infestados foram comparados entre si (**Figura 16**).



**Figura 16.** Análise da expressão gênica da citocina IL-5 em linfonodos de bovinos da Raça Angus da Raça Nelore, onde NC corresponde aos bovinos da Raça Nelore que não foram infestados, NT aos bovinos da Raça Nelore que foram infestados, AC que corresponde aos bovinos da Raça Angus que não foram infestados e AT aos bovinos da Raça Angus que foram infestados.

Como esperávamos a expressão para o gene da Beta-actina manteve uma expressão constante em todas as amostras de linfonodos dos bovinos analisados.

Segundo Grecis, 1997, vários trabalhos já demonstraram que a resposta imunológica dos hospedeiros após infecções por nematóides intestinais foi principalmente do tipo Th2, baseados na mensuração de citocinas produzidas pelas células T. Estudos revisando trabalhos sobre infestações por ectoparasitas mostram que o padrão imunológico é o mesmo nesses casos (Wikel, 1999).

Ferreira e Silva (1999), em estudo sobre infestações do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em camundongos, constataram que células do nódulo linfático cultivadas na presença da saliva desse carrapato, demonstraram um perfil de citocinas típico de células Th2, representado pelo aumento dos níveis de interleucina-4 (IL-4), IL-10 e do fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), além de inibição da síntese de IL-2, IL-12 e interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), e sugerem que a consequência de muitas infestações parasíticas, com relação à resistência ou susceptibilidade, é determinada pelo padrão de resposta, envolvendo células T helper (Th) CD4 +. Células Th1 produzem IL-12 e IFN- $\gamma$ , enquanto que as células

Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e essas citocinas podem direcionar as respostas imunes através de diferentes mecanismos efetores (Mossmann e Sad, 1996). Por exemplo, células Th1 promovem ativação de macrófagos e têm sido associadas com hipersensibilidade “delayed-type” (DTH). Por outro lado, células Th2 aumentam o número de eosinófilos, e promovem a síntese de anticorpos. Mais ainda, os produtos das células Th1 e Th2 podem regular negativamente a produção e/ou atividade umas das outras (Mossmann e Moore, 1991). Os macrófagos também produzem citocinas, como a IL-12 e TGF- $\beta$ , além da prostaglandina E2 (PGE2) que pode influenciar e ser influenciada pelos produtos das células T. Desse modo, Ferreira e Silva (1999) acreditam que a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro às infestações por carrapatos deve ser explicada pela modulação induzida pelo carrapato no sistema de citocinas do hospedeiro.

Em um trabalho mais recente, Franzin, 2005, ao estudar a expressão de mRNA de citocinas na pele e linfonodos de cobaias infestados e re-infestados com carrapatos, demonstrou que cobaias sucessivamente infestadas apresentaram um aumento significativo na intensidade da mensagem para IL-12p40 nos linfonodos, tanto comparado com animais uma vez infestados (aumento de 2,4 vezes), quando comparado com os controles (aumento de 13 vezes). Também foi observado um aumento significativo na intensidade da mensagem para IL-5 os linfonodos de cobaias infestadas uma vez quando comparadas aos controles (aumento de 5 vezes), sugerindo o envolvimento predominante de um perfil de citocinas de padrão Th1 na aquisição de resistência em cobaias a carrapatos.

Além do mais, o entendimento das bases moleculares das estratégias utilizadas pelos carrapatos para evadir a proteção do hospedeiro, e os mecanismos imunológicos que levam à proteção do hospedeiro, devem abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de vacinas ou produtos alternativos para controlar os ectoparasitas.

Nesse sentido, o presente trabalho vem através de seus resultados agregar diferenças específicas entre dois tipos de raças economicamente importantes para produção de carne no país.

A adequação dessa técnica como um estudo do perfil de expressão gênica global foi comprovada através da identificação de genes diferencialmente expressos que obtiveram sua expressão adequada ao esperado como verificado através dos genes de IL-5, IL12p40 e de outros que ainda serão confirmados pela técnica de pcr em tempo real.

## VI. CONCLUSÕES

Quando submetidos a infestação por carrapatos, os animais das raças Aberdeen Angus e Nelore apresentam diferentes padrões de expressão gênica no linfonodo.

O perfil da expressão gênica no linfonodo dos animais da raça Aberdeen Angus sugere a existência de uma “assinatura gênica” que poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta biológica as infestações por carrapatos.

Mediante a utilização da tecnologia de *microarrays* foi possível identificar um número significativo de genes diferencialmente expressos no linfonodo de animais infestados, que poderão ser utilizados em estudos associação com a resistência ao carrapato.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, 4th Edition, W.B. Saunders Company, 2000, 378p.
- AL-SHAHROUR, F., MINGUEZ, P., TÁRRAGA, J., MONTANER, D., ALLOZA, E., VAQUERIZAS, J.MM., CONDE, L., BLASCHKE, C., VERA, J. & DOPAZO, J. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments, **Nucleic Acids Research**, **34**, W472-W476, 2006.
- ANDRADE, A.B.F. **Aspectos genéticos e ambientais da resistência a *Boophilus microplus* de bovinos da raça Gir, da estação experimental da Epamig**, Uberaba, MG, Brasil. 1996. 79P. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 1996.
- ANGUITA J, RAMAMOORTHY N, HOVIUS JW ET AL. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. **Immunity** 2002; 16: 849–859.
- BELTRAN, L.G. Características de lá campaña nacional mexicana contra lá garrapata. IN: **Seminário sobre Ectoparasitas**, 1, 1977, Colômbia. Anais... Colombia, 1977. P.77-96.
- BROSSARD, M, WIKEL, S.K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Med Vet Entomol**, V. 11, P. 270-276, 1997.

- BYFORD I, COLDITZ P AND SIBBICK R. A tick resistant dairy breed. **Queensl. Agric. J.** 102: 11-15, 1976.
- CARDOSO, V. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte.** 2000. 108P. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2000.
- CLEVELAND, W.S. & DEVLIN, S.J. Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. **J. Am. Stat. Assoc.** 83, 596–610 (1988).
- CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: Controle ou erradicação.** ALEGRETE : GRALHA, 1996. 130P.
- EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V. 95, P. 14863–14868, 1998.
- FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a t-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, V.96, P.434-439, 1999.
- FONSECA, A.H., PEREIRA, M.J.S., MAFRA, C.L. Dinâmica populacional do carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta-MG, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, V.6, N. 2, SUPL.1, P.121, 1997.
- FRAGA, A.B.; ALENCAR, M.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; CYRILLO, J.N.S.G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da Raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **R. Bras. Zootec.**, V.32, N.6, P.1578-1586, 2003.
- FRANZIN, A.M. **Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalis sanguineus*,** 2005, 68p, Dissertação (Mestrado em

Imunologia Básica e Aplicada), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 2005

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J. Comparative evaluation of beef cattle breed of African, European and Indian origins (ii) resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. **Anim. Sci.**, V.67, P.39-48, 1989.

FRISCH, J.E.; O'NEILL, C.J.; KELLY, M.J. Using genetics to control cattle parasites - the rockhampton experience. **Int. J. Parasitol.**, V.30, P.253-264, 2000.

FURLAN, L.R.; FERRAZ, A.L.J.; BORTOLOSSI, J.C. A Genômica Funcional no âmbito da Produção Animal: estado da arte e perspectivas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Jaboticabal – SP, 2007. R. Bras. Zootec., v.36, suplemento especial, p.331-341, 2007

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from balb/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. **Immunol.**, V.85, P.120-124, 1995.

GONÇALVES, P.M, PASSOS, L.M.F., RIBEIRO, M.F.B. Detection of IGM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Vet Parasitol** 82: 11-17. 1999.

GONZALES, J.C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: **Mestre Jou**, 1974. 101P.

GONZALES, J.C. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre, 80 P. 1993.

GRENCIS, R.K. 1997. Enteric helminth infection: immunopathology and resistance during intestinal nematode infection. **Chem. Immunol.** 66:41.

GUGLIEMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet Parasitol** 57: 109-119 1995.

- HANNIER, S., LIVERSIDGE, J., STERNBERG, J.M. & BOWMAN, A.S. Ixodes ricinus tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in b lymphocytes. **Parasite Immunology** 25, 27–37, 2003.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.** V.82, P.349-360, 2004.
- HEGDE, P.; QI R.; ABERNATHY, K.; GAY, C.; DHARAP, S.; GASPARD, R.; HUGHES, J.E.; SNESRUD, E.; LEE, N. & QUACKENBUSH, J. A concise guide to DNA microarray analysis. **Biotechniques.**, 29(3):548-562,2000.
- HIENDLEDER, S.; BAUERSACHS, S.; BOULESTEIX, A. et al. Functional genomics: tools for improving farm animal health and welfare. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 24 (1), 354-377, 2005.
- HORN, S.C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Bol. Def. San.Ani; Brasília: Ministério da Agricultura;** 1983.
- IPEDATA. **Contas nacionais**, www.ipedata.gov.br (05 OUT. 2004).
- JANEWAY, C.A; TRAVERS, P.; WALPORT, M; SHLOMICHIK, M **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.** 5ed. Porto Alegre: Artemed, 2002. 767p.
- JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology** V.137 P.1–10, 2006
- JONSSON, N.N., HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology** V.146 P.193–198, 2007

- JONSSON, N.N., MILLER, R.J., ROBERTSON, J.L.. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. **Veterinary Parasitology**. 146:307-315,2007.
- KERR, M.K. & CHURCHILL, G.A. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. **Genet Res.**, 77(2):123-8,2001.
- LABRUNA, M.B., LEITE, R.C., OLIVEIRA, P.R. Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, V.92, N.2, P.205-7, 1997.
- LEMOS, A.M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. Juiz de Fora: **EMBRAPA, CNPGL**, 1986. 42P. (DOCUMENTO, 6).
- MADALENA, F.E.; TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. Causes Of Variation Of Field Burdens Of Cattle Ticks (*B.Microplus*). **R. Bras. Genet.**, V.8, N.2, P.361-375, 1985.
- MARQUES, D.C. Criação de bovinos. **Editora da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG, 1969.
- MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. ET AL. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. (Compact Disc) IN: **Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 5., Pirassununga, 2004. Anais. Pirassununga:SBMA, 2004A.
- MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A. ET AL. Associação do gene candidato bola-drb3.2 com resistência a ectoparasitas em bovinos. (Compact Disc). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 41., Campo Grande, 2004. Anais. Campo Grande: SBZ, 2004B

- MBOW, M L, RUTTI, B, BROSSARD, M. Infiltration of CD4+, CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, IA antigens, IL-1  $\alpha$  AND TNF- $\alpha$  in the skin lesion BALB/C mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes Ricinus* I. Ticks. **Immunol**, V. 82, P. 596-602, 1994.
- MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. The role of interleukin-10 in cross regulation of TH1 and TH2 responses. **Immunol. Today**, V.12, P.49-53, 1991.
- MOSMANN, T.R.; SAS, S. The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. **Immunol. Today**, V.17, P.138-146, 1996.
- MUTCH, D.M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **Faseb J.** 19:1602–16. 2005.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzera ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia homonis*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, V.42, P.127-135, 1990.
- OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação Natural. **Pesq. Agropec. Bras.**, V. 24, P.1267-1271, 1989.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C., AMARANTE, A.F., FERRARI, T.B. & NUNES, L.C.. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology** 103, 19–27, (2002).
- OSLEN, O.W. **Animal parasites: their life cycles and ecology**. 3ED. Maryland: University Park Press, 1974. 562P.
- PEGRAM RG, JAMES AD, OOSTERWIJK GP, KILLORN KJ. Studies on the economics of ticks in Zambia. **Exp. Appl. Acarol.** 12: 9-26, 1991

- PEGRAM, R.G., TATCHELL, R.J., DE CASTRO, J.J., CHIZYUKA, H.G.B., CREEK, M.J., MORAN, M.C. AND .NIGARURA, G.. Tick control: New Concepts. *World Anim. Rev.* 74/75: 2–11, 1993
- PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG.*, V.4, 65P, 1990.
- QUEIROZ, D.A. **Estudo do perfil da expressão gênica global em leucemias linfóides agudas de linhagens de células B e T**, 2004, 83p, Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2004
- RADOSTIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. ET AL. **Veterinary medicine: A textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9.ED. Londres: Saunders, 2000. 1877P.
- RIEK RF.. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. *Aust. Vet. J.* 32: 204– 9, 1956.
- RIEK, R.F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res*, V. 13, P.532-50, 1962.
- ROSA, G.J.M, ROCHA, L.B.; FURLAN, L.R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: Delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. *R. Bras. Zootec.*, V.36, suplemento especial, p.185-209, 2007.
- SANTIAGO, A.A. Pecuária de corte no Brasil Central. **Instituto de zootecnia**, São Paulo SP, 1970,636P.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W. ET AL. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA *microarray*. *Science*, 270 (5235), 467- 470, 1995.

- SMYTH, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, V.3, N.1, Article 3, 2004.
- STOREY, J.D. A direct approach to false discovery rates. **J. R. Statist. Soc. B**, 64, 479–498. SYNERGY, 2002
- SUTHERST, R.W, DERR, J.D, MAYWALD, G.F, STEGEMAN, D.A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to tick *Boophilus microplus*. **Aust J Agric Res**, V. 34, P. 329-339, 1983.
- SUTHERST, R.W. & UTECH, K.B.W. In crc handbook of pest management in agriculture vol 2 (Ed. Pimentel, D.) 385–407 (Crc Press, Boca Raton, Florida, 1981).
- TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. Carga parasitária de *Boophilus microplus* em vacas mestiças Europeu x Zebu. **R. Soc. Bras. Zoot.** V.23, P.223-228, 1994.
- TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MOREIRA, D.P.; MADALENA, F.E. Resistência genética dos bovinos ao carrapato (*boophilus microplus*). VII. Resistência De Touros Mestiços Sob Infestação Artificial. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 21, Belo Horizonte, MG, 1984. Anais... Belo Horizonte, MG, P.54. 1984.
- TEODORO, R.L.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; VERNEQUE, R.S. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. IN: **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2004, Pirassununga. Anais, Pirassununga, SP, 2004.

- THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: **Seminário Nacional sobre parasitose dos bovinos, I**. Campo Grande, 1979, P.207-215. Anais, Campo Grande, MS, 1979.
- TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. (OLIVEIRA, P M A TRAD.) 50 Ed., Ed. Roca, São Paulo, 545 P., 1998.
- TUNIN, K.P. **Mapeamento de QTL para característica de resistência a carrapato, peso ao nascimento e peso a desmama no cromossomo 23 de bovinos da geração F2, cruzamento Holandês X Gir**, 2004, 48p, Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2004.
- UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding australian illawarra shorthorn cattle for resistance to *Boophiplus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. **Aust.J.Agric.Res.**, V.29, P.411-422, 1978
- VERÍSSIMO, C.J.; SILVA, R.G.; OLIVEIRA, A.A.D.; RIBEIRO, W.R.; ROCHA, U.F. Resistência e suscetibilidade de bovinos mestiços leiteiros ao carrapato *Boophilus microplus*. **B. Indústria Animal.**, V.54, P. 1-10, 1997.
- VILLARES, J.B. CLIMATOLOGIA ZOOTÉCNICA. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *B. microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, V.4, N.1, P.60-79, JAN/JUN. 1941.
- WAMBURA, P.N.; GWAKISA, P.S.; SILAYO, R.S.; RUGAIMUKAMU, E.A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Vet. Parasitol.** V.77, P.63-70, 1998.
- WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annu Rev Entomol**, V. 41, P. 1-22,1996.
- WIKEL, S.K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int. J. Parasitol**, V. 29, P. 851-859, 1999.

YANG, Y.H.; DUDOIT, S.; LUU, P. ET AL. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, V.30, N.4, ARTICLE E15, 2002.

ZAROS, L.G. **Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos**, 2006, 121p, Tese (Doutorado em Agonomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2006.

## VIII. ANEXO

**ANEXO 1:** Tabela Suplementar 1. Identificação dos genes agrupados nos *clusters* identificados na análise hierárquica dos genes diferencialmente expressos no linfonodo de animais da raça Nelore.

**ANEXO 2:** Tabela Suplementar 2. Identificação dos genes agrupados nos *clusters* identificados na análise hierárquica dos genes diferencialmente expressos no linfonodo de animais da raça Aberdeen Angus.

**Tabela Suplementar 1.** Identificação dos genes agrupados nos *clusters* identificados na análise hierárquica dos genes diferencialmente expressos no linfonodo de animais da raça Nelore.

AGRUPAMENTO	NOME DO GENE
<b>Cluster 1</b>	<p>similar to solute carrier family 22 (organic cation transporter)</p> <p>polyamine N-acetyltransferase</p> <p>similar to protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 5</p> <p>early growth response protein 1</p> <p>similar to snRNP core protein SMX5d</p> <p>lactate dehydrogenase B</p> <p>similar to Pcd7 protein</p> <p>similar to gene CD1 protein - sheep</p> <p>similar to Proteasome subunit beta type 6 precursor (Proteasome delta chain)</p> <p>alpha-kinase 2</p> <p>renin</p> <p>succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa LOC457376</p> <p>itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)</p> <p>folliculin-like 5</p> <p>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1</p> <p>eyes absent homolog 2 (Drosophila)</p> <p>similar to solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier)</p> <p>similar to Adapter-related protein complex 1 sigma 1A subunit (Sigma-adaptin 1A)</p> <p>deoxyribonuclease I</p> <p>similar to 2810048G17Rik protein</p> <p>similar to Chain , P19-Ink4d From Mouse, Nmr, 20 Structures</p> <p>similar to MLN64 N-terminal homolog</p> <p>myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle</p> <p>similar to Sfrs7 protein</p> <p>hypothetical protein MGC29891</p> <p>solute carrier family 4, anion exchanger, member 1</p> <p>immediate early response 2</p> <p>lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)</p> <p>similar to Mitochondrial 28S ribosomal protein S25 (S25mt) (MRP-S25)</p> <p>similar to hypothetical protein LOC509315</p> <p>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa</p> <p>similar to Uridine/cytidine kinase-like 1</p>

H2A histone family, member J  
LOC478678

---

**Cluster 2**

uridine monophosphate synthetase [orotate phosphoribosyl transferase]  
similar to TCF3 protein  
similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18) (K18) (CK 18)  
similar to microtubule-associated protein-2 kinase  
guanine nucleotide binding protein (G protein)  
similar to hypothetical protein FLJ13639  
similar to myosin binding protein C, slow type isoform 1  
5',3'-nucleotidase, mitochondrial  
similar to BBP-like protein 1 isoform a  
similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 (Ubiquitin thiolesterase 5)  
kelch-like 12 (Drosophila)  
similar to RIKEN cDNA 0610009D07  
similar to zinc finger protein 189  
similar to ubiquitin binding protein  
similar to LAP3  
trafficking protein particle complex 1  
similar to ornithine aminotransferase-like 1  
similar to mitochondrial ribosomal protein S10  
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A  
similar to Neural proliferation differentiation and control protein-1 precursor

---

**Cluster 3**

MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1  
similar to carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8  
similar to Putative acyl-CoA thioester hydrolase CGI-16  
chromosome 10 open reading frame 56  
similar to KIAA1752 protein  
similar to CGI-14 protein  
similar to Sialidase 1 precursor (Lysosomal sialidase)  
similar to oxidoreductase UCPA  
zinc finger, CCHC domain containing 10  
similar to proteasome beta 4 subunit  
similar to 40S ribosomal protein S7 (S8)  
E2F transcription factor 4, p107/p130-binding  
similar to dim1  
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1  
ATPase inhibitory factor 1  
similar to FGF receptor activating protein 1  
fibroblast growth factor receptor 4

similar to protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3  
similar to NIF3L1 protein  
sex comb on midleg homolog 1 (Drosophila)  
synaptotagmin XII  
plasminogen activator inhibitor type 1  
similar to cytoplasmic linker 2 isoform 2  
tissue inhibitor of metalloproteinase 2  
ancient ubiquitous protein 1  
similar to semaphorin 6B isoform 3 precursor  
similar to peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase  
KIAA1914  
GABA(A) receptor-associated protein-like 2  
similar to Atp6v0b protein  
similar to transmembrane protein 27  
dystrophin  
similar to Protein KIAA0133  
ring finger protein 166  
similar to CD96 antigen isoform 1 precursor  
similar to mKIAA3021 protein  
similar to sulfatase 2 isoform a precursor  
similar to chromosome 5 open reading frame 16  
filamin A, alpha (actin binding protein 280)  
no hits found  
similar to hypothetical protein  
similar to heat shock transcription factor 2 binding protein  
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial  
similar to RIKEN cDNA 2700038N03  
beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)  
similar to bromo domain-containing protein disrupted in leukemia  
immunoglobulin superfamily, member 8  
similar to HGF activator preproprotein  
barrier to autointegration factor 1  
similar to HSPC049 protein  
protein kinase D1  
similar to WD repeat domain 10 isoform 2  
glioblastoma amplified sequence  
similar to chromosome 6 open reading frame 37  
similar to COMM domain containing 2  
similar to myotubularin-related protein 9  
similar to E3 ubiquitin-protein ligase Nedd-4  
RNA binding motif protein 4  
ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1  
similar to Gap junction beta-4 protein (Connexin 30.3) (Cx30.3)

dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2  
histidine decarboxylase  
similar to RIKEN cDNA 4832428D23  
similar to hypothetical protein  
similar to chromosome 9 open reading frame 112  
similar to HD protein  
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26  
carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD  
KIAA1387 protein  
fragile X mental retardation, autosomal homolog 2  
proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1  
praja 2, RING-H2 motif containing  
nurim (nuclear envelope membrane protein)  
similar to stromal membrane-associated protein  
similar to Neuronal-specific septin 3

---

**Cluster 4**

similar to NFBD1  
similar to chromosome 20 open reading frame 81  
transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)  
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa  
similar to GCAP-I/guanylin precursor  
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2  
DKFZP586B1621 protein  
serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)  
polymerase (DNA directed), alpha 2 (70kD subunit)  
similar to PEST-containing nuclear protein  
LOC515890  
similar to G kinase anchoring protein 1  
LOC456150  
chromosome 2 open reading frame 3  
KIAA1946  
similar to dermatan 4 sulfotransferase 1  
similar to Fc fragment of IgG binding protein  
similar to hypothetical protein C920004D05  
similar to Protease-associated domain-containing protein of 21 kDa precursor  
similar to Regulator of G-protein signaling 19 (RGS19)  
KIAA0528 gene product  
cullin 1  
protein geranylgeranyltransferase type I, beta subunit  
UDP-galactose-4-epimerase  
similar to heat shock 27kDa protein 2  
radical S-adenosyl methionine domain containing 1

similar to KIAA1958  
similar to Mitochondrial carrier protein CGI-69 (PRO2163)  
zona pellucida glycoprotein 3 preproprotein  
L-36 lactose binding protein  
similar to 60S ribosomal protein L26  
similar to S-phase kinase-associated protein 1A isoform b  
pre-mRNA splicing factor-like  
similar to PDZ and LIM domain 4  
yippee-like 5 (Drosophila)  
similar to E2F transcription factor 1  
similar to 1-alpha dynein heavy chain  
no hits found  
similar to Contactin 2 precursor (Axonin-1) (Axonal glycoprotein TAG-1)  
organic anion transporting polypeptide 1b4  
similar to B-cell CLL/lymphoma 9  
similar to Transcriptional repressor CTCF (CCCTC-binding factor)  
similar to myelin P0 protein - bovine  
ubiquitin specific peptidase 46  
similar to Chain B, Tubulin Alpha-Beta Dimer, Electron Diffraction  
dual specificity phosphatase 12  
similar to zinc finger, DHHC domain containing 6  
ARG99 protein  
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa  
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5  
similar to mucolipin 1  
phospholipase A1 member A  
centaurin, gamma 3  
solute carrier family 26, member 11  
thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)  
similar to PHD finger protein 15  
similar to NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2  
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3  
similar to eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1  
sterile alpha motif domain containing 12  
similar to KIAA1662 protein  
similar to cyclin M2 isoform 1  
KIAA0470  
similar to mitochondrial translational release factor 1-like  
alpha 1,4-galactosyltransferase (globotriaosylceramide synthase)  
abhydrolase domain containing 4  
cartilage associated protein  
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4  
similar to UNR protein (N-ras upstream gene protein)

similar to 4930566A11Rik protein  
similar to signal transducing adaptor molecule 1

---

#### Cluster 5

Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (S. cerevisiae)  
Wilms tumor 1  
tyrosylprotein sulfotransferase 2  
similar to tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13  
dual specificity phosphatase and pro isomerase domain containing 1  
similar to EF hand domain family, member A1  
estrogen-related receptor gamma  
leucine rich repeat containing 8  
dipeptidylpeptidase III isoform 1  
similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6  
chromosome 20 (human) open reading frame 54  
similar to N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase like protein  
similar to HMBA-inducible  
similar to Gamma-tubulin complex component 6 (GCP-6)  
solute carrier family 26, member 4  
similar to multiple myeloma overexpression gene 2  
similar to chondroitin sulfate glucuronyltransferase  
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)  
heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1  
similar to NSFL1 (p97) cofactor (p47)  
similar to processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit isoform a  
special AT-rich sequence binding protein 1  
similar to RIKEN cDNA 2510048O06  
similar to ubiquitin specific protease 38  
A kinase (PRKA) anchor protein 3

---

#### Cluster 6

inhibin, beta B (activin AB beta polypeptide)  
no hits found  
transcription factor 21  
similar to semaphorin sem2  
similar to COMM domain containing 7  
Calpastatin  
similar to signal recognition particle 19kDa  
similar to citrate lyase beta like  
similar to Zinc finger protein 184  
family with sequence similarity 54, member B  
similar to heterochromatin protein 1 gamma (HP1-gamma)  
similar to KIAA1398 protein

similar to interleukin 17 receptor D  
similar to chromosome 14 open reading frame 100  
mutL homolog 3 (E. coli)  
similar to plasma membrane calcium ATPase PMCA3  
similar to chromosome 4 open reading frame 15  
BCL2-associated X protein  
similar to selenium binding protein 1  
similar to Leukocyte antigen CD37  
similar to Protein FAM38A  
chromosome 1 open reading frame 119  
similar to Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein (CGI-97)  
similar to zinc finger CCCH type domain containing 1  
sprouty-related, EVH1 domain containing 1  
similar to Serine protease 23 precursor (Putative secreted protein ZSIG13)

---

**Tabela Suplementar 2.** Identificação dos genes agrupados nos *clusters* identificados na análise hierárquica dos genes diferencialmente expressos no linfonodo de animais da raça Aberdeen Angus.

AGRUPAMENTO	NOME DO GENE
<b>Cluster 1</b>	<p>similar to Candidate tumor suppressor in ovarian cancer 2</p> <p>similar to nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1</p> <p>similar to tetratricopeptide repeat domain 21A</p> <p>similar to small nuclear ribonucleoprotein E</p> <p>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4</p> <p>similar to Melanocortin 2 receptor accessory protein</p> <p>similar to tumor suppressor candidate 1</p> <p>LOC457362</p> <p>cullin 1</p> <p>similar to KAONASHI protein 1</p> <p>cytochrome c oxidase subunit VIII, heart</p> <p>similar to CG4502-PA</p> <p>similar to chromosome 14 open reading frame 169</p> <p>furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)</p>
<b>Cluster 2</b>	<p>LOC452211</p> <p>similar to Securin (Pituitary tumor-transforming protein 1) (Tumor transforming protein 1)</p> <p>similar to HIRA protein (TUP1 like enhancer of split protein 1)</p> <p>similar to 4933424N09Rik protein</p> <p>similar to Sterol O-acyltransferase 2 (Cholesterol acyltransferase 2)</p> <p>similar to ubiquitin specific protease 40</p> <p>similar to Kinesin-like protein KIF22 (Kinesin-like DNA-binding protein) B73</p> <p>KIAA1509</p> <p>similar to LanC-like protein 2 (Testis-specific adriamycin sensitivity protein)</p> <p>Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)</p> <p>homeo box B7</p> <p>zinc finger protein 650</p> <p>huntingtin interacting protein 1</p> <p>similar to DNA mismatch repair protein MSH6 (MutS-alpha 160 kDa subunit)</p> <p>Lix1 homolog (mouse)</p> <p>similar to growth arrest-specific 2</p> <p>autoantigen</p> <p>similar to mitochondrial ribosomal protein S9</p>

LOC515129

similar to lymphoid-restricted membrane protein  
ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5  
similar to matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)  
invasion inhibitory protein 45  
similar to nuclear autoantigenic sperm protein isoform 3  
programmed cell death 6  
claudin 2  
similar to Chain A, Crystal Structure Of The Mammalian Tumor Associated Antigen Uk114  
similar to chemokine orphan receptor 1  
similar to homolog of yeast TIM14 isoform a  
chromosome 10 open reading frame 116  
similar to putative NFkB activating protein 373 isoform 1  
similar to ART5 protein  
similar to hypothetical protein  
zygin 1 isoform 1  
similar to small zinc finger-like protein  
similar to G10 protein homolog (EDG-2)  
nucleoporin 214kDa  
similar to kelch-like 21  
splicing factor 3b, subunit 5  
splicing factor 3b, subunit 5  
similar to DNA mismatch repair protein Msh2  
similar to RIKEN cDNA 1110030J09  
hypothetical protein LOC152485  
hemoglobin, beta [beta globin]  
similar to SMF protein  
fibronectin type III domain containing 3B  
similar to Immunoglobulin-binding protein 1  
cellular retinoic acid binding protein 2  
X Kell blood group precursor-related family, member 8  
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1  
similar to arginine/serine-rich splicing factor 6  
immunoglobulin superfamily, member 8  
similar to B-cell receptor-associated protein 29 (BCR-associated protein Bap29)

oligosaccharyltransferase OST48  
murine retrovirus integration site 1 homolog  
similar to Splicing factor 3 subunit 1 (Spliceosome associated protein 114) (SAP 114)  
kynureninase (L-kynurenine hydrolase)

### Cluster 3

transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)

similar to serologically defined colon cancer antigen 1  
similar to STAM binding protein  
similar to LOC389203 protein  
translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (yeast)  
similar to hypothetical protein MGC14141  
solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 2  
similar to U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7  
KIAA0907  
ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3 (UBC4/5 homolog, yeast)  
dipeptidylpeptidase III isoform 1  
similar to Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor  
prefoldin 5  
similar to hypothetical protein MGC9912  
family with sequence similarity 64, member A  
similar to valosin precursor  
regenerating islet-derived family, member 4  
similar to chromosome X open reading frame 15  
phospholipase C, delta 1  
progesterin and adipoQ receptor family member VIII  
similar to WD repeat domain 17 isoform 1  
similar to BTG3 protein (Tob5 protein) (Abundant in neuroepithelium area protein)  
metal-regulatory transcription factor 1  
similar to Tripartite motif protein 38 (RING finger protein 15) (Zinc finger protein RoRet)  
similar to hypothetical protein MGC14156  
similar to arylacetamide deacetylase-like 1  
similar to Tetratricopeptide repeat protein 11 (TPR repeat protein 11) (CGI-135)  
similar to Adipocyte plasma membrane-associated protein (BSCv protein)  
immediate early response 3  
similar to fidgetin-like 1  
eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa  
similar to NAD-dependent deacetylase sirtuin 3, mitochondrial precursor (SIR2-like prot. 3)  
similar to Hypothetical protein KIAA0329/KIAA0297  
amyloid beta (A4) precursor-like protein 2  
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2  
similar to PET112-like  
similar to reticulon 4 isoform C  
plasma membrane proteolipid (plasmolipin)  
similar to Cell division protein kinase 10 (Serine/threonine-protein kinase PISSLRE)  
regulator of chromosome condensation 2  
similar to hypothetical protein D1Ert161e

#### Cluster 4

xylosyltransferase II

similar to Ephrin type-B receptor 4 precursor (Tyrosine-protein kinase receptor HTK)  
similar to Cathepsin W precursor  
similar to downstream of tyrosine kinase 4  
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2  
metadherin  
tweety homolog 1 (Drosophila)  
similar to PPP2CZ protein  
similar to Cell death activator CIDE-3 (Cell death-inducing DFFA-like effector protein C) B289  
similar to ADP-ribosylation factor-like 11  
similar to AMOTL2 protein  
calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit  
sulfide quinone reductase-like (yeast)  
cleavage and polyadenylation specific factor 3-like  
heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)  
similar to C14orf152 protein

#### Cluster 5

similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6  
similar to cisplatin resistance associated  
RAP2C, member of RAS oncogene family  
similar to mKIAA1923 protein  
phospholipase C beta  
similar to Ubiquitin-like protein 4 (Ubiquitin-like protein GDx)  
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide  
heme oxygenase (decyclizing) 1  
similar to cell division cycle 91-like 1 protein  
similar to ADP-ribosylation factor 4-like  
DEAQ box polypeptide 1 (RNA-dependent ATPase)  
similar to ZDHHC3 protein  
myeloid differentiation primary response gene (88)  
similar to Protein AD-016 (CGI-116) (x0009)  
similar to AT rich interactive domain 4B (RBP1- like) isoform 1  
similar to bestrophin  
similar to cirhin  
similar to KIAA1731 protein  
WD repeat and SOCS box-containing 1  
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 [APO-1/CD95 (Fas)-associated phosph+B123.  
similar to hypothetical protein  
zinc and ring finger 1  
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa  
similar to glia maturation factor, gamma  
mitochondrial ribosomal protein S6  
myogenic differentiation 1

similar to Leucine rich repeat containing 4B  
presenilin 2  
transmembrane protein 50B  
actinin, alpha 4  
chromosome 9 open reading frame 77  
tripartite motif-containing 45  
similar to Neuroligin 3 precursor (Gliotactin homolog)  
similar to Zinc finger protein Helios  
hyaluronan binding protein 2  
similar to Cell death activator CIDE-B (Cell death-inducing DFFA-like effector B)  
similar to chemokine (C-C motif) receptor 9 isoform A  
similar to RIKEN cDNA 5830406J20  
similar to 60S ribosomal protein L23a  
similar to NADPH cytochrome B5 oxidoreductase  
similar to Serum amyloid A protein (SAA)  
similar to KIAA0423 protein  
fibrinogen, gamma polypeptide  
stress-associated endoplasmic reticulum protein 1  
delta-like homolog (Drosophila)  
transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6  
similar to CCR4-NOT transcription complex, subunit 10  
MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A (yeast)  
LOC512013  
similar to leucine rich repeat containing 16  
similar to Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK (P56-LCK) (LSK)  
similar to ganglioside induced differentiation associated protein 2  
similar to Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1 (hPOP1)  
sodium channel, voltage-gated, type I, beta  
similar to TNFRSF1A-associated via death domain isoform 1

#### Cluster 6

cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa  
prenylated Rab acceptor 1  
similar to Pentaxin-related protein PTX3 precursor (TNF -inducible protein TSG-14)  
chromatin modifying protein 4A  
glycogen synthase kinase 3 beta  
benzodiazepine receptor (peripheral)  
trophinin associated protein (tastin)  
similar to Proteasome beta 1 subunit  
coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)  
similar to chromosome 10 open reading frame 26  
similar to DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9  
similar to Tissue alpha-L-fucosidase precursor (Alpha-L-fucosidase I)

transglutaminase 1  
RNA binding motif protein 20  
DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1  
similar to Carbonic anhydrase XIII (Carbonate dehydratase XIII) (CA-XIII)  
hypothetical protein DKFZp762F0713  
mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B14.7  
chromosome 10 open reading frame 9  
ARP3 (actin-related protein 3, yeast) homolog  
similar to otolin-1  
carnitine deficiency-associated, expressed in ventricle 1  
similar to hypothetical protein BC007540  
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)  
similar to Calgranulin A

#### Cluster 7

similar to pancreatic lipase  
SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1  
similar to putative transcription factor  
similar to CGI-77 protein  
similar to Translocation protein SEC63 homolog  
coactosin-like 1 (Dictyostelium)  
similar to K562 cell-derived leucine-zipper-like protein 1  
similar to leucine-rich protein 157  
similar to Ly6/Plaur domain containing 1  
similar to ankyrin repeat domain 27 (VPS9 domain)  
similar to extra spindle poles like 1  
similar to Peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1 (PRAX-1)  
early growth response protein 1  
similar to Chain A, Crystal Structure Of Bovine Retinal Creatine Kinase  
similar to Transmembrane protein 8 precursor (M83 protein)  
similar to hypothetical protein FLJ10665  
similar to polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1  
Williams-Beuren syndrome chromosome region 1  
similar to Aurora-A kinase interacting protein  
similar to apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death  
similar to hypothetical protein FLJ20551  
LOC536712  
similar to forssman synthetase  
likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene  
zinc finger protein 217  
similar to erythrocyte protein band 4.1-like 1 isoform L  
proteasome activator subunit 2  
insulin-like growth factor binding protein 5

exocyst complex component 7  
nucleosome assembly protein 1-like 4  
similar to ALS2 C-terminal like isoform 1  
hypothetical protein BC012882  
similar to hypothetical protein MGC10911  
similar to inter-alpha-trypsin inhibitor heavy-chain H1  
similar to ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1  
metaxin 1  
similar to Mtvr2 protein  
immunoglobulin superfamily, member 4  
dynactin 4  
similar to OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1  
similar to hypothetical protein  
similar to kallikrein 10 precursor  
similar to RIKEN cDNA 2700067D09  
similar to transaldolase 1  
similar to mKIAA1206 protein  
SCC-112 protein  
up-regulated gene 4  
nucleoporin 205kDa  
SEC13-like 1 (*S. cerevisiae*)  
splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa  
similar to hypothetical protein  
general transcription factor IIA, 2, 12kDa  
similar to Cell division cycle 2-related protein kinase 7 (CDC2-related protein kinase 7)  
transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)  
similar to High density lipoprotein binding protein  
RaP2 interacting protein 8  
similar to Sjogrens syndrome/scleroderma autoantigen 1  
similar to alpha-smooth muscle actin  
similar to ADP-sugar pyrophosphatase (Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 5)  
similar to ATP-binding cassette, sub-family F, member 2 isoform b  
hypothetical protein FLJ30656  
similar to cell division cycle 25B isoform 1  
similar to FLJ00210 protein  
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)  
similar to exocyst complex 84-kDa subunit  
selectin E [endothelial adhesion molecule 1]  
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative  
neurochondrin  
mitogen-activated protein kinase 14  
glutamate dehydrogenase 1  
RIKEN cDNA 5730445M16 gene

## Cluster 8

Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b  
similar to tubulin, epsilon 1  
tousled-like kinase 1  
similar to KIAA0723 protein  
similar to RIKEN cDNA B230339H12  
similar to queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase);  
similar to zinc finger protein-like 1  
similar to Myosin light polypeptide 3  
smooth muscle calponin h1  
similar to EF hand domain family, member A1  
similar to mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 isoform 1  
similar to Lethal(3)malignant brain tumor-like protein (L(3)mbt-like)+B167  
similar to chromodomain helicase DNA binding protein 4  
similar to docking protein 3  
ataxin 2-like  
integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)  
similar to hypothetical protein  
similar to numb homolog (Drosophila)-like  
immunoglobulin J chain  
similar to ARV1 homolog  
similar to 28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor (S16mt) (MRP-S16) (CGI-132)  
similar to PX19 homolog  
similar to BCL2L12 protein  
zinc finger, CCHC domain containing 2  
proton-dependent gastrointestinal peptide transporter  
similar to SCY1-like 2 protein  
similar to Nuclear pore glycoprotein p62 (62 kDa nucleoporin)  
similar to BCL2 binding component 3  
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma  
ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)  
similar to ZFP1 protein  
similar to Ubiquitin-like 1 activating enzyme E1A (SUMO-1 activating enzyme subunit 1)  
craniofacial development protein 1  
similar to KIAA0975 protein  
G-protein coupled receptor 173  
protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF)  
similar to DEAD-box protein abstract homolog (DEAD-box protein 41)  
similar to Ras-related protein Rab-40B (SOCS box containing protein RAR)  
cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)  
peroxiredoxin 4  
similar to KIAA0586 protein

Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (*S. cerevisiae*)  
LOC514231

similar to Ras-related protein Rab-24

similar to chromosome 14 open reading frame 43

reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs

dedicator of cytokinesis 1

similar to myosin IXA

KIAA1411

similar to RIKEN cDNA 0610009D07

similar to KIAA1787 protein isoform 2

splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa

chromosome 2 open reading frame 28

fumarate hydratase

similar to Sulfotransferase 1C2 (SULT1C) (SULT1C#2)

#### **Cluster 9**

similar to mitochondrial ribosomal protein L52 isoform a

tissue factor pathway inhibitor 2

sorting nexin 13

---