UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Karoline Biffi

Avaliação de assinaturas gênicas relacionadas ao perfil de resistência
e suscetibilidade às infestações por carrapatos *Rhipicephalus*
microplus

Ribeirão Preto - SP

2015

KAROLINE BIFFI

Avaliação de assinaturas gênicas relacionadas ao perfil de resistência e suscetibilidade às infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Kinney
Ferreira de Miranda Santos

Ribeirão Preto – SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Biffi, Karoline

Avaliação de assinaturas gênicas relacionadas ao perfil de resistência e suscetibilidade às infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus*; Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos – Ribeirão Preto, São Paulo, 2015.

94 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2015

1. Assinatura gênica. 2. Nanostring. 3. Resistência e suscetibilidade.

Nome: **Karoline Biffi**

Título: Avaliação de assinaturas gênicas relacionadas ao perfil de resistência e suscetibilidade às infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof Dr: Geraldo Aleixo da Silva Passos Junior

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof Dr: Ricardo Toshio Fujiwara

Julgamento:_____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, José e Amália, por me oferecerem um dos maiores e melhores bens – o estudo. Sempre acreditaram na minha capacidade, e me apoiaram em tudo. Obrigada pelo amor incondicional. Saiba que sem vocês seria impossível alcançar mais essa vitória.

À minha irmã, Keila, ao meu cunhado Kauê, que mesmo distante sempre me impulsionaram em direção às vitórias de meus desafios, e a minha pequena “grande” sobrinha Sofia que faz os meus dias mais felizes.

À Profª Drª Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, minha orientadora, por ter me mostrado o caminho da ciência e ser um exemplo profissional.

Aos irmãos que Deus colocou em minha vida, Alessandra Franzin, Josiane Carvalho, Naira Ferreira Anchieta, Alexandre Ignácio de Souza, Sandra Maruyama, Rafael Cazarotti, Amanda Zangirolamo, Gustavo Zampieri e Dorlei Santos.

A todos meus colegas do laboratório pelas colaborações nos experimentos e pela amizade que levarei para sempre.

Aos meus amigos e confidentes Mariany Marcondes, Simone Preto e Vinícius Noronha, muito obrigada por tudo.

Ao meu grande amigo e companheiro de todos os dias, Biscoito.

Aos professores, funcionários e amigos da pós-graduação e da Faculdade de Medicina.

À secretária da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristina, e ao secretário do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Ronaldo, por brilhar muito na secretaria.

À banca avaliadora pela participação e pela disponibilidade.

À Drª Maria Eugênia Z. Mercadante, do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho – SP, e ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga (FZEA/USP) pelo apoio nas coletas.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

*“A coisa mais bela que o homem pode
experimentalizar é o mistério.
É essa emoção fundamental que está na raiz
de toda ciência e arte.”*

Arbert Einstein

BIFFI, K. **Avaliação de assinaturas gênicas relacionadas ao perfil de resistência e suscetibilidade às infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus*** 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

As infestações por *Rhipicephalus microplus*, conhecido como o carrapato do boi, causam enormes prejuízos econômicos na produção de gado na região tropical e países subtropicais em todo o mundo. O método atual de controle do ectoparasito depende exclusivamente de produtos tóxicos como os acaricidas, que deixam resíduos no meio ambiente e seu uso contínuo tem provocado o aparecimento de carrapatos resistentes, sendo, portanto, de pouca eficácia. O grupo de pesquisa em carrapatos da FMRP-USP tria antígenos candidatos que foram testados em vacinação experimental feita em bovinos, utilizando formulação antigênica multicomponente. Baseando-se nos resultados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico de bovinos vacinados, que identificou genes diferencialmente expressos, cuja expressão é afetada pelas infestações e a partir do transcriptoma da pele de bovinos da raça Nelore e Holandês, o presente estudo tem objetivo avaliar, através da técnica Nanostring, genes que possam ser empregados em testes para identificar bovinos geneticamente resistentes ao carrapato e comparar com os dados já obtidos dos transcriptomas de sangue periférico e de pele. Foi analisada a expressão gênica de leucócitos de sangue periférico de vacas da raça holandesa pouco e muito infestada, e da raça nelore durante períodos de baixa e alta infestação natural por carrapatos. Os dados obtidos mostraram que a infestação modulou um número maior de genes nos holandeses muito infestados do que nas outras raças. De acordo com a análise funcional realizada dos genes diferencialmente expressos (DEGs) encontrados pode-se observar uma possível relação do perfil de expressão gênica dos holandeses com a imunidade inata, ao passo que o perfil de expressão gênica encontrado na raça nelore pode estar relacionado tanto com a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa. Dessa forma, avaliando o perfil de resistência e suscetibilidade, este trabalho sugere que os genes CXCL6, S100A8 (Calgranulina A) TYRP1, IgM, ELANE, CCL19, PDGFRL, VCAM1, NOX1 e CEBPE, podem ser possíveis assinaturas gênicas relacionadas a resistência ou suscetibilidade.

Keywords: Resistência e suscetibilidade, Nanostring, carrapato, assinaturas gênicas.

BIFFI, K. **Evaluation of genes signatures related to resistance and susceptibility of bovine infested with ticks *Rhipicephalus microplus***. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Infestations with the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, cause huge economic losses in cattle production in tropical and subtropical countries worldwide. Control of ticks and tick-borne diseases of livestock depends almost exclusively of chemical control, such as use of acaricides, which leads to environmental concerns and due to their continued use, has generated resistance mechanisms in ticks, presenting steadily decreasing efficiency in controlling tick infestations. The research group of ticks of FMRP-USP selects new antigens that were tested in an experimental immunization, using a multicomponent antigen formulation. Based on the transcriptome results from peripheral blood leukocytes from vaccinated cattle, which identified genes whose expression is affected by infestations, and from the skin transcriptome of Nelore and Holstein bovine, the aim of this project is evaluate, by Nanostring technology, genes that may be used in tests to identify genetically resistant cattle to bovine tick and compare with the data already obtained from peripheral blood transcriptome and skin transcriptome. Gene expression was analyzed in peripheral blood of Holstein (much infested or less infested), and Nelore during periods of low and high natural infestation of ticks. The results showed that a greater number of genes were modulated in Holstein than the other breeds. According to the functional analysis of differentially expressed genes (DEGs) it can be observed a possible correlation from Holstein's profile with innate immunity, while the gene expression profile found in Nelore can be related both with the innate and adaptive immunity. Thus, evaluating the resistance and susceptibility profile, this work suggests that genes CXCL6, S100A8 (Calgranulin A) TYRP1, IgM, ELANE, CCL19, PDGFRL, VCAM1, NOX1 and CEBPE may be possible gene signatures related to resistance or susceptibility.

Keywords: Resistance and susceptibility, Nanostring, tick, genes signatures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de ANDREOTTI e MALAVARI, 2001	16
Figura 2 - Fluxograma do delineamento experimental conduzido neste trabalho. HPB-S: Holandês muito infestado, HPB-R: Holandês pouco infestado, NEL: Nelore.....	22
Figura 3 - Fotos abrangendo a região posterior e de inserção do úbere de animais HPB demonstrando scores de carrapatos nos níveis de 0 a 4.....	23
Figura 4 - <i>Heat map</i> dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo)	39
Figura 5 - <i>Heat map</i> dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Intra grupo)	40
Figura 6 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo)	41
Figura 7 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo)	43
Figura 8 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Intra grupo)	44
Figura 9 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico (Intra grupo)	45
Figura 10 - <i>Heat map</i> dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma pele (Entre grupos).....	60

Figura 11 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupo)	61
Figura 12 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupos).....	62
Figura 13 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupos).....	63
Figura 14 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptomade pele (Entre grupos).....	64
Figura 15 - <i>Heat map</i> dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos)	67
Figura 16 - Diagramas de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico (Entre grupo)	68
Figura 17 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos)	69
Figura 18 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos).	70
Figura 19 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação intra grupo com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo).....	30
Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação intra grupo com dados do transcriptoma leucócitos do sangue periférico (Intra grupo).....	33
Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação intra grupo com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo).....	47
Tabela 4 - Genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre grupos com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos).....	51
Tabela 5 - Análise comparativa dos DEGs encontrados no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e pele com genes alvos determinados por Nanostring	73
Tabela 6 - Genes diferencialmente expressos, nas raças Nelore e Holandês, nos experimentos transcriptoma de sangue periférico, transcriptoma de pele e de bovinos infestados naturalmente	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Funções dos genes diferencialmente expressos do transcriptoma de pele. Os genes foram classificados em 25 grupos de acordo com a função definida pelas bases de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do GO (Gene Ontology).....	27
Gráfico 2 - Funções dos genes diferencialmente expressos no transcriptoma de sangue periférico. Os genes foram classificados em 25 grupos de acordo com a função definida pelas bases de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do GO (Gene Ontology)	28
Gráfico 3 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de pele e bovinos infestado naturalmente (Intra grupos).....	83
Gráfico 4 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e bovinos infestado naturalmente (Intra grupos).....	84
Gráfico 5 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de pele e bovinos infestados naturalmente (Entre grupos).....	85
Gráfico 6 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e bovinos infestados naturalmente (Entre grupos) ..	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

R. Microplus - *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

DEGs – Genes diferencialmente expressos

HPB-S – Holandês muito infestado

HPB-R – Holandês pouco infestado

NEL – Nelore

BI – Período de baixa infestação

AI – Período de alta infestação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
1.2 A interface carrapato/hospedeiro	17
1.3 Estudos de expressão gênica em bovinos infestados com carrapato	18
1.4 Expressão gênica por meio da tecnologia Nanostring	18
1.5 Estudos prévios e escolha dos genes candidatos	19
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 Amostras de sangue total periférico	22
3.2 Extração de RNA	24
3.3 Expressão gênica por Nanostring	24
3.4 Análise dos dados de expressão gênica	25
3.5 Análise de função	25
4. RESULTADOS	27
4.1 Critérios de escolha dos genes alvos para determinar as assinaturas gênicas relacionadas à resistência e suscetibilidade ao <i>R. microplus</i> em bovinos Holandês e Nelore	27
4.2 Efeito da infestação em cada grupo de bovinos (Nelore, Holandês muito infestado e Holandês pouco infestado)	28
4.3 As diferenças entre os grupos de bovinos na resposta ao carrapato	46
4.4 Comparações dos DEGs encontrados no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e pele com genes alvos determinados por Nanostring	72
4.5 Comparações dos valores de expressão dos DEGs no transcriptoma de pele e sangue periférico com DEGs obtidos na análise Intra e Entre raças	82
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÃO	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios, amplamente distribuídos em todo o mundo e transmitem patógenos que afetam a saúde pública e animal. O carrapato *Rhipicephalus microplus* é uma ameaça importante na produção de gado na região tropical e países subtropicais em todo o mundo, podendo causar sérios prejuízos econômicos. Estes carrapatos parasitam preferencialmente o gado bovino e as infestações exercem efeitos adversos sobre o hospedeiro, que resultam na perda de peso e anemia, um sintoma comum de uma forte infestação (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; KASHINO *et al.*, 2005; PIPER *et al.*, 2009).

O controle de infestações por carrapatos mostra-se difícil, uma vez que esses ectoparasitas possuem poucos inimigos naturais. Os métodos tradicionais de controle de carrapatos são o uso de produtos químicos, com resultados parcialmente bons. Entretanto este método possui alguns inconvenientes, tais como, o surgimento de carrapatos resistentes a diversos acaricidas em razão ao uso contínuo, a contaminação ambiental e problemas de resíduos. Com isso uma solução mais direta e sustentável para o controle de infestações é necessário (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; PIPER *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 1995).

O sangue é o único alimento nutritivo que os carrapatos precisam e se alimentam. A hematofagia está relacionada com a evolução de vários componentes da saliva do carrapato, como anticoagulantes, antiplaquetas e moléculas vasodilatadoras, cuja função é ajudar o parasita a superar a defesa do hospedeiro contra a perda de sangue, ou seja, a hemostase e o desenvolvimento de reações inflamatórias no local da picada. Além disso, a saliva possui fatores que modulam a inflamação do hospedeiro, e a imunidade do hospedeiro. Torna-se claro, então, que a saliva do carrapato contém uma matriz extraordinária de proteínas salivares que desarticulam as ações que poderiam prejudicar a alimentação do parasita (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; RIBEIRO J.M., 1995).

Francischetti e colaboradores (2005) identificaram duas novas atividades biológicas da saliva, entre elas a inibição da proliferação de células endoteliais e da angiogênese, esta última definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de existentes. A molécula cuja função é responsável por essas ações é uma metaloprotease.

Estudos *in vitro* demonstraram que as proteínas de glândulas salivares de *R. microplus* pode inibir a função imunológica das células mononucleares. A resposta proliferativa das células mononucleares bovinas à estimulação com PHA (mitógeno de linfócitos T) foi inibida quando adicionado proteínas da glândula salivar de carrapato (INOKUMA, H., R. L. KERLIN, D. H. KEMP, P. WILLADSEN, 1993).

O ciclo de vida do carrapato *R. Microplus* divide-se em uma fase de vida livre e uma fase parasitária (Figura 1). A fase de vida livre se inicia após a queda da teleógina ingurgitada, e dura em médio dois a três dias. Posteriormente inicia-se a fase de ovipostura, cuja duração gira em torno de 17 dias e é seguida da fase de eclosão, cuja duração pode ser de cinco a dez dias, podendo, no entanto, durar até mais de 100 dias. Após a eclosão das larvas fase parasitária inicia-se quando a larva infestante se instala no hospedeiro e dura em torno de 21 dias (GONZALES, 1974).

Figura 1 - Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de ANDREOTTI e MALAVARI, 2001.

1.2 A interface carrapato/hospedeiro

As raças bovinas *Bos taurus indicus* são mais resistentes ao *R. microplus* do que as raças *B. taurus. taurus*, porém pode haver considerável variação na resistência entre e dentro das raças. Embora a imunidade inata decorrente de diferenças genéticas entre *B.t. indicus* e *B.t. taurus* e seja importante para demonstrar se um animal será resistente à infestação, o desenvolvimento de uma imunidade adquirida eficaz tem papel fundamental na resistência ao carrapato, uma vez que o nível mais elevado de resistência torna-se aparente somente depois de um período de infestação. Portanto, tem sido proposto como um método viável no controle de carrapatos a imunidade adquirida naturalmente, devido à redução potencial nos gastos com acaricidas e utilização de produtos químicos. Isto é possível devido a exposição prolongada ao ectoparasita e também em grande parte devido reações cutâneas alérgicas no hospedeiro (KASHINO *et al.*, 2005; PIPER *et al.*, 2009; WILLADSEN *et al.*, 1995).

Os carrapatos estimulam imunorregulação do hospedeiro e vias efetoras envolvendo células apresentadoras de antígenos, citocinas, células B e células T, anticorpos circulantes, ativação do complemento, granulócitos e uma série de outras moléculas biologicamente ativas (RIBEIRO J.M., 1995).

Para completar a sua alimentação de sangue o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* permanece em seu hospedeiro por vários dias. O desafio para o sistema imunológico começa no momento em que os aparelhos bucais do carrapato são inseridos na pele, provocando o rompimento dessa barreira física, causando tanto dano físico como químico. As primeiras células presentes nesse contato são leucócitos residentes na epiderme e derme, como mastócitos, eosinófilos, células dendríticas e macrófagos. Estas células liberam mediadores, além de produzir fatores quimiotáticos para recrutar células inflamatórias, como neutrófilos, para o local de fixação do carrapato (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). Durante a análise da resposta imune no sítio de fixação do carrapato na pele de bovinos resistentes ou suscetíveis às infestações foi

observado que a pele infestada de animais resistentes apresentou quantidade significativamente maior de basófilos, linfócitos T CD4 e linfócitos B, quando comparado com a pele infestada de animais suscetíveis, sugerindo que essas diferenças na composição do infiltrado celular estejam envolvidas na aquisição de resistência ao carrapato (FRANZIN A.M., 2009).

1.3. Estudos de expressão gênica em bovinos infestados com carrapatos

Atualmente com o avanço das tecnologias genômicas e perfilamento de expressão gênica, tem sido possível estudar mais a fundo os processos envolvidos durante a infestação de bovinos com *R. Microplus*, o qual resulta em diferentes níveis de resistência. Piper e colaboradores (2008) ao avaliar a expressão gênica na pele de bovinos *Bos indicus* e *Bos Taurus* descobriram que 15 genes foram mais expressos em biopsias de pele infestadas da raça Holandesa quando comparados com biopsias de pele não infestadas. Tais genes demonstraram que em bovinos *Bos Taurus* houve uma resposta inflamatória mediada por células.

Outro estudo da expressão gênica de bovinos *Bos indicus* e *Bos Taurus* utilizando a tecnologia Microarray, mostrou que há diferença nos perfis de expressão gênica de sangue periférico destas duas raças. Bovinos *Bos indicus* demonstrou perfil consistente com uma resposta mediada por células T, enquanto que bovinos *Bos taurus* obteve perfil compatível com resposta inflamatória inata (PIPER E.K. *et al.*, 2009).

1.4. Expressão gênica por meio da tecnologia Nanostring

Nanostring é uma metodologia recentemente desenvolvida que avalia a expressão gênica a partir de pequenas quantidades de mRNA e é altamente reprodutível (GEISS, G. K. *et al.*, 2008). Esse método é mais sensível do que Microarrays porque é baseada em hibridização, não necessitando da conversão do mRNA em cDNA através da transcrição reversa ou da amplificação do cDNA através de PCR (KULKARNI, M.

M., 2011; GEISS, G. K. *et al.*, 2008). O ensaio se baseia na detecção digital direta de moléculas de mRNA de interesse, utilizando pares de sondas que possuem sequências específicas dirigidas ao mRNA de interesse (KULKARNI, M. M., 2011). Além disso, esse método fornece o número absoluto de cópias de mRNA para cada gene de interesse em cada amostra, dispensando validação dos níveis de expressão gênica por meio de RT-PCR quantitativo.

1.5. Estudos prévios e escolha dos genes candidatos

O grupo de pesquisa de carrapatos da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, o qual estuda a imunobiologia das infestações em busca de desenvolver uma vacina anti-carrapato ou outras tecnologias de controle, obteve o transcriptoma de leucócitos de sangue periférico de bovinos vacinados e infestados ou somente infestados, bem como o transcriptoma de peles de bovinos artificialmente infestados. Esses estudos identificaram genes cuja expressão foi afetada pelas infestações e estão relacionados com a interação carrapato/hospedeiro.

Para a realização do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico, as amostras de sangue foram coletadas de vacas da raça Holandesa (suscetíveis às infestações de carrapato) as quais foram imunizados com proteínas recombinantes, provenientes de antígenos salivares de *R. microplus*, e posteriormente foram desafiadas por meio de infestação artificial com larvas de *R. microplus*. Os animais foram mantidos confinados em baias durante o experimento para evitar infestação natural antes do desafio. O transcriptoma foi realizado pela tecnologia RNA-seq, utilizando plataforma de sequenciamento Illumina, e os dados gerados foram analisados por ferramentas de bioinformática para identificação de genes diferencialmente expressos (MARUYAMA, S.R. *et al.*, 2013). Os controles consistiam de animais que receberam apenas alúmen, o adjuvante empregado na formulação da vacina. Amostras foram coletadas de todos animais antes de receberem adjuvante ou vacina.

Para a realização do transcriptoma de pele, foram coletadas biopsias de peles não infestadas e infestadas com larva e ninfa de bezerros da raça Holandesa e Nelore. Os

animais foram mantidos semi-confinados e a infestação foi feita artificialmente. O transcriptoma foi realizado por meio de Microarray utilizando a tecnologia da Affymetrix GeneChip. A detecção de sinal de cada gene foi obtida usando *robust multiarray average* (RMA), uma função do Affy package. Os dados gerados também foram analisados por ferramentas de bioinformática e foram realizadas comparações entre as raças Holandês e Nelore nos diferentes estágios do carrapato (larva e ninfa), e comparações intra raças para identificação dos genes diferencialmente expressos nas diferentes comparações. (FRANZIN A.M *et al.*, dados não publicados).

A partir desses estudos prévios de transcriptoma foram gerados mais de mil genes diferencialmente expressos (DEG, de differentially expressed gene em inglês) e os genes candidatos a serem validados neste estudo (159) foram escolhidos baseado naqueles que estavam mais *up* e *down* regulados e envolvidos em processos biológicos relevantes para a resposta ao carrapato. Foram escolhidos 105 genes candidatos do transcriptoma de sangue periférico e 54 genes candidatos do transcriptoma de pele para a realização deste trabalho, com a finalidade de entender e descobrir se esses perfis de expressão gênica obtidos se mantêm em animais de populações distintas e ainda manejados em situações de produção normal durante a infestação natural.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

1) Avaliar a expressão de genes relacionados à infestação natural em uma população amostral distinta para comparar com os dados de expressão gênica já obtidos nos transcriptomas de leucócitos do sangue periférico e pele infestadas.

2) Avaliar assinaturas gênicas associadas à resistência e susceptibilidade às infestações por carrapatos.

3) METODOLOGIA

O delineamento experimental usado para obtenção das amostras analisadas está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma do delineamento experimental conduzido neste trabalho. HPB-S: Holandês muito infestado, HPB-R: Holandês pouco infestado, NEL: Nelore.

3.1 Amostras de sangue total periférico

A coleta foi realizada durante períodos de alta infestação natural dos bovinos e foram obtidas 12 amostras de sangue de vacas leiteiras da raça Holandês Preto e Branco (que sofrem maior infestação, HPB-S), 12 amostras de vacas leiteiras da raça Holandês

Preto e Branco (que sofrem menor infestação, HPB-R) e 12 amostras da raça Nelore (resistentes, NEL). A escolha das vacas que sofrem maior ou menor infestação (HPB-S e HPB-R) foi realizada baseando-se nos valores de scores entre 0 a 4, como demonstrado na Figura 3. Vacas holandesas, as quais foram consideradas menos infestadas possuíam score de 0 a 2, e vacas holandesas consideradas mais infestadas possuíam score de 3 a 4. Como o fotoperíodo afeta o crescimento de pelos (FAVARATO E.S, CONCEIÇÃO L.G., 2008) e outros processos fisiológicos do bovino, potencialmente interferindo nas infestações, as amostras foram coletadas na mesma época do ano. Posteriormente, foi coletado sangue dos mesmos animais, porém durante o período de baixa infestação com carrapato. As amostras coletadas dos bovinos da raça Holandês foram obtidas do Instituto de Zootecnia da USP de Pirassununga- SP e as amostras dos bovinos da raça Nelore foram obtidas do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho-SP.

Figura 3 – Fotos abrangendo a região posterior e de inserção do úbere de animais HPB demonstrando scores de carrapatos nos níveis de 0 a 4.

A coleta de sangue foi feita com o sistema a vácuo a partir da veia jugular dos animais em tubos PAXgene Blood RNA (PreAnalytix, Suíça). Os tubos PAXgene Blood RNA são destinados a coleta de sangue total e possibilitam a estabilização do RNA e o protegem da degradação por RNases. Em conjunto com o kit PAXgene RNA Blood permite uma extração eficiente do RNA.

3.2 Extração de RNA

A extração de RNA de sangue total (amostras de 2,5 mL) foi realizada com o kit PAXgene RNA Blood (PreAnalytix, Suíça) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de sangue total periférico foram coletadas em tubos PAXgene Blood RNA e incubadas por duas horas a temperatura ambiente, posteriormente foram mantidas por 24 horas a -20°C e posteriormente estocadas a -70°C até o uso. As amostras foram descongeladas por uma hora, centrifugadas para sedimentar os ácidos nucleicos no tubo e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado, ressuspensionado e incubado em tampões otimizados, juntamente com proteinase K, para a digestão de proteínas. Uma centrifugação adicional foi realizada para remover os restos celulares e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Posteriormente adicionou-se etanol para agregar o RNA, e o lisado foi transferido para uma coluna, a qual possui uma membrana de sílica-gel onde o RNA possui afinidade facilitando a sua ligação. Os contaminantes remanescentes foram removidos em três passos de lavagem e o RNA foi então eluído.

O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Wilmington, DE) e a integridade do RNA analisada por meio de eletroforese capilar em chip com o instrumento 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA).

3.3 Nanostring

Todas as 72 amostras de RNA foram enviadas para Universidade do Tennessee Health Science Center, Memphis, Tennessee - EUA para a realização da técnica Nanostring de análise de expressão gênica. Resumidamente, é feita uma biblioteca de sondas específicas para cada um dos genes de interesse. A primeira sonda, a sonda de captura contém uma sequência complementar a um mRNA de interesse acoplado a um marcador, que nesse caso é a biotina. A segunda sonda, a sonda repórter, contém uma

sequência complementar ao mRNA de interesse e possui um marcador de cor na sua extremidade, o qual vai permitir a detecção das sondas. As sondas são então misturadas com o mRNA de interesse e há uma reação de hibridização, cujo resultado se dá na formação de um mRNA de interesse ligado a sonda repórter e a sonda de captura. As sondas que não hibridizaram são removidas pelo processo de lavagem e as sondas que se ligaram são capturadas e imobilizadas. Cada molécula alvo de interesse é identificada pela cor gerada e o nível de expressão é medido por contagem do número de cores para cada mRNA (GEISS, G. K. *et al.*, 2008).

3.4 Análise dos dados de expressão gênica

Os dados obtidos da expressão dos genes das raças Holandês e Nelore infestadas naturalmente foram normalizados com os genes *housekeeping* ACTB e GAPDH. Esses dados normalizados foram analisados através do programa Data Annotation and Processing Tool (Metacore, Thomson Reuters), o qual permitiu originar os genes diferencialmente expressos (DEGs). O programa Data Annotation and Processing Tool é uma ferramenta do software Metacore, a database para análise funcional de dados. Essa ferramenta possibilita a análise estatística de dados de expressão gênica.

Os dados brutos de análise da expressão gênica foram inseridos no Data Annotation and Processing Tool, o programa permite realizar a análise estatística para encontrar genes com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de comparação de interesse. O teste estatístico utilizado foi o teste-t, o valor de p-value $\leq 0,05$ foi usado para estabelecer os níveis de significância e $\log_2$ fold change de 1 a -1.

Para a construção dos Heat Maps foi utilizado o programa MeV (Multi Experiment Viewer) e foi empregada a clusterização hierárquica, essa ferramenta de clusterização permite o agrupamento de genes de acordo com os valores de expressão gênica gerados.

3.5 Análise de função

A análise de função dos genes diferencialmente expressos obtidos das diferentes comparações foi realizada através do software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). O Metacore é uma plataforma computacional que permite a

integração e análises especializadas de diferentes tipos de dados experimentais e possui uma base de dados de alta qualidade. Por meio desse software é possível compreender a função dos genes diferencialmente expressos, analisar as vias de sinalização na qual eles fazem parte e realizar a análise de enriquecimento dessas vias de sinalização. Ele é baseado em bancos de dados de três tipos, o bando de dados de humanos, de camundongos e de ratos. Uma vez que os dados são de genes bovinos, em todas as análises funcionais foram utilizados os genes ortólogos humanos correspondentes, pois sabe-se, a partir do sequenciamento do genoma de bovinos, que os mesmos possuem maior similaridade com os ortólogos humanos (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM *et al.*, 2009).

4. RESULTADOS

4.1 Critérios de escolha dos genes alvos para determinar as assinaturas gênicas relacionadas à resistência e suscetibilidade ao *R. microplus* em bovinos Holandês e Nelore

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de pele e no transcriptoma de sangue periférico demonstraram diversas funções, as quais podem ser observadas nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

Gráfico 1 – Funções dos genes diferencialmente expressos do transcriptoma de pele. Os genes foram classificados em 25 grupos de acordo com a função definida pelas bases de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do GO (Gene Ontology)

Gráfico 2 – Funções dos genes diferencialmente expressos no transcriptoma de sangue periférico. Os genes foram classificados em 25 grupos de acordo com a função definida pelas bases de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do GO (Gene Ontology).

Os genes do transcriptoma da pele e do sangue periférico foram classificados em 25 grupos de acordo com a função estabelecida pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) e pelo GO (gene Ontology). Os grupos mais relevantes na pele foram os genes de imunidade inata (14,10%), os de matriz extracelular (11,37%), os de metabolismo oxidativo (8,57%), os de linfócitos B e T (5,65%) e os de quimiocinas (5,22%). Já os grupos mais relevantes no sangue periférico foram os genes de linfócitos T e B (10,42%), os de ubiquitina (6,18%), os de matriz extracelular (5,79%) e os de imunidade inata (5,41%). Os genes alvos foram escolhidos de acordo com a relevância da função para a imunidade do hospedeiro e/ou o nível de expressão.

4.2 Efeito da infestação em cada grupo de bovinos (Nelore, Holandês muito infestado e Holandês pouco infestado)

Para entender qual o papel da infestação em cada grupo, foram realizadas comparações intra raça, ou seja, comparação entre bovinos Holandeses muito infestados com carrapato (HPB-S) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), comparação entre bovinos Holandeses pouco infestados (HPB-R) no período de baixa (BI) e alta

infestação (AI), e comparação entre bovinos Nelore (NEL) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), considerando como grupo de referência os bovinos no período de alta infestação.

A partir dos genes candidatos escolhidos do transcriptoma da pele (59 genes candidatos) foram obtidos 28 genes diferencialmente expressos, os quais podem ser observados na tabela 1 e no *Heat map* apresentado na figura 4. Com relação aos genes candidatos do transcriptoma do sangue periférico (109 genes candidatos) foram obtidos 49 genes diferencialmente expressos nessa comparação, os quais podem ser observados na tabela 2 e no *Heat map* apresentado na figura 5.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação intra grupo com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo).

Gene Symbol	Gene Title	Log2 FC*		
		HPB-S AI x HPB-S BI ^a	HPB-R AI x HPB-R BI ^b	NEL AI x NEL BI ^c
ABP1	Amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	2,67	1,65	-
ALOX12E	Arachidonate lipoxygenase, epidermal	1,82	-	-
ATF3	Activating transcription factor 3	1,47	-	-
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	2,21	-	-
CD209	CD209 molecule	2,06	-	-
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,81	-	-
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	1,92	-	-
				1,53
CYP2B6	Cytochrome P450 subfamily 2B	2,03	-	-
ELANE	Elastase, neutrophil expressed	2,07	1,53	-

FOSB	Protein fosB	1,53	-	-
H2B	Histone H2B-like	1,69	-	-
H4	Histone H4	2,36	1,83	-
HOXA9	HOXA9 protein	1,90	-	-
IBSP	Bone sialoprotein 2	2,25	1,43	-
IL1B	Interleukin 1, beta	1,89	-	-
MAB21L1	Protein mab-21-like 1	2,05	-	-1,40
MIR6508	MicroRNA mir-6518	2,14	-	-
MPO	Myeloperoxidase	1,74	1,49	-
PDGFRL	Platelet-derived growth factor receptor-like	-	-	-1,62
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit	-	1,33	-
PNRC2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2	1,59	1,32	-
PON3	Paraoxonase 3	2,54	1,50	-

PTGDS	Prostaglandin D2 synthase 21kDa	2,60	-	-
S100A8	S100 calcium binding protein A8	1,82	1,63	-
SULT1E1	Sulfotransferase family 1E, estrogen- preferring, member	2,42	-	-
SYT4	Synaptotagmin IV	1,51	-	-
TDH	L-threonine 3-dehydrogenase, mitochondrial	1,97	1,58	-
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	1,82	1,75	-1,29

^aComparação entre bovinos HPB muito infestados ao carrapato no período de alta e baixa infestação (HPB-S). ^bComparação entre bovinos HPB pouco infestados ao carrapato no período de alta e baixa infestação (HPB-R). ^cComparação entre bovinos Nelore período de alta e baixa infestação (NEL). Valores negativos e positivos indicam que a expressão dos genes está down ou up regulada em relação aos bovinos no período de alta infestação, FC: *Fold change*.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação intra grupo com dados do transcriptoma leucócitos do sangue periférico (Intra grupo).

Gene Symbol	Gene Title	Log2 FC		
		HPB-S AIxHPB-S BI ^{a*}	HPB-R AIxHPB-R BI ^{b*}	NEL AIxNEL BI ^c
AIF1	Allograft inflammatory factor 1	1,64	-	-
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	1,66	1,54	-
BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2	2,01	-	-
CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	1,72	-	-
CD163L1	CD163 molecule-like 1	1,73	-	-
CD7	T-cell antigen CD7 precursor	1,41	-	-
CDH10	Cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	2,09	-	-
CDHR5	Cadherin-related family member 5 precursor	1,63	-	-

CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	-	-	-1,50
CGGBP1	CGG triplet repeat-binding protein 1	1,53	1,40	-
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1	1,38	1,45	-
CTSL1	Cathepsin L1	2,08	-	-
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,81	1,75	-
DGAT2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	1,93	1,66	-
DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B-like	1,79	-	-
ENTPD2	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	1,50	-	-
GPR35	G protein-coupled receptor 35	1,69	-	-
GPX3	Glutathione peroxidase 3	1,81	-	-
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	1,85	-	-

HBB	Hemoglobin, beta	3,44	-	-
HES4	Hes family bHLH transcription factor 4	1,94	-	-
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	-	1,61	-
IgM	IgM constant region	-2,14	-	-
IPMK	Inositol polyphosphate multikinase	1,37	1,36	-
ITGB4	Integrin, beta 4	1,93	-	-
KLHDC1	Kelch domain containing 1	-	1,43	-
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	1,96	-	-
LAG3	Lymphocyte activation gene 3 protein precursor	1,50	-	-
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2,06	1,71	-
MAP4K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	1,74	-	-

MMEL1	Membrane metallo- endopeptidase-like 1	2,30	-	-
MS4A2	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	1,86	-	-
NFAT5	Nuclear factor of activated T- cells 5, tonicity-responsive	1,42	1,48	-
NFE2L3	Nuclear factor (erythroid- derived 2)-like 3	1,42	1,23	-
NOX1	NADPH oxidase 1	1,65	1,65	-
OGN	Osteoglycin	1,96	1,60	-
PALM3	Paralemmin 3	1,69	1,32	-
PAX5	Paired box 5	1,82	1,44	-
SCAMP1	Secretory carrier membrane protein 1	1,43	1,32	-
SGPP1	Sphingosine 1-phosphate phosphatase 1	1,34	1,28	-
SLC39A10	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	1,38	1,37	-

SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	2,03	-	-
SNRNP200	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase-like	1,46	-	-
SNX10	Sorting nexin 10	1,79	1,38	-
TLR10	Toll-like receptor 10	1,92	-	-
TMED5	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	1,63	1,41	-
TMEM41B	Transmembrane protein 41B	1,59	1,30	-
TP53INP1	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	1,37	1,35	-
TRAPPC9	Trafficking protein particle complex 9	1,45	1,40	-
TRAT1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	1,97	1,40	-

TRPM7	Tripartite motif containing 2	-	1,40	-
WC1	CD163 molecule-like 1	1,66	-	-

^aComparação entre bovinos HPB muito infestados ao carrapato no período de alta e baixa infestação (HPB-S). ^bComparação entre bovinos HPB pouco infestados ao carrapato no período de baixa infestação (HPB-S). ^cComparação entre bovinos Nelore antes da infestação com bovinos Nelores depois da infestação (NEL). Valores negativos e positivos indicam que a expressão dos genes está down ou up regulada em relação aos bovinos no período de alta infestação, FC: *Fold change*.

Figura 4 - Heat map dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo). Método de clusterização hierárquica usando *Euclidean Distance*. Escala de cores representa valores de $\log_2$ fold change. Genes com o nível de expressão aumentada estão representados em vermelho, genes com o nível de expressão diminuído estão representados em verde. Programa utilizado MultiExperiment Viewer (MeV). HPB-R: Holandês pouco infestado, HPB-S: Holandês muito infestado, NEL: Nelore.

Figura 5 - Heat map dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Intra grupo). Método de clusterização hierárquica usando *Euclidean Distance*. Escala de cores representa valores de $\log_2$ fold change. Genes com o nível de expressão aumentada estão representados em vermelho, genes com o nível de expressão diminuído estão representados em verde. Programa utilizado MultiExperiment Viewer (MeV). HPB-R: Holandês pouco infestado, HPB-S: Holandês muito infestado, NEL: Nelore.

Como pode ser observado nos dois *Heat maps* apresentados, a infestação modulou mais genes relacionados aos grupos de bovinos Holandeses muito infestados (HPB-S) e bovinos Holandeses pouco infestados (HPB-R) do que bovinos Nelore (NEL). Através da clusterização hierárquica empregada nos *Heat maps* podemos observar que o perfil de expressão gênica da raça Holandesa pouco infestada (HPB-R) assemelhou-se mais com a raça Nelore (NEL) quando comparado com ambos experimentos de transcriptoma.

Considerando a comparação entre DEGs provenientes do transcriptoma de pele, podemos observar por meio do diagrama de Venn, ilustrado na figura 6, que há apenas um gene em comum com todas as comparações, o gene TYRP1. Este gene possui função que envolve a biossíntese de melanina, e se apresentou com nível de expressão aumentado na raça Holandesa pouco e muito infestada (HPB-R e HPB-S) e com nível de expressão na raça Nelore (NEL).

Figura 6 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo). HPB-S BI X HPB-S AI: Comparação entre Holandês muito infestado no

período de baixa e alta infestação, HPB-R BI X HPB-R AI: Comparação entre Holandês pouco infestado no período de baixa e alta infestação, NEL BI X NEL AI: Comparação entre Nelore no período de baixa e alta infestação.

Um dado interessante são os genes CXCL6 e MAB21L1, que possuem um padrão misto de expressão, isto é, durante a infestação os mesmos genes se apresentaram up-regulados na raça Holandesa muito infestada (HPB-S) e down-regulados na raça Nelore (NEL). O gene CXCL6 está relacionado com o recrutamento de neutrófilos para o local da infestação e o gene MAB21L1 está relacionado com proliferação celular, portanto localmente esses dois genes mostram que a raça Holandesa muito infestada recruta mais células para o local da infestação do que a raça Nelore.

Outro resultado interessante foi o gene PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor-like, em inglês) que se apresentou down-regulado pela infestação somente em bovinos Nelore, e está relacionado com a estimulação do crescimento de células.

A análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de pele, feita pelo software Metacore, pode ser vista na figura 7. A rede analisada destes DEGs obtidos demonstraram duas redes mais significantes, a primeira relacionada com a via de sinalização do *toll like receptor* 10 e *toll like receptor* 5 ($P = 2.24 \times 10^{-6}$), e a segunda rede relacionada com processo de sinalização do *toll like receptor* dependente de MyD88 ($P = 1.47 \times 10^{-3}$). As duas redes foram combinadas e resultou em uma via composta por DEGs como IL1-beta, a qual foi up-regulada pela infestação em Holandeses pouco infestados (HPB-S), a Calgranulina A (S100A8) que foi up-regulada em Holandeses pouco e muito infestados (HPB-S e HPB-R), e os genes CXCL6 e TYRP1 que apresentaram perfil de expressão misto.

Figura 7 – Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Intra grupo). A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos vermelhos: genes com nível de expressão aumentado, Círculos azuis: genes com nível de expressão diminuído. Genes IL-1 beta, Calgranulina A (S100A8) em vermelho estão com nível de expressão aumentado no Holandês muito infestado (HPB-S); Gene CXCL6 possui um padrão misto de expressão, com nível de expressão aumentado no Holandês muito infestado e com nível de expressão diminuído no Nelore (NEL); Gene TYRP1 está com nível de expressão aumentado no Holandês pouco e muito infestado (HPB-R, HPB-S) e com nível de expressão diminuído no Nelore (NEL).

Através dessa análise pode-se perceber que o gene da IL-1 beta é ativado pelo fator de transcrição NF-kB, e STAT1, os quais também podem ativar a produção de IL-2 e CXCL6, que foi up-regulado em Holandeses muito infestados (HPB-S) e down-regulado em Nelore (HPB-S). O gene CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2, em inglês) é um quimiotático importante de neutrófilos, e a IL-2 é uma citocina que promove a proliferação de linfócitos T.

Outro dado interessante que pode ser visto é que a IL-2 e o gene CXCL6 vão gerar cascatas de sinalização, as quais vão ativar o fator de transcrição AP-1, que por sua vez ativará o gene da Calgranulina A (S100A8), o qual se apresenta up-regulado nos holandeses pouco e muito infestados. Este gene é sintetizado por neutrófilos e monócitos no sangue periférico, e quando combinado com a Calgranulina B (S100A9) forma um complexo que regula a função das células mieloides (DONATO, 2001).

Por meio da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico podemos observar no diagrama de Venn, na figura 8, que não há genes em comum com as comparações feitas.

Figura 8 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Intra grupo). HPB-S BI X HPB-S AI: Comparação entre Holandês muito infestado no período de baixa e alta infestação, HPB-R BI X HPB-R AI: Comparação entre Holandês pouco infestado no período de baixa e alta infestação, NEL BI X NEL AI: Comparação entre Nelore no período de baixa e alta infestação.

A infestação modulou o gene CEBPE somente na raça Nelore, cuja função está relacionada com a proliferação celular, e a proteína codificada por esse gene pode ser essencial para a diferenciação e maturação das células progenitoras de granulócitos. E o

mesmo ocorre com o gene IgM, porém na raça Holandesa muito infestada (HPB-S). A maioria dos DEGs encontrados tiveram sua expressão aumentada pela infestação nos grupos HPB-R e HPB-S.

A análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de leucócitos de sangue, a qual pode ser vista na figura 9, demonstrou três redes mais significantes. A primeira rede esta relacionada com regulação positiva de processos metabólicos e vias de sinalização regulada pela resposta imune ($P = 1.07^{e-15}$), a segunda rede esta relacionada com resposta inflamatória, resposta imune inata e resposta a ferimentos ($P = 1.47^{e-09}$), e a terceira rede esta relacionada com filamentos de actina-miosina e contração celular mediada por actina ($P = 1.26^{e-04}$).

Figura 9 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico (Intra grupo). A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculo em vermelho: genes com níveis de expressão aumentado. Os genes NOX1, TRPM7, BIRC3, TMED5, SCAMP1, TP53IN1 tiveram níveis de expressão aumentado em Holandeses pouco e muito infestados (HPB-R e HPB-S).

4.3 As diferenças entre os grupos de bovinos na resposta ao carrapato

Para entender a influência das características genéticas em cada grupo na aquisição de resistência, foram realizadas comparações entre os grupos, ou seja, comparação entre bovinos Holandeses pouco infestados ao carrapato (HPB-R) com Holandeses muito infestado (HPB-S) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), comparação entre bovinos Nelore (NEL) com Holandeses pouco infestado ao carrapato (HPB-R) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), e comparação entre bovinos Nelore (NEL) com Holandeses muito infestados (HPB-S) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), considerando como grupo de referência os bovinos Holandeses pouco infestados (HPB-R) e bovino Nelore (NEL).

A partir dos genes candidatos do transcriptoma da pele (54 genes candidatos) foram obtidos 45 genes diferencialmente expressos, os quais podem ser observados na tabela 3 e no *Heat map* apresentado na figura 10. A partir dos genes candidatos do transcriptoma do sangue periférico (105 genes candidatos) foram obtidos 84 genes diferencialmente expressos nessa comparação, os quais podem ser observados na tabela 4 e no *Heat map* apresentado na figura 11.

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre grupos com dados do transcriptoma pele (Entre grupos).

Gene Symbol	Gene Title	Log2 FC					
		HPB-RxHPB-S BI ^a	HPB-RxHPB-S AI ^b	NELxHPB-S BI ^c	NELxHPB-S AI ^d	NELxHPB-R BI ^e	NELxHPB-R AI ^f
A2M	Alpha-2-macroglobulin	-	-	-	1,61	1,49	1,68
ABP1	Amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	1,42	-	1,35	-1,76	-	-1,54
ALOX12E	Arachidonate lipoxygenase, epidermal	-	-	1,50	-	-	-1,48
ANKFY1	Ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	-	-	1,58	-	1,34	-
ATF3	Activating transcription factor 3	-	-	-1,32	-1,56	-1,65	-1,54
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	1,75	-	2,66	-	-	-
CD14	CD14 molecule	-	-	-	1,90	-	1,76
CD209	CD209 molecule	-	-	-	-2,17	-1,56	-1,62
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,67	-	1,87	-	-	-
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	1,80	-	1,93	-1,52	-	-1,36

CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	-	-	2,51	1,87	2,07	1,60
CYP2B6	Cytochrome P450 subfamily 2B	1,64	-	2,15	-	-	-
DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	-	-	3,33	2,38	2,56	1,86
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	-	-	2,15	1,43	1,47	-
ELANE	Elastase, neutrophil expressed	-	-	1,54	-1,72	1,49	-
FOS	Proto-oncogene c-Fos	-	-	-	-1,54	-	-1,66
FOSB	Protein fosB	-	-	-	-1,33	-	-1,26
H2B	Histone H2B-like	1,52	-	2,09	1,53	1,37	1,44
H4	Histone H4	1,56	-	3,32	-	2,13	-
HOXA9	HOXA9 protein	-	-	1,92	-	-	-
HP	Haptoglobin	-	-	-1,75	-	-2,27	-2,29
IBSP	Bone sialoprotein 2	-	-	1,89	-	1,35	-
IL1B	Interleukin 1, beta	-	-	-	-2,63	-	-2,46
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-	-	2,03	2,14	2,04	1,94

LAP	Lingual antimicrobial peptide	-	-	-	-	-	-1,71
LTF	Lactotransferrin	-	-	2,48	-	1,50	-
MAB21L1	Protein mab-21-like 1	1,92	-	3,23	-	1,67	-
MIR6508	MicroRNA 6508	-	-	1,85	-	-	-
MPO	Myeloperoxidase	-	-	-	-2,16	-	-2,37
NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2	-	-	1,63	-	1,48	-
NCF4	Neutrophil cytosolic factor 4	-	-	2,04	1,77	1,74	1,50
NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like	-	-	1,54	1,61	1,57	1,51
PDGFRL	Platelet-derived growth factor receptor-like	-	-	2,04	-	-	-
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit	-	-	2,09	1,48	1,80	1,25
PNRC2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2	-	-	1,93	-	1,58	-
PON3	Paraoxonase 3	-	-	1,55	-1,79	-	-1,57
PTGDS	Prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	1,66	-	2,48	-	1,49	-

PTX3	Pentraxin-related protein PTX3 precursor	-	-	-2,20	-	-3,03	-3,19
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-	-	-	-	-	-2,21
S100A9	S100 calcium binding protein A9	-	-	-	-	-	-1,83
SULT1E1	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member	2,58	-	2,64	-	-	-
SYT4	Synaptotagmin IV	-	-	2,48	-	2,10	-
TDH	L-threonine 3-dehydrogenase, mitochondrial	1,37	-	1,72	-	-	-1,41
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	-	-	1,60	-1,45	1,43	-1,59
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	-	-1,89	-	-	-	-

^{a,b}Comparação entre bovinos Holandês pouco infestados (HPB-R) ao carrapato com Holandês muito infestados (HPB-S) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), ^{c,d}Comparação entre bovinos Nelores (Nel) com Holandês pouco infestados (HPB-R) ao carrapato no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), ^{e,f}Comparação entre bovinos Nelore com Holandês muito infestados (HPB-S) ao carrapato no período de baixa (BI) e alta infestação (AI). Valores negativos e positivos indicam que a expressão dos genes está up ou down regulada em relação aos bovinos Holandês pouco infestado (HPB-R) e Nelore, FC: *Fold change*.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos provenientes da comparação entre grupos com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos).

Gene Symbol	Gene Title	Log2 FC					
		HPB-RxHPB-S BI ^a	HPB-RxHPB-S AI ^b	NELxHPB-S BI ^c	NELxHPB-S AI ^d	NELxHPB-R BI ^e	NELxHPB-R AI ^f
ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	-	-	1,37	-	1,36	-
ACE	Angiotensin I converting enzyme	-	-	-	-1,85	-2,02	-2,21
AIF1	Allograft inflammatory factor 1	-	-	1,58	-	1,37	-
BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	-	-	1,86	1,56	1,69	-
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	-	-	2,22	-	1,94	-
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	-	-	2,87	1,89	2,31	1,43
BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2	-	1,32	1,63	-	1,31	-
C1QA	Complement component 1, q subcomponent, A chain	-	-	-1,52	-1,99	-2,61	-2,23
C1QB	Complement component 1, q subcomponent, B chain	-	-	-1,69	-2,14	-2,98	-2,53

C1QC	Complement component 1, q subcomponent, C chain	-	-	-1,72	-1,94	-2,87	-2,33
CABIN1	Calcineurin binding protein 1	-	-	1,79	1,63	1,58	1,42
CAD	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	-	-	1,85	2,24	1,57	1,58
CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	-1,53	-	1,55	-	-	-
CCDC9	Coiled-coil domain containing 9	-	-	1,49	1,50	1,27	1,27
CD163L1	CD163 molecule-like 1	-	1,59	-	-1,63	2,02	-
CD38	CD38 molecule	-	-	3,11	1,88	2,41	1,56
CD7	T-cell antigen CD7 precursor	-	-	-	-	1,40	-
CDH10	Cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	-	-	1,76	-	-	-
CDHR5	Cadherin-related family member 5 precursor	-	-	-	-1,58	-	-
CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	-	-	-	-2,30	-	-2,54

CEP250	Centrosomal protein 250kDa	-	-	2,39	1,92	2,12	1,62
CFB	Complement factor B	-	-	2,19	2,35	1,66	1,78
CGGBP1	CGG triplet repeat-binding protein 1	-	-	1,87	-	1,61	-
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain (CHORD) containing 1	-	-	1,87	-	1,65	-
CRISPLD2	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-	-	-1,97	-2,17	-2,43	-2,73
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-	-	5,15	2,50	4,03	2,02
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-	1,61	-	-2,16	-	-
DGAT2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	-	-	1,72	-1,88	-1,59	-2,09
DHX58	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58	-	-	2,16	1,83	1,72	1,67
DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B-like	-1,70	-	4,29	2,02	2,52	-
EBF1	Class A basic helix-loop-helix protein 15-like	-	-	4,29	3,05	3,11	1,98

ENTPD2	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	-	-	1,51	-	-	-
FAM46C	Family with sequence similarity 46, member C	-	-	-1,38	-	-	-
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	-	-	-	-	-	-1,68
GPR35	G protein-coupled receptor 35	-	-	1,47	-	1,77	-
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-	-	2,03	-	-	-
HBB	Hemoglobin, beta	-	2,22	-	-4,35	-	-1,96
HIST1H1C	Histone cluster 1, H1c	-	-1,68	-	-1,53	-1,83	-2,57
HRH4	Histamine receptor H4	-	-	-	-5,00	-3,11	-4,72
IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27	-	-	8,92	3,37	3,22	4,10
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	-	-	2,07	-	-	-
IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	-	-	2,36	-	2,04	2,03
IGLL1	Immunoglobulin lambda-like	-	-	3,13	2,75	1,96	2,28

	polypeptide 1						
IgM	IgM constant region	1,35	-	-	3,68	1,54	3,42
IPMK	Inositol polyphosphate multikinase	-	-	1,41	-	-	-1,26
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	-	-	-	-	-	-1,78
ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	-	-	-	-	-	-1,36
ITGB4	Integrin, beta 4	-1,72	-	1,91	-	-	-
KLHDC1	Kelch domain containing 1	-	-	2,90	1,71	2,43	-
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	-	-	1,40	-1,63	-	-
LAG3	Lymphocyte activation gene 3 protein precursor	-	1,71	1,41	-	1,67	1,60
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	-	-	3,36	-	3,54	1,59
MAP4K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	-1,76	-	6,27	3,01	-	2,14
MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	-	-	1,68	1,39	1,67	1,40
MMEL1	Membrane metallo-endopeptidase- like 1	-	-	1,79	-1,63	-	-

MS4A2	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	-1,61	-	-	-	-	-
MX2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	-	-	-	2,03	-	-
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	-	-	2,33	1,42	2,27	1,33
NFE2L3	Nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 3	-	-	1,67	-	1,79	1,55
NOX1	NADPH oxidase 1	-1,78	-1,79	5,15	2,55	2,89	-
OGN	Osteoglycin	1,62	1,97	2,71	-	4,38	2,82
PACAP	Marginal zone B and B1 cell- specific protein	-	-	-	-	-	1,91
PACS1	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	-	-	1,34	-	1,36	-
PALM3	Paralemmin 3	-1,29	-	1,62	-	-	-
PAX5	Paired box 5	-1,40	-	3,71	1,82	2,66	1,65
POLRMT	Polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	-	-	2,12	2,13	1,85	1,76

PRKAR2B	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	-	-	1,89	-	1,97	1,80
SCAMP1	Secretory carrier membrane protein 1	-	-	2,08	-	1,75	-
SDS	Serine dehydratase	-	-	-1,37	-1,93	-1,63	-2,08
SGPP1	Sphingosine 1-phosphate phosphatase 1	-	-	1,85	1,35	1,53	-
SLC39A10	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	-	-	2,62	1,78	2,12	1,46
SLX4	SLX4 structure-specific endonuclease subunit homolog (S, cerevisiae)	-	-	2,31	1,63	2,53	1,85
SNRNP200	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase-like	-	-	-	1,72	-	1,41
SNX10	Sorting nexin 10	-	-	1,65	-	1,50	-
TIEG2	Kruppel-like factor 11	-2,32	-2,89	-	-	-1,75	-1,90
TLR10	Toll-like receptor 10	-1,42	-	3,32	-	2,34	1,54

TMED5	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	-	-	2,04	-	1,60	-
TMEM41B	Transmembrane protein 41B	-	-	2,20	-	1,92	1,36
TP53INP1	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-	-	1,41	-	1,34	-
TRAPPC9	Trafficking protein particle complex 9	-	-	2,52	1,64	2,11	1,42
TRIM2	Tripartite motif containing 2	-1,86	-2,01	5,12	3,06	2,76	-
TRPM7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	-	-	2,86	1,95	2,53	1,53
UBA7	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	-	-	-	-	-1,59	-1,39
WC1	CD163 molecule-like 1	-	-	-	-1,55	-	-

^{a,b} Comparação entre bovinos Holandeses pouco infestados (HPB-R) ao carrapato com Holandeses muito infestados (HPB-S) no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), ^{c,d} Comparação entre bovinos Nelores (NEL) com Holandeses pouco infestados (HPB-R) ao carrapato no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), ^{e,f} Comparação entre bovinos Nelore (NEL) com Holandeses muito infestados (HPB-R) ao carrapato no período de baixa (BI) e alta infestação (AI), Valores negativos e positivos indicam que a expressão dos genes está up ou down regulada em relação aos bovinos Holandeses pouco infestado (HPB-R) e Nelores (NEL), FC: *Fold change*.

Através do *Heat Map* apresentado na figura 10 podemos observar que a clusterização hierárquica das comparações feitas entre Nelores e Holandeses pouco e muito infestados, se agrupam de acordo com o período da infestação, portanto a comparação Neloire com Holandeses pouco infestados em um período de baixa infestação (NELxHPB-R BI) obteve um perfil de expressão gênica muito parecido quando são comparados Neloire com Holandeses muito infestados em um período de baixa infestação (NELxHPB-S BI). Isso também é visto na comparação feita com o período de alta infestação. Podemos analisar também que o perfil de resistência dos Nelores, independente do período de infestação se assemelha ao perfil de resistência do Holandês pouco infestado quando analisado em um período de baixa infestação.

Outro dado interessante também é que o gene VCAM1, o qual está relacionado com adesão celular, apresentou-se down-regulado somente na comparação entre Holandeses pouco infestados e Holandeses muito infestados no período de alta infestação (HPB-RxHPB-S AI).

Figura 10 - Heat map dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma pele (Entre grupos). Método de clusterização hierárquica usando *Euclidean Distance*. Escala de cores representa valores de $\log_2$ fold change. Genes com o nível de expressão aumentada estão representados em vermelho, genes com o nível de expressão diminuído estão representados em verde. Programa utilizado MultiExperiment Viewer (MeV).

Por meio do diagrama de Venn, representado na figura 11, o qual mostra os genes compartilhados nas comparações de bovinos Nelore com Holandês muito e pouco infestado nos períodos de alta e baixa infestação, podemos perceber que oito genes são comuns entre as comparações.

Figura 11 - Diagrama de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupo). Comparação entre Nelore com Holandês muito infestado no período de baixa (NELxHPB-S BI) e alta infestação (NELxHPB-S AI), e Nelore com Holandês pouco infestado no período de baixa (NELxHPB-R BI) e alta infestação (NELxHPB-R AI).

A análise funcional dos genes diferencialmente expressos provenientes da comparação com o transcriptoma de pele, considerando os grupos Holandeses pouco infestados (HPB-R) e Holandeses muito infestados (HPB-S) no período de baixa e alta infestação, que pode ser vista na Figura 12, demonstrou três redes mais significantes. A primeira rede esta relacionada com via de sinalização de receptor de serotonina, migração de leucócitos e resposta a estímulos celulares ($P = 6.80 \times 10^{-12}$), a segunda rede esta relacionada com adesão celular e migração de leucócitos ($P = 2.76 \times 10^{-04}$), e a terceira rede esta relacionada com via de sinalização da proteína G e via de sinalização do receptor de superfície celular ($P = 3.16 \times 10^{-06}$).

Figura 12 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupos). Comparação entre Holandês pouco infestado (HPB-R) e Holandês muito infestado (HPB-S) no período de baixa e alta infestação. A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

Essa análise mostrou que o gene CCL19, o qual desempenha um papel importante na migração de linfócitos T e de linfócitos B nos órgãos linfóides secundários e CXCL2 e CXCL6 que são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, vão desencadear diretamente a ativação da proteína G, a qual vai culminar na ativação de genes que estão relacionados com o recrutamento de neutrófilos, NCF4 e NCF2 (Círculo preto na figura 12), portanto nos holandeses pouco infestados (HPB-R) há a up-regulação destes genes que estão relacionados com a imunidade inata.

Ao passo que o único gene que se mostrou com nível de expressão gênica diminuído nos Holandeses pouco infestados (HPB-R), portanto apresenta nível de expressão aumentado no suscetível (HPB-S) foi o VCAM1, que está relacionado com a adesão celular. Portanto podemos perceber que os holandeses pouco infestados respondem mais as infestações do que o holandês suscetível.

Já na análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de pele, considerando os grupos NEL, HPB-R, HPB-S, que pode ser vista na figura 13, demonstrou três redes mais significantes. A primeira rede esta relacionada com via de sinalização da proteína G e processos do sistema circulatório ($P = 2.24 \times 10^{-13}$), a segunda rede esta relacionada com regulação positiva de processos metabólicos de macromoléculas, resposta celular ao estímulo do fator de crescimento e regulação positiva de processos biológicos ($P = 2.24 \times 10^{-13}$), e a terceira rede esta relacionada com transdução de sinal intracelular e via de sinalização tirosina quinase ($P = 6.48 \times 10^{-11}$).

Figura 13 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupos). Comparação entre Nelore (NEL) com Holandês pouco (HPB-R) e muito infestado HPB-S) no período de baixa e alta infestação. A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

Essa análise funcional mostrou que através da ativação dos receptores do tipo toll, TLR2 e TLR4, os quais podem estar sendo ativados pela saliva do carrapato, há a geração de uma cascata de sinalização, via MyD88, que resultará na ativação direta do fator de transcrição AP-1. A partir da ativação deste fator de transcrição serão ativados genes que tiveram sua expressão aumentada no bovino resistente como, por exemplo, o gene PTGDS, o qual está relacionado com a contração do músculo e é um potente inibidor da agregação de plaquetas.

Além destas análises, foi realizada outra análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de pele, mas considerando agora todos os grupos juntos (HPB-R, HPB-S, NEL), a qual pode ser vista na figura 14. A primeira rede está relacionada imunidade inata, ativação da via de sinalização do toll like receptor 10 e resposta imunológica ($P = 1.54 \times 10^{-13}$), a segunda rede está relacionada com via de sinalização do toll like receptor 2 e via de sinalização do toll like receptor mediada por MyD88 ($P = 6.19 \times 10^{-16}$).

Figura 14 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de pele (Entre grupos). A análise funcional foi feita com software Metacore

(<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

Essa análise funcional mostrou que genes como NCF4 e NCF2, que foram up-regulados nos resistentes, e o gene CXCL2, também up-regulado nos resistentes, pode estar relacionado com a quimiotaxia de linfócitos T e também de neutrófilos.

Através do *Heat map* apresentado dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico, Figura 15, podemos observar que a clusterização hierárquica mostra que o perfil da resistência na comparação NELxHPB-R e com NELxHPB-S se assemelham durante o período de alta e baixa infestação. E o perfil de expressão na comparação dos HPB-RxHPB-S se assemelham também antes e depois da infestação. Há muito mais genes com a expressão aumentada no Nelore do que nos Holandeses tanto no período de baixa e alta infestação.

Figura 15 - Heat map dos genes diferencialmente expressos obtidos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos). Método de clusterização hierárquica usando *Euclidean Distance*. Escala de cores representa valores de $\log_2 fold change$. Genes com o nível de expressão aumentada estão representados em vermelho, genes com o nível de expressão diminuído estão representados em verde. Programa utilizado MultiExperiment Viewer (MeV).

Por meio do diagrama de Venn, representado na figura 16, podemos perceber que quatro genes são comuns entre as comparações do HPB-R com HPB-S no período de baixa e alta infestação. E nas comparações entre NEL e HPB-R e HPB-S há 26 genes em comum entre eles.

Figura 16 - Diagramas de Venn mostrando o número de genes compartilhados nas comparações entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico (Entre grupo). A) Comparação entre Holandês pouco infestado com Holandês muito infestado no período de baixa infestação (HPB-RxHPB-S BI) e Holandês pouco infestado com Holandês muito infestado no período de alta infestação (HPB-RxHPB-S AI). B) Comparação entre Nelore com Holandês muito infestado no período de baixa (NELxHPB-S BI) e alta infestação (NELxHPB-S AI), e Nelore com Holandês pouco infestado no período de baixa (NELxHPB-R BI) e alta infestação (NELxHPB-R AI).

A análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de sangue periférico, considerando os grupos HPB-R

e HPB-S pode ser vista na figura 17. A rede analisada destes DEGs obtidos demonstraram duas redes mais significantes, a primeira relacionada com regulação da transdução de sinal intracelular e resposta a estímulos externos ($P = 1.04 \times 10^{-5}$), e a segunda rede relacionada com resposta a estímulos mecânicos e via de sinalização do receptor de Fc ($P = 1.49 \times 10^{-8}$).

Figura 17 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos). Comparação entre Holandês pouco infestado (HPB-R) e Holandês muito infestado (HPB-S) no período de baixa e alta infestação. A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

De acordo com essa análise funcional, pode-se observar que as redes combinadas resultaram em uma via composta por DEGs como CXCL12, a qual esta relacionada com a resposta inflamatória e homeostase do tecido e foi up-regulada em Holandeses muito infestados (HPB-R), e o gene PAX5 que é um fator de transcrição, o qual codifica a proteína ativadora específica da linhagem de células B que se expressa

no início da resposta, e na rede analisada inibe a produção de IgE, apresentou-se down-regulado em Holandeses pouco infestados (HPB-R).

Já a análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de sangue periférico, considerando os grupos NEL e HPB-R e HPB-S, pode ser vista na figura 18. A rede analisada demonstrou três redes mais significantes, a primeira relacionada com a regulação positiva do processo celular, regulação positiva do processo metabólico celular e resposta a estímulos endógenos ($P = 7.44 \times 10^{-13}$); a segunda rede relacionada com a regulação positiva da resposta ao estímulo e a resposta imunidade inata ($P = 6.09 \times 10^{-21}$); e a terceira rede relacionada com a via de sinalização do receptor de superfície celular e resposta celular a substância orgânica ($P = 8.10 \times 10^{-16}$).

Figura 18 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos). Comparação entre Nelore (NEL) com Holandês pouco (HPB-R) e muito infestado HPB-S no período de baixa e alta infestação. A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

Já essa análise mostra que o gene NFAT-5, um importante fator de transcrição da resposta imunológica, que se apresenta up-regulado nos Nelores, ativa o gene

TLR10, que possui um papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata, e ativa também o fator de transcrição NF- κ B. O NF- κ B pode estar envolvido com uma gama de ações, como respostas imunológicas e inflamatórias, processos de desenvolvimento e crescimento celular, e apoptose.

Outros genes apresentados nesta rede, que foram up-regulados nos resistentes, também são ativados pelo NF- κ B e possuem atividades distintas, como por exemplo, o gene NOX1, que está relacionado com enzimas da família NADPHoxidase, o gene CFB, o qual codifica o fator do complemento B, componente da via alternativa de ativação do complemento, o gene BLK, o qual codifica um receptor tirosina-kinase. E o gene TRMP7, o qual codifica proteínas relacionadas com o canal de íon, foi inibido pelo fator de transcrição.

Há outro gene que está ligado ao fator de transcrição NF- κ B, o CEBPE, que apresentou-se down-regulado nos resistentes. Este gene codifica uma proteína que pode ser essencial para a diferenciação terminal e maturação funcional das células progenitoras de granulócitos, entretanto inibe a ativação do NF- κ B.

Além destas análises, foi realizada outra análise funcional da lista de genes diferencialmente expressos obtidos da comparação com o transcriptoma de sangue periférico, mas considerando agora todos os grupos juntos (HPB-R, HPB-S, NEL), a qual pode ser vista na figura 19. A primeira rede está relacionada com via de sinalização da proteína G e modulação da ciclase do receptor acoplado à proteína G ($P = 4.24^{e-08}$); a segunda rede está relacionada com a regulação dos processos do sistema imunológico ($P = 2.56^{e-05}$); e a terceira rede relacionada com transdução de sinal e regulação do transporte ($P = 2.67^{e-05}$).

Figura 19 - Rede obtida da análise funcional dos genes diferencialmente expressos da comparação entre dados de bovinos infestados naturalmente com dados do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico (Entre grupos). A análise funcional foi feita com software Metacore (<https://portal.genego.com/>, Thomson Reuters). Círculos em vermelho: genes com nível de expressão aumentado, círculos em azul: genes com nível de expressão diminuído.

4.4 Comparações dos DEGs encontrados no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e pele com genes alvos determinados por Nanostring.

Com base nos genes candidatos escolhidos no transcriptoma de pele e de sangue periférico foi realizada a análise comparativa dos genes para saber quais DEGs encontrados nos transcriptomas se mantiveram ou não DEGs em uma população amostral distinta e exposta a infestação natural. A partir dos genes candidatos escolhidos no transcriptoma de sangue periférico (109), 89 genes continuaram sendo DEGs e 19 genes não foram DEGs. E com base nos genes candidatos encontrados no transcriptoma de pele (59), 45 genes continuaram sendo DEGs e 16 genes não foram DEGs. Os genes estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Análise comparativa dos DEGs encontrados no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e pele com genes alvos determinados por Nanostring.

DEGs em comum		Genes que não foram DEGs	
Trascriptoma de leucócitos de sangue periférico com genes analisados com Nanostring	Trascriptoma de pele com genes analisados com Nanostring	Trascriptoma de leucócitos de sangue periférico com genes analisados com Nanostring	Trascriptoma de pele com genes analisados com Nanostring
ABCA2	A2M	APOBEC3A	CATD
ACE	ABP1	BHLHA15	CCL2
AIF1	ALOX12E	BT.88304	CLEC4G
BDP1	ANKFY1	BT.90712	CXCR2
BIRC3	ATF3	CALCRL	CYP4F2
BLK	CCL19	CCR10	DEFB10
BST2	CD14	CD163L1	DEFB4A
C1QA	CD209	CD36	DEFB5
C1QB	CXCL2	CYP4F2	DEFB7
C1QC	CXCL6	GZMB-201	FABP4
CABIN1	CYBB	KIR3DS1	IL6
CAD	CYP2B6	LOC618565	IL8
CCDC80	DECR1	MIC1	JUN
CCDC9	EIF2AK2	NR3C1	LOC785756
CD163L1	ELANE	OAS1Y	NCF1
CD38	FOS	OAS2	PGLYRP1
CD7	FOSB	Regakine 1	

CDH10	H2B	SPON1	
CDHR5	H4	VL1X	
CEBPE	HOXA9		
CEP250	HP		
CFB	IBSP		
CGGBP1	IL1B		
CHORDC1	IRAK1		
CRISPLD2	LAP		
CTSL1	LTF		
CXCL10	MAB21L1		
CXCL12	MIR6508		
DGAT2	MPO		
DHX58	NCF2		
DNMT3B	NCF4		
EBF1	NCKAP1L		
ENTPD2	PDGFRL		
FAM46C	PIK3C3		
GADD45G	PNRC2		
GPR35	PON3		
GPX3	PTGDS		
GRAMD1C	PTX3		
HBB	S100A8		
HES4	S100A9		
HIST1H1C	SULT1E1		
HRH4	SYT4		
IFI27	TDH		

IFI6	TYRP1		
IGJ	VCAM1		
IgL1			
IgM			
IPMK			
ISG15			
ISG20			
ITGB4			
KLHDC1			
L1CAM			
LAG3			
MAP3K8			
MAP4K3			
MBNL2			
MMEL1			
MS4A2			
MX2			
NFAT5			
NFE2L3			
NOX1			
OGN			
PACAP			
PACS1			
PALM3			
PAX5			
POLRMT			

PRKAR2B			
SCAMP1			
SDS			
SGPP1			
SLC39A10			
SLPI			
SLX4			
SNRNP200			
SNX10			
TIEG2			
TLR10			
TMED5			
TMEM41B			
TP53INP1			
TRAPPC9			
TRAT1			
TRIM2			
TRPM7			
UBA7			
WC1			

Os dados da tabela 6 mostram os genes candidatos que foram DEGs e em qual raça (Nelore ou Holandês) eles foram expressos, no transcriptoma de sangue periférico, transcriptoma de pele e bovinos infestados naturalmente. Podemos observar que quando comparado os genes que foram expressos do experimento do transcriptoma de sangue periférico, onde foi utilizado somente Holandeses, a maioria dos genes foram expressos também na raça Nelore quando infestadas naturalmente. Já os genes expressos no transcriptoma de pele se mantiveram expressos tanto na raça Holandesa quanto na raça Nelore.

Tabela 6 – Genes diferencialmente expressos, nas raças Nelore e Holandês, nos experimentos transcriptoma de sangue periférico, transcriptoma de pele e de bovinos infestados naturalmente.

	Genes que foram expressos				Genes que foram expressos			
	Bovinos infestados naturalmente (Nanostring)		Transcriptoma sangue periférico		Bovinos infestados naturalmente (Nanostring)		Transcriptoma pele	
Genes em comum do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico com genes analisados com Nanostring	Nelore	Holandês	Holandês	Genes em comum do transcriptoma de pele com genes analisados com Nanostring	Nelore	Holandês	Nelore	Holandês
ABCA2	x	-	x	A2M	x	-	x	-
ACE	x	-	x	ABP1	x	x	-	x
AIF1	x	-	x	ALOX12E	x	-	x	-
BDP1	x	-	x	ANKFY1	x	-	x	-
BIRC3	x	-	x	ATF3	x	-	-	x
BLK	x	-	x	CCL19	x	x	-	x
BST2	x	x	x	CD14	x	-	x	x
C1QA	x	-	x	CD209	x	-	-	x
C1QB	x	-	x	CXCL2	x	x	x	x
C1QC	x	-	x	CXCL6	x	x	x	x
CABIN1	x	-	x	CYBB	x	-	x	x
CAD	x	-	x	CYP2B6	x	x	-	x
CCDC80	x	x	x	DECR1	x	-	-	x

CCDC9	X	-	X	EIF2AK2	X	-	X	-
CD163L1	X	-	X	ELANE	X	-	-	-
CD38	X	-	X	FOS	X	-	X	X
CD7	X	-	X	FOSB	X	-	X	X
CDH10	X	-	X	H2B	X	-	-	X
CDHR5	X	-	X	H4	X	X	X	-
CEBPE	X	-	X	HOXA9	X	-	-	X
CEP250	X	-	X	HP	X	-	X	X
CFB	X	-	X	IBSP	X	-	X	X
CGGBP1	X	-	X	IL1B	X	-	-	X
CHORDC1	X	-	X	IRAK1	X	-	X	-
CRISPLD2	X	-	X	LAP	X	-	X	X
CTSL1	-	X	X	LTF	X	-	X	-
CXCL10	X	-	X	MAB21L1	X	X	-	X
CXCL12	X	X	X	MIR6508	X	-	X	X
DGAT2	X	-	X	MPO	X	-	-	-
DHX58	X	-	X	NCF2	X	-	-	X
DNMT3B	X	X	X	NCF4	X	-	-	X
EBF1	X	-	X	NCKAP1L	X	-	X	X
ENTPD2	X	-	X	PDGFRL	X	-	X	X
FAM46C	X	-	X	PIK3C3	X	-	X	X
GADD45G	X	-	X	PNRC2	X	-	X	-
GPR35	X	-	X	PON3	X	-	X	-
GPX3	-	X	X	PTGDS	X	X	X	X
GRAMD1C	X	-	X	PTX3	X	-	X	X
HBB	X	X	X	S100A8	X	-	-	X

HES4	X	X	X	S100A9	X	-	-	X
HIST1H1C	X	-	X	SULT1E1	X	X	-	X
HRH4	X	-	X	SYT4	X	-	-	X
IFI27	X	-	X	TDH	X	-	X	X
IFI6	X	-	X	TYRP1	X	-	X	-
IGJ	X	-	X	VCAM1	-	X	-	X
IGLL1	X	-	X					
IgM	X	X	X					
IPMK	X	-	X					
ISG15	X	-	X					
ISG20	X	-	X					
ITGB4	X	X	X					
KLHDC1	X	-	X					
L1CAM	X	-	X					
LAG3	X	X	X					
MAP3K8	X	-	X					
MAP4K3	X	X	X					
MBNL2	X	-	X					
MMEL1	X	-	X					
MS4A2	-	X	X					
MX2	X	-	X					
NFAT5	X	-	X					
NFE2L3	X	-	X					
NOX1	X	X	X					
OGN	X	X	X					
PACAP	X		X					

PACS1	X	-	X					
PALM3	X	X	X					
PAX5	X	X	X					
POLRMT	X	-	X					
PRKAR2B	X	-	X					
SCAMP1	X	-	X					
SDS	X	-	X					
SGPP1	X	-	X					
SLC39A10	X	-	X					
SLPI	-	X	X					
SLX4	X	-	X					
SNRNP200	X	-	X					
SNX10	X	-	X					
TIEG2	X	X	X					
TLR10	X	X	X					
TMED5	X	-	X					
TMEM41B	X	-	X					
TP53INP1	X	-	X					
TRAPPC9	X	-	X					
TRAT1	-	X	X					
TRIM2	X	X	X					
TRPM7	X	-	X					
UBA7	X	-	X					
WC1	X	-	X					

4.5 Comparações dos valores de expressão dos DEGs no transcriptoma de pele e sangue periférico com DEGs obtidos na análise Intra e Entre raças.

Com base no efeito da infestação em cada raça (Intra raças), o gráfico 3 mostra a comparação dos valores de $\log_2FC$ dos DEGs tanto no transcriptoma de pele quanto em bovinos infestados naturalmente. O gene Calgranulina A, apresentou-se up-regulado pela infestação nos Holandeses pouco e muito infestados (HPB-R e HPB-S), e quando comparado com o transcriptoma de pele, foi down-regulado na pele *naive* de Nelore, consequentemente up-regulado na pele *naive* de Holandês. O gene PIK3C3 foi up-regulado em Holandeses pouco infestados (HPB-R), porém quando comparado com o transcriptoma de pele apresentou-se down-regulado no estagio de ninfa no Nelore, consequentemente up-regulado em Holandês. O gene TYRP1, o qual apresentou padrão misto, foi up-regulado em Holandeses pouco e muito infestados (HPB-S e HPB-R) e down-regulado no Nelore, no transcriptoma de pele apresentou-se up-regulado no estágio de larva no Nelore.

Já o gene CXCL6, que também teve padrão misto, ou seja, apresentou-se up-regulado pela infestação no Holandês muito infestado (HPB-S) e down-regulado pela infestação no Nelore (NEL), apresentou-se no transcriptoma de pele up-regulado em pele ninfa no Nelore. Podemos perceber então que a expressão de genes que ocorre localmente nos holandeses durante uma infestação artificial, parece também ocorrer sistemicamente em holandeses infestados naturalmente.

Gráfico 3 – Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de pele e bovinos infestado naturalmente (Intra grupos). Nas comparações do transcriptoma de pele os grupos de referência são o Nelore e o estagio de ninfa.

Tomando por base agora a comparação dos valores de $\log_2FC$ dos DEGs tanto no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico quanto bovinos infestados naturalmente, como pode ser visto no gráfico 4, os genes NOX1, SCAMP1, TMED5 e BIRC3 foram up-regulados pela infestação nos Holandeses pouco e muito infestados (HPB-S e HPB-R) e também foram up-regulados em Holandeses infestados no transcriptoma de sangue periférico.

Gráfico 4 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e bovinos infestado naturalmente (Intra grupos).

Os genes TRPM7 e HBB foram up-regulados no transcriptoma de sangue periférico, porém no experimento de bovinos infestados naturalmente o gene TRPM7 foi up-regulado no Holandês pouco infestado (HPB-R) e o gene HBB no Holandês muito infestado (HPB-S). Ao passo que o gene IgM foi down-regulado pela infestação em Holandês pouco infestado (HPB-R) e down-regulado também em Holandeses no transcriptoma de sangue periférico.

Com relação ao perfil da resistência (Entre raças), a comparação dos valores de $\log_2FC$ dos DEGs tanto no transcriptoma de pele quanto em bovinos infestados naturalmente, está representada no gráfico 5. Podemos perceber que o gene CCL19 foi up-regulado na raça resistente quando infestados naturalmente, e também se apresentou up-regulado no estagio *naive* da pele do resistente no transcriptoma de pele. Isso também ocorreu com o gene CXCL2 que foi up-regulado nos bovinos resistentes e também se apresentou up-regulado na pele normal do Nelore no transcriptoma.

Gráfico 5 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de pele e bovinos infestados naturalmente (Entre grupos). Nas comparações do transcriptoma de pele o grupo de referência é o Nelore.

Já o gene CXCL6 em um período de alta infestação apresentou-se down-regulado nos resistentes, e o mesmo pode ser visto no resultado do transcriptoma de pele, onde esse gene apresentou-se down-regulado no estágio de ninfa no Nelore. O gene PTGDS apresentou-se up-regulado na raça resistente em um período de baixa infestação, porém o transcriptoma de pele mostrou que esse mesmo gene foi down-regulado nos estágios de larva e ninfa no Nelore.

Relacionando agora a comparação dos valores de $\log_2FC$ dos DEGs do transcriptoma de leucócitos de sangue periférico com bovinos infestados naturalmente, podemos perceber que os genes BIRC3, CFB, CXCL12, IgM, PAX5, PRKAR2B, os quais estão representados no gráfico 6, foram down-regulados em Holandês infestado no transcriptoma de sangue e, em sua maioria, up-regulados nos resistentes, consequentemente down-regulados no suscetível.

Gráfico 6 - Comparação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de leucócitos de sangue periférico e bovinos infestados naturalmente (Entre grupos).

Um fato interessante é que esses genes estão relacionados tanto com a resposta da imunidade inata, como recrutamento de neutrófilos (CXCL12), ativação do complemento (CFB) quanto à resposta adquirida, como desenvolvimento de células B (PAX5).

5. DISCUSSÃO

Com base no papel da infestação quando analisados os genes candidatos do transcriptoma de pele em sangue periférico de bovinos infestados naturalmente, podemos perceber que a infestação modulou mais genes nos holandeses pouco e muito infestados do que nos nelores. Tais genes quando feita análise funcional, mostrou que DEGs como, por exemplo, a IL-1beta, é ativada principalmente pelos fatores de transcrição NF-kB e STAT1, e isso desencadeará uma resposta inflamatória. Outros DEGs importantes como, por exemplo, CXCL6 e Calgranulina A (S100A8) estão relacionados com o recrutamento de neutrófilos, portanto pode-se observar que durante a infestação os holandeses inflamam mais e podem estar relacionados com a imunidade inata.

De acordo com os genes candidatos do transcriptoma de sangue periférico em bovinos infestados naturalmente pode-se perceber que a infestação também modulou mais genes nos holandeses pouco e muito infestados do que nos nelores. E quando feita a análise funcional, pode-se perceber que houve a interação de genes que possuem diversas funções. Um gene interessante foi o NOX1 (NADPH oxidase 1), a qual é encontrada nos neutrófilos e é essencial para a imunidade inata, gerando grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) no “burst respiratório” (LAMBETH; KAWAHARA; DIEBOLD, 2007). Isso reforça a ideia que a infestação nos holandeses conduz para um possível caminho envolvendo ações pró-inflamatórias.

Com relação às diferenças entre os grupos de bovinos na resposta ao carrapato, quando analisados os genes candidatos do transcriptoma de pele em sangue periférico de bovinos infestados naturalmente, através da análise funcional pode-se perceber uma relação de genes relacionados com moléculas pró-inflamatórias e adesão celular nos holandeses muito infestados (HPB-S), e genes que tiveram sua expressão aumentada nos holandeses pouco infestados (HPB-R) estavam associados com o recrutamento de neutrófilos. Isso sugere que sistemicamente, os perfis de expressão gênica dos holandeses pouco e muito infestados se assemelham.

Já a raça nelore apresentou na análise funcional, genes associados com a inibição da coagulação sanguínea e inibição da agregação de plaquetas. Isso também pôde ser

visto no trabalho do Reck e colaboradores (2009), onde demonstraram que bezerros da raça Hereford infestados artificialmente, o número de plaquetas no sangue aumentou durante a infestação, contudo a capacidade de agregação de plaquetas, induzida por ADP e colágeno, diminuiu no decorrer da infestação.

Um gene interessante que apresentou padrão misto foi o ELANE, teve sua expressão diminuída na raça nelore em um período de alta infestação, consequentemente teve sua expressão aumentada na raça holandesa muito infestada. O produto deste gene, uma serina/protease, é armazenado em grânulos dentro dos lisossomos dos neutrófilos, os quais estão envolvidos na degradação de microrganismos (PHAM, 2006). Isso mostra ser uma possível ferramenta na resposta ao carrapato presentes em bovinos suscetíveis e não contribui para o nível de resistência.

Quando analisados os genes candidatos do transcriptoma de sangue periférico em bovinos infestados naturalmente, através da análise funcional pode-se perceber que no holandês muito infestado o gene PAX5 teve sua expressão aumentada, o qual está relacionado com a ativação de linhagens de células B, e tal gene na análise inibe a expressão do receptor para IgE, a qual é expressa por mastócitos e basófilos e é importante na imunidade contra parasitas. No holandês pouco infestado o principal gene mostrado na análise funcional que apresentou sua expressão aumentada foi o CXCL12, que codifica uma proteína importante na resposta inflamatória e na homeostase do tecido. Na raça nelore houve muitos genes com a expressão aumentada relacionados tanto com a imunidade inata quanto com a imunidade adquirida. Isso nos mostra que quando se trata de resistência, o bovino resistente é mais completo na resposta ao carrapato.

Esses dados não se assemelham com os dados obtidos de Piper e colaboradores (2009) onde mostraram os perfis de expressão gênica de sangue periférico de bovinos *B. taurus* (Holandês) e bovinos *B. indicus* (Brahman) e sugerem que os bovinos *B. indicus* (Brahman) desenvolvem uma resposta predominantemente relacionadas com a imunidade adaptativa, enquanto que os *B. taurus* (Holandês) desenvolvem perfil relacionado com imunidade inata na resposta ao carrapato.

Diante dos resultados da comparação dos valores de expressão dos DEGs dos transcriptoma de pele e sangue periférico com bovinos infestados naturalmente,

podemos perceber que os genes tiveram expressão nos transcriptomas semelhante com este experimento. Isso nos mostra que o perfil de expressão dos DEGs que são modulados local ou sistemicamente em bovinos infestados artificialmente é igual ao perfil de expressão dos DEGs encontrados sistemicamente em bovinos infestados naturalmente.

Em síntese podemos avaliar que os bovinos suscetíveis possivelmente conduzem a uma resposta contra carrapatos mais relacionada com a imunidade inata o que sugere que tal resposta não contribui para o elevado nível de resistência à carrapatos. Enquanto que a resposta dos bovinos resistentes contra o carrapato encaminha-se para processos envolvidos com a imunidade adquirida.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que, a infestação modulou muito mais genes nos Holandeses muito infestados (HPB-S) e Holandeses pouco infestados (HPB-R) do que nos nelore (NEL).

De acordo com a análise funcional dos DEGs podemos concluir uma possível relação do perfil de expressão gênica dos holandeses com a imunidade inata, e o perfil de expressão gênica dos nelores associado tanto a imunidade inata, quanto a imunidade adquirida.

Em relação aos genes associados ao perfil de resistência ou suscetibilidade, a partir dos resultados aqui apresentados, este trabalho sugere que os genes CXCL6, S100A8 (Calgranulina A) TYRP1, IgM, ELANE, CCL19, PDGFRL, VCAM1, NOX1 e CEBPE, podem ser possíveis assinaturas gênicas relacionadas a resistência ou suscetibilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5926, p. 522–528, 24 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390049>>.

CARVALHO W.A, BECHARA G.H, MOREÍ D.D, FERREIRA B.R, DA SILVA J.S, DE MIRANDA SANTOS I.K. Rhipicephalus (Boophilus) microplus: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, Bos taurus and Bos indicus. **Exp Parasitol.**, vol.118, p.587-91, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171576>>.

DE LA FUENTE J, RODRIGUEZ M, MONTERO C, REDONDO M, GARCIA-GARCIA JC, ET AL. Vaccination against ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet Anal**, vol. 15, p.143-148, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10596754>>.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637–668, jul. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390274>>.

FAVARATO ES, CONCEIÇÃO LG. Hair cycle in dogs with different hair types in a tropical region of Brazil. **Vet Dermatol**, vol.19, p.15-20, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177286>>.

FRANCISCHETTI, I.M.B, MATHER T.N, RIBEIRO J.M.C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thromb Haemost.**, vol.94, p.167–174, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113800>>.

FRANCISCHETTI, I.M.B., SÁ-NUNES A., MANS B.J., SANTOS I.M., RIBEIRO J.M.C., The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci.** vol. 14, p.2051-2088, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273185>>.

FRANZIN A.M. **Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estudo dos correlatos imunes de resistência e de susceptibilidade**. Tese (Imunologia básica e aplicada) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GEISS, G. K. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 317–325, mar. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278033>>.

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

INOKUMA, H., R. L. KERLIN, D. H. KEMP, P. WILLADSEN. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet. Parasitol.** 47:107–118, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493757>>.

KULKARNI, M.M. Digital Multiplexed Gene Expression Analysis Using the NanoString nCounter System. **Current Protocols in Molecular Biology**, 25B.10.1-25B.10.17, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21472696>>.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p.319–331, Agosto 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602947>>.

MARUYAMA, S.R, BANIN T. M., GONZALEZ-PORTa M., RUNG J., CARVALHO B, DE MIRANDA SANTOS I.K. RNA-seq analysis of bovine leukocytes for identification of molecular signatures associated to a protective anti-tick immunity

conferred by a multicomponent anti-tick vaccine. In: 10th INTERNATIONAL VETERINARY IMMUNOLOGY SYMPOSIUM, 2013, Milão, Itália.

NICKLES, D. CHEN H.P, LI M.M, KHANKHANIAN P, MADIREDDY L, CAILLIER S.J, SANTANIELLO A, CREE B.A, PELLETIER D, HAUSER S.L, OKSENBERG J.R, BARANZINI S.E. Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 20, p. 4194–4205, 15 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748426>>.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541–550, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799473>>.

PIPER E. K, JACKSON L.A, BAGNALL N. H, KONGSUWAN K.K, LEW A.E, JONSSO N.N. Gene expression in the skin of Bos taurus and Bos indicus cattle infested with the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 110–119, 15 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676027>>.

PIPER E.K, JONSSON N.N, GONDRO C, LEW-TABOR A.E, MOOLHUIJZEN P, VANCE M.E, JACKSON L.A. Immunological Profiles of Bos taurus and Bos indicus Cattle Infested with the Cattle Tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol.16, p.1074–1086, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474263>>.

RECK JR. J, BERGER M, TERRA R.M.S, MARKS F.S, DA SILVA VAZ JR. I, GUIMARÃES J.A, TERMIGNONIA C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestation. **Research in Veterinary Science** v. 86, n.1, p.56–62, Fevereiro 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18571684>>.

REIS, P. P, WALDRON L, GOSWAMI R.S, XU W, XUAN Y, PEREZ-ORDONEZ B, GULLANE P, IRISH J, JURISICA I, KAMEL-REID S. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. **BMC biotechnology**, v. 11, p. 46, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549012>>.

RESENDE J, SACCO A.M, ROCHA C, PROENÇA L, CARVALHO W.A, FIRMINO A.A, QUEIROZ R, BENAVIDES M, GERSHWIN L.J, DE MIRANDA SANTOS I.K. Boophilus microplus: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Exp. Parasitol.**, vol. 110, p.12-21, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804374>>.

RIBEIRO J.M. How ticks make a living. **Parasitol Today**, vol. 11, p.91-93, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275359>>.

RODRIGUEZ M, PENICHET ML, MOURIS AE, LABARTA V, LUACES LL, ET AL. Control of Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Vet Parasitol.**, vol. 57, p.339-349, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660571>>.

WILLADSEN P, BIRD P, COBON G.S, HUNGERFORD J. Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. **Parasitology**, vol. 110, p.43-50, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7784128>>.