



Uso de técnicas de biologia molecular em estudos de avaliação da resistência genética de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus*



*Fabiane Siqueira
Isabella Maiumi Zaidan Blecha
Marco Antônio Machado
Luiz Lehmann Coutinho*



INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem aumentado o interesse de produtores na produção de bovinos que sejam mais adaptados a ambientes desafiadores, interesse este que, em grande parte, está sendo impulsionado pelos avanços no desenvolvimento de métodos de análises de dados genômicos e transcriptômicos. O interesse pela resistência bovina ao carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, é compreensível por interferir diretamente no bem-estar animal e devido às implicações econômicas relacionadas à infestação por carrapatos em zonas tropicais e subtropicais (PORCIO NEIO et al., 2011a).

As perdas provocadas pelo carrapato *R. microplus* provocam reduções drásticas nas produções de carne e leite, e o País deixa de produzir 26 milhões de arrobas de carne/ano e quatro bilhões de litros de leite/ano. A estimativa dos danos atribuídos a este ectoparasita aponta prejuízos anuais da ordem de USD\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014). Os prejuízos causados por este parasita são decorrentes tanto de sua ação direta sobre o hospedeiro, tais como: perda de peso, baixa conversão alimentar, diminuição na produção de carne e leite, desvalorização do couro pela ocorrência de lesões e miíases, toxicoses, lesões da pele, anemia, bem como de perdas indiretas relacionadas à transmissão de patógenos, responsáveis pela babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*). Contribuem também para compor o quadro de agravantes deste parasitismo os altos custos com tratamentos químicos, equipamentos, instalações e mão de obra (GOMES, 1998).

Historicamente, o método de controle para o carrapato que mais tem sido empregado desde o final do século XIX baseia-se na utilização de produtos químicos (acaricidas), que atuam na fase parasitária de vida do parasita. Porém, a experiência de algumas décadas de uso contínuo desses fármacos demonstra que as expectativas do controle parasitário não podem ser depositadas somente no tratamento químico, pois a alta capacidade de adaptação destes ácaros conduz, invariavelmente, a seleção de indivíduos resistentes, tornando este tipo de controle cada vez menos viável economicamente (FRISCH, 1999). Os custos crescentes para o desenvolvimento de novas drogas e o curto período de vida útil que elas apresentam têm desestimulado a procura de bases químicas com mecanismos de ação diferenciados.

Técnicas de manejo dos animais e das pastagens baseadas na epidemiologia e ecologia de *R. microplus*, como o cultivo de espécies forrageiras com ação repelente ou acaricida sobre as larvas; a alternância de pastoreio entre ovinos lanados e bovinos; e a rotação ou o descanso de pastagens dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do parasita, podendo, assim, reduzir a frequência do tratamento químico. No entanto, poucas propriedades rurais adotam estas práticas, por falta de acesso ao conhecimento ou por dificuldades logísticas e orçamentárias para a sua implantação.

Nesse contexto, diversos métodos de controle estão sendo pesquisados como formas alternativas ou complementares ao controle químico. Entre estes se destacam o uso de micro-organismos patogênicos aos carrapatos, como fungos, bactérias e nematoides; a utilização de compostos naturais com efeito acaricida ou repelente (fitoterápicos; nutracêuticos e semioquímicos); o desenvolvimento de vacinas multiantigênicas; a identificação de genes e/ou marcadores moleculares associados com a resistência bovina ao *R. microplus*; e a seleção genômica.

Até o momento, os únicos produtos alternativos ao controle químico disponíveis no mercado são as vacinas TickGard, desenvolvidas na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba, sendo que esta última encontra-se à venda no Brasil. Embora essas vacinas estejam disponíveis comercialmente, elas não asseguram o grau necessário de proteção para suprimir de imediato o uso de acaricidas, sugerindo a necessidade de identificação de outros antígenos protetores.

As limitações apresentadas pelos métodos de controle existentes indicam a necessidade de disponibilizar aos criadores medidas alternativas para complementar os procedimentos de controle tradicionais, mas que ao mesmo tempo não resultem em maiores gastos no processo de obtenção do produto final. A seleção de animais resistentes em programas de melhoramento genético foi indicada por Frisch (1999) como uma das formas mais promissoras de controle parasitário, uma vez que tem como premissa a prevenção, com efeito permanente durante a vida do animal e acumulativo no rebanho ao longo do tempo. Diferentes níveis de resistência dos bovinos ao carrapato foram observados por diversos autores, tanto dentro de raças como entre raças. Estas diferenças podem ser utilizadas para adequar genótipo e ambiente, visando aumentar a eficiência produtiva dos sistemas de produção de carne e leite do País.

O mecanismo de resistência dos bovinos ao carrapato é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido, sendo que a resistência à infestação ou a capacidade de desenvolver uma resposta imunológica eficaz é geneticamente determinada. De acordo com Frisch; O'Neill (1998), os bovinos *Bos taurus indicus* (Zebu africano e indiano) podem ser classificados como de elevada resistência ao carrapato; bovinos *Bos taurus taurus* do grupo Sanga como de resistência um pouco mais baixa, e os *Bos taurus taurus* britânicos e continentais como de baixa resistência. No Brasil, cerca de 80% do rebanho é composto por animais de raças zebuínas, no qual se destaca a raça Nelore, que são animais rústicos e adaptados ao ambiente brasileiro.

A maior tolerância de animais *B. taurus indicus* quando comparados a *B. taurus taurus* tem sido amplamente reportada na literatura e estudos envolvendo cruzamentos entre animais destes grupos apontam, inclusive, uma proporcionalidade entre a frequência de genes zebuínos e o grau de resistência dos hospedeiros. Quanto maior a proporção de genética zebuína no mestiço, maior é a sua resistência ao carrapato (LEMOS et al., 1985; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; WAMBURA et al., 1998; CARDOSO, 2000; SANTOS JR. et al., 2000; SILVA et al., 2006).

Neste capítulo serão abordadas algumas técnicas que contribuem para o estudo da resposta de uma célula ou organismo a eventos biológicos particulares ou a alterações ambientais. Esses métodos são utilizados para auxiliar na identificação de genes e/ou de suas funções em qualquer genoma acerca do qual pouco ou nada se conhece. Assim, genes expressos em uma célula sob determinadas condições constituem o seu transcriptoma.

Estudos do transcriptoma podem ajudar a revelar novos processos celulares, bem como identificar os genes e produtos gênicos envolvidos em processos conhecidos. Estas ferramentas possibilitarão o mapeamento de genes que possam ser usados na seleção de indivíduos resistentes ao carrapato em programas de melhoramento genético e para

descoberta de novos antígenos com capacidade imunoprotetora, permitindo o desenvolvimento de diagnósticos, produtos e/ou tecnologias para combater este ectoparasita.

MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE CARRAPATOS *R. microplus*

Para o estabelecimento e a manutenção de colônias de carrapatos, bovinos de aproximadamente seis meses de idade sensíveis ao carrapato devem ser mantidos isoladamente em baias sendo artificialmente infestados com *R. microplus* livres de *Babesia* e *Anaplasma*. Na Embrapa Gado de Corte, os bovinos são alojados em baias individuais de alvenaria que possuem como assoalho uma grade de madeira posicionada a 30 cm do chão para que as fêmeas de carrapato adultas ingurgitadas (teleóginas), que se desprendem dos animais vacinados, caiam pela grade e não sejam pisoteadas. Os animais são alimentados duas vezes ao dia com ração balanceada, silagem e feno, e com água à vontade.

Geralmente, um ou dois bovinos são infestados com a inoculação de 20.000 larvas no dorso de cada um deles a cada cinco semanas. Fêmeas ingurgitadas são coletadas por lavagem do assoalho das baias com jato de água, sendo, em seguida, recuperadas em uma tela e separadas manualmente dos dejetos. Estas fêmeas são mantidas a 28°C em ambiente com 85% de umidade.

Após a postura, os ovos são transferidos para tubos de ensaio, os quais são, em seguida, tampados com algodão para permitir a troca de gases (aeração). Ovos de vários dias são utilizados nos experimentos e, para a manutenção do ciclo são utilizadas larvas com 10 a 15 dias após a eclosão, que são transferidas para os animais.

INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE BOVINOS COM LARVAS DE CARRAPATOS *R. microplus*

Inicialmente, animais experimentais são mantidos no campo por um período de aproximadamente três meses livres de carrapatos para adaptação e perda da memória imunológica. Após este período, os animais são levados para baias individuais para a implantação de câmaras, conforme abaixo detalhadas, e a realização das infestações.

Quatro câmaras com 15 cm de diâmetro são fixadas após tricotomia com cola de contato atóxica nas regiões da tábua do pescoço e dorso. Geralmente, três infestações com 300 larvas são realizadas com intervalo de 21 dias e nos locais das infestações são retiradas, de cada animal experimental, amostras de pele de oito milímetros de diâmetro para a realização de biópsias, as quais representem cada infestação cumulativamente.

As coletas das biópsias de pele podem ser realizadas em momentos distintos, sendo a primeira coleta antes da infestação por carrapatos (usada como controle) e as demais no 21º dia após cada infestação (que é o dia modal de desprendimento natural das teleóginas de *R. microplus*).

Para a conservação intacta do RNA, as biópsias de pele podem ser imediatamente imergidas em *RNA later* (Ambion, Inc), acondicionadas por no mínimo 24 horas à temperatura de 4°C a 8°C e, em seguida, congeladas a -20°C até o momento de extração de RNA. Alternativamente, as biópsias podem ser congeladas imediatamente e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da extração.

Protocolo de extração de RNA de pele

Para a amostra de tecido de pele, acondicionada em *RNA later*, primeiramente deve ser removida a amostra da solução e o excesso de líquido deve ser drenado. Dessa amostra é retirado e descartado o couro, sendo o RNA extraído a partir do restante da amostra. Para tanto, é utilizada a trituração e homogeneização das amostras em TRIzol® (Invitrogen™), com o auxílio do equipamento *Tissue Ruptor* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), e purificação do RNA com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para homogeneização das amostras também pode ser utilizado o equipamento *Tissue Lyser* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Colocar a amostra em tubos tipo eppendorf de 2 mL com fundo redondo com duas esferas de aço de 7 mm e com o tampão denominado "Buffer RLI" da Qiagen. Utilizar amostras de pele pesando entre 100 e 150 mg (equivalente a um terço ou metade de uma biópsia de 8 mm) por extração. Utilizar dois pulsos de 2 minutos e mais um ou dois pulsos de um minuto a 16000 xg. O volume do tampão RLI deve ser aumentado de 300 µL para 600 µL por extração. Apesar deste aumento de volume, utilizar apenas uma coluna por extração, adicionando o volume quantas vezes forem necessárias para passar todo o material pela coluna, via centrifugação. Ao final do protocolo lavar a coluna duas vezes com 32 µL de água para eluir/recuperar o RNA.

Em seguida, o RNA pode ser armazenado à temperatura de -80°C como descrito a seguir: 1) metade na própria água da extração e 2) metade com adição de 10% do volume final com Acetato de Sódio 3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto. O RNA armazenado em água se mostra de boa qualidade por alguns meses ao ser analisado no equipamento *Bioanalyser* (Agilent Technologies), dispensando a necessidade de usar as alíquotas armazenadas em álcool.

Outro método utilizado para homogeneização das amostras de pele pode ser a maceração das amostras congeladas em cadinhos de porcelana utilizando nitrogênio líquido. Neste caso, as amostras devem ser maceradas até que se tornem um pó. Importante destacar, que independentemente do processo de homogeneização utilizado, é necessário evitar que a amostra se descongele. Assim, todos os procedimentos devem ser conduzidos de forma rápida e precisa.

Após a homogeneização das amostras, o RNA total também pode ser extraído por meio de protocolos a base de Trizol. Neste caso, para cada 50 a 100 mg de tecido macerado adicionar 1 mL de Trizol gelado (em tubo de polipropileno de 1,5 mL livre de RNases). Homogeneizar em vórtex e incubar por cinco minutos à temperatura ambiente. Acrescentar 200 µL de clorofórmio gelado e agitar vigorosamente o tubo por 15 segundos. Incubar durante cinco minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar a 16.000 xg à temperatura de 4°C durante 15 minutos. Remover a fase aquosa para um tubo limpo e adicionar 500 µL de isopropanol gelado. Agitar o tubo manualmente e incubar por dez minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugar a 13.000 xg/4 °C por dez minutos e descartar o sobrenadante. Lavar o sedimento com um mL de etanol 75% (preparado com água DEPC - *Diethyl Pyrocarbonato* 0,01%). Centrifugar a 10.500 xg na temperatura de 4°C por cinco minutos e deixar o sedimento (*pellet*) secar durante aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente, tomando o cuidado de não deixar restos de etanol na amostra. Por fim, ressuspender o sedimento

em um volume de 20 μL a 50 μL de água DEPC, sendo que o volume final irá depender do tamanho do sedimento obtido.

Análise e quantificação de RNA em gel de agarose desnaturante

A pureza e a qualidade de RNA total podem ser avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante corado com *Sybr Gold* e determinada por espectrofotometria a 260 nm utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). O gel deve ser preparado de acordo com o protocolo abaixo:

1. Gel médio de agarose para RNA:

1,04 g de Agarose.

10,4 mL de tampão MOPS 10X.

88 mL de Água DEPC.

Levar a um equipamento de micro-ondas para homogeneizar (até ferver) e, após esfriar, adicionar 5,6 mL de formaldeído.

2. Gel pequeno de agarose para RNA:

0,31 g de Agarose.

3,12 mL de MOPS 10X.

26,4 mL de Água DEPC.

Levar a um equipamento de micro-ondas para homogeneizar (até ferver) e, após esfriar, adicionar 1,68 mL de formaldeído.

Mistura (mix) para corrida eletroforética em gel desnaturante:

	PARA UMA AMOSTRA	"X" NÚMERO DE AMOSTRAS
RNA total	2,75 μL	
Tampão MOPS 10X	0,5 μL	
Formaldeído	1,75 μL	
Formamida	5 μL	
Volume final	10 μL	

Colocar no mínimo 1 μg de RNA total em tubos de 0,2 mL e adicionar o mix (volume final 10 μL). Agitar gentilmente o tubo, incubar por dez minutos à 60°C e, em seguida, colocá-lo no gelo por cinco minutos.

Para cada amostra adicionar 1 μL de SybrGold, 2 μL de tampão de carregamento e 2 μL de Sacarose (40%). Realizar a corrida eletroforética à 100 V com tampão MOPS 1X por, aproximadamente, 60 minutos.

A qualidade e a integridade do RNA total também podem ser analisadas utilizando o equipamento *Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Apenas amostras com RNA total apresentando *RNA Integrity Number* (RIN) maior ou igual a 8,0 devem ser utilizadas para análises de sequenciamento em larga escala (RNA-Seq).

Preparo das soluções utilizadas no gel desnaturante

1. Água DEPC (Diethyl Pyrocarbonato)

DEPC 0,01% em H₂O milliQ

Para cada 1.000 mL de água adicionar 100 µL de DEPC. Misturar a solução no agitador magnético com auxílio de uma barra magnética por no mínimo 12 horas a 37°C (ou *overnight*). Autoclavar, fazer alíquotas e guardar na geladeira até o momento do uso.

2. MOPS 10X

Para preparar 1 litro pesar:

41,2 g MOPS.

10,88 g Acetato de sódio (CH₃COONa).

1.000 mL H₂O DEPC.

Em um béquer, misturar os reagentes com 800 mL de H₂O DEPC e agitar com uma bailarina. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH. Adicionar 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e completar o volume para 1.000 mL. Filtrar a solução em filtro millipore 0,2 µm e armazená-la em um frasco âmbar. Guardar o tampão na geladeira até o momento do uso.

3. Etanol 75% (Álcool etílico)

Observar sempre qual é a porcentagem que consta no frasco. No álcool etílico a dosagem por volume é 95%, portanto:

$C_i.V_i = C_f.V_f$ (volume final 100 mL a 75%).

$95\% . V_i = 75\% . 100 \text{ mL}$

$95\% . V_i = 7.500$

$V_i = 7.500/95$

$V_i = 78,9 \text{ mL}$

Colocar em uma proveta 78,9 mL de álcool etílico a 95% e completar o volume para 100 mL com água auto clavada ou água milliQ.

TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

A análise de transcriptoma em larga escala tornou-se possível, pela primeira vez, com o advento das tecnologias de micro arranjos. Essas técnicas podem revelar os genes que são induzidos ou reprimidos quando uma célula é sujeita a determinadas condições biológicas ou ambientais. O crescente uso da análise de transcriptoma baseada em micro arranjos levou ao desenvolvimento de banco de dados *on line* e estes dados estão disponibilizados para toda a comunidade científica, principalmente no caso de estudos na área da genética humana. À medida que a qualidade dos dados de transcriptomas melhora, os próprios transcriptomas passam a ser mais do que uma lista de genes diferencialmente expressos. São também uma forma de impressão digital que caracteriza uma classe de células de determinado organismo sob condições específicas (COX et al., 2012).

A técnica de sequenciamento de alto desempenho ou *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing* (RNA-seq) refere-se ao sequenciamento em massa do RNA e representa uma importante ferramenta em estudos de genômica funcional. Com o advento desta tecnologia, tornou-se possível a análise de todo o transcriptoma sem o conhecimento prévio

das sequências e a identificação de genes que participam dos processos celulares e fisiológicos envolvidos em características de interesse econômico e, ao mesmo tempo, como esses genes interagem entre si dentro das redes biológicas que controlam esses fenótipos.

Preparo de mRNA, bibliotecas de cDNA e sequenciamento em larga escala

No caso do sequenciamento de RNA em larga escala utilizando a tecnologia da Illumina, cada amostra, contendo de 1 a 4 µg de RNA total deve ser purificada de acordo com o protocolo descrito por esta empresa, utilizando microesferas magnéticas ligadas a oligos dI para separação do RNA ribossômico. O mRNA purificado tem que ser fragmentado em tampão específico (Illumina). A síntese da primeira fita de cDNA deve ser realizada com a enzima Superscript II (Invitrogen). Para a síntese da segunda fita de cDNA, devem ser utilizadas as enzimas RNaseH e DNA Pol I fornecidas no kit de preparo da biblioteca (Illumina).

As extremidades das moléculas são tratadas com as enzimas *T4 DNA Polymerase* e *Klenow DNA Polymerase* (Illumina), para geração de extremidades abruptas. A extremidade 3' é fosforilada com a enzima *T4 PNK* (Illumina) e a adenilação na extremidade 3' é realizada com a enzima *Klenow exo* (Illumina). As moléculas são então ligadas aos adaptadores com uso da enzima *T4 DNA Ligase* (Illumina). As bibliotecas são purificadas e amplificadas (200pb ±30 pb) por meio de PCR com *primers* específicos para os adaptadores (Illumina).

Após o término da *SamplePrep*, a qualidade das bibliotecas deve ser validada em um equipamento *Bioanalyser* (*Agilent Technologies*) usando o *chip DNA 1000*, com intuito de verificar se o procedimento foi bem sucedido e se as amostras apresentam a maior parte dos fragmentos próximos do tamanho de 260 pares de bases (pb).

A seguir, as bibliotecas são quantificadas individualmente via PCR em Tempo Real (RT-qPCR), com o uso do Kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems), o qual possui seis amostras padrões de concentrações (entre 20 a 0,0002 pM) e tamanho de fragmento conhecido (452 pb) presentes no *kit*. A partir dos valores de Ct (*threshold cycle*) dos padrões são determinadas as concentrações das amostras por meio de uma regressão linear. Depois de calculadas essas concentrações, elas são diluídas novamente para uma concentração padronizada, combinadas e então inseridas na lâmina de sequenciamento para a clusterização.

Neste caso, o sequenciamento do mRNA é realizado com a tecnologia de sequenciamento de nova geração por meio do equipamento *HiSeq2500* (Illumina – San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e é utilizado o protocolo de *pair-end reads*. Com uso do *kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS* (Illumina – San Diego, EUA), as amostras são ligadas a oligos complementares posicionados na superfície das canaletas da lâmina, e posteriormente amplificadas, resultando em *clusters* (agrupamentos) de fragmentos iguais. A sequência dos agrupamentos deve ser determinada com uso do *kit TruSeq SBS kit v3-HS* (Illumina – San Diego, EUA), (200 ciclos), conforme recomendações do fabricante. Cada canaleta contém seis amostras e cada amostra é sequenciada até gerar cerca de 10 milhões de *reads* por biblioteca.

Validação dos resultados das análises de expressão gênica obtidos por RNAseq

Os níveis de expressão diferencial de transcritos específicos, identificados pelo sequenciamento de mRNA, podem ser validados por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

Síntese do DNA complementar (cDNA)

A fim de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total são submetidas ao tratamento com o kit DNase I (*Fermentas*), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o RNA total é transcrito reversamente em cDNA com o uso do kit *SuperScript III First-Strand Syntesis SuperMix* (*Invitrogen*), de acordo com as especificações do fabricante.

Desenho e otimização dos primers

Os *primers* para amplificação dos transcritos previamente encontrados na análise de RNA-Seq, podem ser desenhados com base na sequência completa do mRNA dos genes depositados no *GenBank* (HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>" www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plu.cgi>). A qualidade das sequências dos primers pode ser avaliada utilizando o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>). A especificidade das sequências pode ser analisada com o uso da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) é realizada a otimização dos *primers* e são estabelecidas as condições ideais de temperatura de ligação para cada par de *primers*, por meio de gradientes de temperaturas. Em seguida, o produto de PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para análise do produto amplificado.

Cálculo da eficiência de amplificação (E) dos primers

Para calcular a eficiência de amplificação dos *primers*, são construídas curvas padrão de diluição em série de cDNA, utilizando amostras selecionadas aleatoriamente. A eficiência é obtida utilizando a equação determinada por Rasmussen (2001):

$$E = [10^{(-1/\text{slope})}]$$

Onde:

E: Eficiência da amplificação do *primer*;

Slope: Valor dado para a inclinação da curva.

PCR quantitativa em tempo real

A metodologia da transcrição reversa, seguida da qPCR, permite a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica entre os diferentes indivíduos ou tratamentos. Baseia-se na detecção e quantificação de um marcador fluorescente, que será o *SYBER® Green* (*Roche*), cujo sinal está em proporção direta com a quantidade de produto amplificado em uma reação. O *SYBR® Green* (*Roche*) se liga à fita dupla de cDNA e, ao sofrer excitação luminosa, emite fluorescência. Dessa maneira, com o acúmulo de produto de PCR, a fluorescência aumenta, indicando o número de moléculas inicialmente presente na amostra.

Para as reações de RT-PCR quantitativa em tempo real pode ser utilizado o Kit *LightCycler® 480 SYBER Green 1 Master* (Roche) e o equipamento *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche) na validação dos genes diferencialmente expressos nas análises de RNA-Seq. O volume final da reação de PCR é de 10 µL e as reações são preparadas adicionando-se 2 µL de cDNA (na diluição calculada), 5 µL de SYBER Green 1 Master 2X (Roche) (composto por 1µg DNA polymerase; tampão; dNTPs; fluorescência SYBER Green 1 e cloreto de magnésio); 0,4 µL de cada *primer* direto e reverso (10 µM/µL) e 2,2 µL de água livre de nucleases.

Todas as reações são realizadas em duplicata com um controle negativo (sem cDNA) e um calibrador (gene conhecido). Ao término da reação de PCR, a curva de *melting* é analisada para os genes estudados a fim de confirmar a especificidade dos *primers*. Os resultados da expressão gênica são registrados como valores de Ct (*Cycle threshold*).

Quantificação relativa da expressão gênica

Para a normalização dos dados gerados na RT-qPCR podem ser testados os genes referência *EEF1A1* (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*), *RPL5* (*ribosomal protein L5*) *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *MRPS27* (*mitochondrial ribosomal protein S27*) e *AC1B* (*actin beta*) para a quantificação da expressão dos genes de interesse. A expressão relativa pode ser calculada pelo método comparativo descrito por Pfaffl (2001), na qual essa expressão é determinada pela razão:

$$\text{Expressão relativa} = R = \frac{E(\text{gene alvo})^{(Ct \text{ gene referência} - \text{amostra})}}{E(\text{gene controle})^{(Ct \text{ gene referência} - \text{amostra})}}$$

Onde:

E: Eficiência de amplificação do *primer*

Ct (*threshold cycle*): O ciclo de PCR no qual foi detectado o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal.

Os dados são submetidos ao teste F ($p < 0,05$) e as análises são realizadas utilizando-se o programa SAS (2004).

MARCADORES MOLECULARES, IDENTIFICAÇÃO DE QTLS E SELEÇÃO GENÔMICA

A maioria das características de interesse econômico na pecuária é controlada por muitos genes de pequeno efeito individual, que estão sujeitos a influências ambientais. No entanto, alguns estudos já sugeriram a ocorrência de genes de efeitos maior para resistência ao carrapato, que poderiam ser explorados no processo de seleção de animais resistentes. Um destes genes foi identificado em bovinos da raça sintética Adaptur, produto do cruzamento entre Hereford e Shorthorn. De acordo com Frisch (1994), vários anos de seleção demonstraram que o número médio de parasitas em animais com 0, 1 ou 2 cópias do gene foi de 128, 36 e 7, respectivamente, demonstrando a potencialidade da utilização de genes de efeito maior.

As regiões cromossômicas responsáveis por controlar as características quantitativas, geralmente de interesse econômico, como a resistência a ectoparasitas, são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTLs). Dessa forma, diversas pesquisas estão sendo

direcionadas para buscar resultados de QTLs e polimorfismos em genes relacionados a essas características. (BIEGELMEYER et al., 2012).

Diversos estudos (GASPARIN et al., 2007; REGIANO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; PORIO NETO et al., 2010; PORIO NETO et al., 2011b) buscaram identificar QTLs para resistência ao carrapato em bovinos por meio de varredura do genoma com marcadores microssatélites. Nesses trabalhos, foram detectados QTLs nos cromossomos 2, 3, 5, 7, 10, 11, 14, 23 e 27.

Essas características quantitativas podem ser identificadas por meio da construção de mapas genéticos, sendo que essa é umas das aplicações imediatas dos resultados obtidos em projetos de sequenciamento. Com a finalidade de identificar os genes responsáveis pelas diferenças nas características fenotípicas em bovinos, polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP) estão sendo direcionados para saturar os mapas de locos de características quantitativas existentes. Dessa forma, com o grande número de marcadores moleculares utilizados, é possível rastrear os animais portadores de alelos ou combinação de alelos favoráveis que aumentam a produção. (SONSIEGARD; Van TASSEL, 2004; FURLAN et al., 2007).

Diversos estudos de associação genômica utilizando SNPs vem sendo conduzidos. Um grande número de polimorfismos de base única relacionados à característica de resistência ao *R. microplus* foi observado em diversos segmentos cromossômicos por Barendse (2007). Turner et al. (2010) demonstraram a ocorrência de uma baixa correlação entre os efeitos dos alelos envolvidos com a característica de produção leiteira e a contagem de carrapatos, indicando que uma seleção por animais resistentes não prejudicaria a produção de leite do rebanho.

Outro gene de interesse é o IFN- γ , um dos genes mais relatados para a imunidade inata e adaptativa contra infecções virais e intracelulares. Maryan et al. (2012) para identificar o papel desse gene na resistência ao carrapato, utilizaram animais resistentes e suscetíveis. Nove polimorfismos do tipo SNP foram identificados, três deles foram encontrados na região exônica. Uma das nove variantes já havia sido relatada anteriormente (ss82716193) e confirmada em população de gado paquistanês Sahiwal.

O mapeamento genético objetiva polimorfismos relacionados a regiões genéticas de interesse, mesmo que o gene responsável pela característica desejável não seja conhecido. Um dos tipos de marcadores moleculares mais polimórficos utilizados são os microssatélites, formados por uma sequência de até seis nucleotídeos repetidos em tandem.

Os genes do complexo maior de histocompatibilidade (*bovine lymphocyte antigen* - BoLA), localizados no cromossomo 23, são associados à resistência dos hospedeiros. Estes genes são codificadores de glicoproteínas receptoras das células apresentadoras de antígenos, onde se acoplam e apresentam peptídeos antigênicos para os linfócitos T, iniciando a resposta imune. Por esse motivo, são os mais estudados do sistema imunológico (HIZARD, 2008). Desta forma, variações nos genes de diferentes classes deste complexo influenciam, provavelmente, a capacidade imune dos animais. Entretanto, para que os mecanismos de resistência e desenvolvimento da resposta imunológica sejam completamente elucidados é necessário maior compreensão da expressão destes genes (TAKESHIMA; AIDA, 2006).

Acosta Rodríguez et al. (2005), identificaram associações entre a resistência ao carrapato em bovinos e os microssatélites DRB1 e DRBP1 que estão localizados no MHC. Outras associações significativas com a carga de carrapatos foram encontradas com marcadores microssatélites ou alelos de PCR-RFLP do gene BoLA-DRB3.2 (Martinez et al., 2006), DRB1 e DRB3 (Untalan et al., 2007). Infelizmente comparações válidas entre esses estudos são complicadas por diferenças na identificação dos alelos dos marcadores microssatélites utilizados, bem como nas diferenças das bases genéticas das raças bovinas utilizadas e das cepas de carrapato estudadas.

Cardoso et al. (2015) com o objetivo de identificar indivíduos Hereford e Bradford com características genéticas que os tornam menos suscetíveis ao carrapato, utilizaram milhares de marcadores moleculares para identificar os bovinos mais resistentes ao ectoparasita. Foi elaborada uma previsão de transmissão de genes associados ao mecanismo de resistência a partir de uma equação, que pode ser aplicada na seleção de animais das mesmas raças. Segundo os autores, com essa equação de predição de valores genéticos é possível a identificação de animais geneticamente mais resistentes sem a necessidade de coletar informações sobre contagem de carrapato.

No melhoramento animal, as características econômicas de baixa herdabilidade são amparadas pela utilização da genômica. As vantagens dessa ferramenta são a maior rapidez no processo de melhoramento genético e também mais precisão na escolha de reprodutores que vão transmitir a genética desejada. As técnicas tradicionais de seleção geralmente precisam de duas ou três gerações de animais para surtirem efeito, enquanto que essas novas tecnologias podem apresentar resultados bem mais rápidos, encurtando o intervalo entre o número de gerações e tendo maiores avanços em cada uma delas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-RODRÍGUEZ, R.; ALONSO-MORALES, R.; BALLADARES, S.; FLORES-AGUILAR, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GORODEZKY, C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 313-321, 2005.
- BARENDSE, W. Assessing tick resistance in a bovine animal for selecting cattle for tick resistance by providing a nucleic acid from the bovine animal and assaying for the occurrence of a single nucleotide polymorphism (SNP). **Patent application** WO2007051248-A1, p. 1-146, 2007.
- BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. L. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 1-11, 2012.
- CARDOSO, V. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte**. 2000. 108 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal, 2000.
- CARDOSO, F. F.; GOMES, C. C. G.; SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, M. M.; ROSO, V. V.; PICCOLI, M. L.; HIGA, R. H.; YOKOO, M. J.; CAETANO, A. R.; AGUILLAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 6, p. 2693-2705, 2015.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. 944p.
- FRISCH J. E. Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph, Ontario, Canadá. **Proceedings...** Guelph, Ontario, Canadá, p. 93-295, 1994.
- FRISCH, J. E.; Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 57-71, 1999.

- FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J. Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. **Animal Science**, v. 67, n. 1, p. 39-48, 1998.
- FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, supl., p. 331-341, 2007.
- GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L. L.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V. G. B.; SONSTEGARD, T. S.; REGITANO, L. C. A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, n. 5, p. 453-459, 2007.
- GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle, p. 9-44. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. eds. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: EMBRAPA-CNPq, 1998. 157p.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brasil. **Animal Production**, v. 41, p. 187-191, 1985.
- MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G. C. D.; FREITAS, C.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; SILVA, M. V. G. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2010.
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; SILVA, M. V.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; PRATA, M. C.; CAMPOS, A. L.; GUIMARAES, M. F.; AZEVEDO, A. L. S.; PIRES, M. F.; VERNEQUE, R. S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics Molecular Research**, v. 5, n. 3, p. 513-524, 2006.
- MARYAM, J.; BABAR, M. E.; NADEEM A.; HUSSAIN, T. Genetic variants in interferon gamma (IFN- γ) gene are associated with resistance against ticks in *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4565-4570, 2012.
- MORAES, F. R.; COSTA, A. J.; WOELZ, C. R.; MORAES, J. R. E.; ROCHA, U. F. Ecologia de carrapatos. XV: Susceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae). **Arquivo Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 45-52, 1986.
- OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzera ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 2, p. 127-135, 1990.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.
- PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; PRAYAGA, K. C.; BARENDSE, W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. **BMC Genetics**, v. 11, p. 55, 2010.
- PORTO NETO, L. R.; JONSSON, N. N.; D'OCCHIO, M. J.; BARENDSE, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 165-172, 2011a.
- PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARENDSE, W. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 50-55, 2011b.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTEWER, C.; NAKAGAWARA, K. (eds.). Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.
- REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CARVALHO, M. E.; ANDRÉO, R.; MOREIRA, I. C.; NÉO, T. A.; BARIONI JUNIOR, W. Avaliação da resistência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.9, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 48p.
- SANTOS JR., J. C. B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande Rio. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 305-311, 2000.

- SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user's guide. Version 9.1. Cary: **SAS Institute**, 2004.
- SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI JR., W. Natural infestations of beef cattle females by external parasites in southern Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8, 2006, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG, 2006.
- SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetics Research**, v. 84, n. 1, p. 3-9, 2004.
- TAKESHIMA, S.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science**, v.77, n. 2, p. 138-150, 2006.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.
- TURNER, L. B.; HARRISON, B. E.; BUNCH, R. J.; PORTO NETO, L. R.; LI, Y. T.; BARENDSE, W. A genome wide association study of tick burden and milk composition in cattle. **Animal Production Science**, v. 50, n. 4, p. 235-245, 2010.
- UNTALAN, P. M.; PRUETT, J. H.; STEELMAN, C. D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 190-195, 2007.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 63-70, 1998.