



Construção e caracterização de bibliotecas de cDNA de pele de bovinos F₂ (Holandês x Gir) infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*¹

Carlos Souza do Nascimento², Mayara Morena Del Cambre Amaral Weller³, Lucas Lima Filho³, Robert Domingues⁴, Simone Eliza Facioni Guimarães⁵, Marco Antonio Machado⁴

1-Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pela CAPES, FAPEMIG e CNPq

2-Pós-Doutorando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFV, Bolsista do CNPq. e-mail: carsouza_rj@hotmail.com

3-Estudante de graduação em Zootecnia - UFV, e-mail: mayaramorena@gmail.com (Bolsista do CNPq), Lucas_verardo@yahoo.com.br

4-Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite, e-mail: domingues.robert@gmail.com, machado@cnpq.embrapa.br

5-Departamento de Zootecnia – UFV, e-mail: sfacioni@ufv.br. Bolsistas CNPq, participantes do INCT – Ciência Animal

Resumo: A resistência do bovino ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos mais importantes fatores para reduzir custos relacionados ao controle desse parasita em sistemas tropicais e esta principalmente associada com animais zebu (*Bos indicus*), embora esteja também presente em menor nível em algumas raças taurinas (*B. taurus*). Com o intuito de caracterizar genes funcionais na pele envolvidos com resistência/susceptibilidade dos bovinos ao carrapato, duas bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de pele de animais F₂ (Holandês x Gir) resistentes (res) e susceptíveis (sus) infestados com larvas de *R. microplus*. Um total de 1292 sequência de alta qualidade foram seqüenciados e comparados com seqüências de proteínas não-redundantes (nr) do NCBI. Deste total, 790 (61,1%) transcritos apresentaram similaridade significativa com proteínas conhecidas, enquanto 502 (38,9%) não apresentaram homologia e representam provavelmente novos genes descritos. As seqüências identificadas nesse trabalho representam uma importante fonte para projetos de genômica funcional em bovinos, com seqüências completa ou parcialmente sendo disponibilizadas para 661 genes bovinos não previamente seqüenciados.

Palavras-chave: resistência, *Bos indicus*, genômica funcional, ESTs

Construction and Characterization of cDNA Libraries from Skin Tissue of F₂ Cattle (Holstein x Gyr) Infested with Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Abstract: Genetic resistance to bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is one of the most important factors to reduce costs related to the control of this parasite in tropical cattle systems and are mainly associated with zebu animals (*Bos indicus*), although it is also present in lower level in some taurine (*Bos taurus*) breeds. In order to characterize functional genes involved in tick resistance /susceptibility in cattle, two cDNA libraries were constructed from skin cattle F₂ animals (Holstein x Gyr). The expressed sequence tag (EST) approach was used to compare transcripts distribution from resistant (res) and susceptible (sus) animals infested by tick *R. microplus*. A total of 1292 high quality sequences was sequenced and compared to protein sequences in the NCBI non-redundant protein (nr) database. From this total, 790 (61,1%) transcripts shared significant similarity with known sequences, whereas 502 sequences produced no hit and are likely to represent newly described genes. The sequences we have identified in this work are a valuable resource for future studies on functional genomics using cattle with partial or complete sequences being made available for over 661 previously unsequenced bovine genes.

Keywords: resistance, *Bos indicus*, functional genomic, ESTs

Introdução

A elucidação da resistência genética do bovino ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos fatores mais promissores para reduzir as perdas de produção e diminuir o custo de controle deste parasita na pecuária bovina tropical. Novos métodos de controle podem ser desenvolvidos, sendo

de grande importância aos programas de melhoramento. Em geral, animais *Bos indicus* são mais resistentes às doenças parasitárias do que os animais *Bos taurus* (Utech et al. 1978). No entanto, pouco se sabe até o momento sobre os mecanismos genéticos envolvidos com a resistência genética ao carrapato em Zebu (*B. indicus*).

Em bovinos, seqüências derivadas dos transcritos têm sido organizadas no Bodymap-Xs (<http://lifesciencedb.jp/bodymap-xs>). Esse banco de dados sumariza dados de expressão gênica para inúmeras espécies permitindo realizar comparações de expressão para genes ortólogos e parálogos (Ogasawara et al. 2006). O BodyMap-Xs disponibiliza informações de 1.331.319, sendo 19458 *ESTs* de zebuínos. Estes transcritos representam os resultados de 399 bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos, sendo apenas 2 bibliotecas de pele, representando 35211 transcritos.

Um maior número de informações sobre os transcritos é fundamental para interpretar resultados de experimentos de genômica funcional, especialmente devido a pouca informação disponível sobre as seqüências gênicas de zebuínos. Essas raças dominam o mercado de produção bovina nas regiões tropicais e a geração de *ESTs* provenientes desses animais é importante para construir ferramentas de estudos genômicos que podem ser utilizadas para caracterizar a diversidade genética entre os animais de origem taurina e zebuína, em relação à saúde e produção. Diante da importância dos animais zebu e mestiços na pecuária leiteira nacional, fica evidente a necessidade de se aumentar o número de *ESTs*. Este trabalho teve como objetivo gerar informações de transcritos expressos na pele de bovinos F2 (Holandês x Gir) avaliados como resistentes e suscetíveis, submetidos a infestação experimental com *R. microplus*.

Material e Métodos

Animais e coleta de tecidos

Foram utilizados neste estudo animais considerados resistentes e animais suscetíveis, com valores genéticos extremos para resistência/suscetibilidade aos carrapatos para compor os grupos experimentais. Um total de seis animais F2 resistentes (res) e seis animais F2 suscetíveis (sus) a carrapatos foi selecionado para fornecer biópsias de pele. Os animais selecionados foram banhados com carrapaticidas, antes de serem submetidos à infestação experimental com 10.000 larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os animais do grupo res forneceram área sadia e do grupo sus forneceram área de lesão provocada pelos carrapatos. As amostras de pele foram coletadas no 5º e 12º dia após a infestação artificial.

Construção das bibliotecas de cDNA

Para a extração do RNA total, foram formados dois pools com 800 mg de biópsia de cada animal. A extração do RNA total foi feita utilizando o Kit RNeasy® Midi (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante e o mRNA foi purificado com o Kit OLIGOTEX® (Qiagen, Valencia, CA). Para a construção das duas bibliotecas de cDNA, foi usado o Kit Superscript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen,). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o Kit DYEnamic ET Dye Terminator e analisadas no seqüenciador MegaBACE 1000 DNA Analysis Systems (GE Healthcare).

Análise de bioinformática das seqüências

Análise de bioinformática das seqüências foi realizada com os programas Phred, Cross-match e CAP3. As buscas de homologia foram feitas com o programa BLASTX (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et. al., 1990) e alinhados contra o banco de dados de proteínas não redundantes (nr) (NCBI). BlastX hits que não atenderam ao requerimento mínimo (similaridade > 80% e E-value < 0,00001) foram removidas.

Resultados e Discussão

O principal objetivo em gerar *ESTs* a partir de biblioteca de cDNA é maximizar a descoberta de genes expressos e avaliar esta informação de seqüência como fonte para estudos genômicos funcionais. Duas bibliotecas de cDNA de pele de bovinos F₂ (Holandês x Gir) resistentes e suscetíveis ao carrapato *R. microplus* foram geradas. Um total de 4245 clones foram produzidos e seqüenciados e 175 *ESTs* de baixa qualidade foram removidas após a avaliação, resultando em 4070 seqüências sendo 1885 *ESTs* (res) e 2185 *ESTs* (sus). Do total de clones gerados, foram obtidas 2700 seqüências de alta qualidade após o processamento. A análise do agrupamento com o programa Cap3 resultou em 1292 seqüências únicas, 450 contigs e 889 singlets com tamanho médio de 471,3 (res) e 424,1 (sus) nucleotídeos. Um resumo com a estatística das *ESTs* pode ser visualizado na Tabela 1.

Cada sequência única foi submetida a busca de homologia com o algoritmo BlastX contra a base de proteínas nr (NCBI) para identificação de possíveis proteínas homólogas. Setecentos e noventa (61,1%) sequências mostraram homologia a proteínas conhecidas, sendo 495 (62,6%) e 295 (37,4%) transcritos da biblioteca res e sus, respectivamente. Destas, 129 foram homólogas a proteínas bovinas e 661 mostraram similaridades com outras espécies, tais como, humanos e camundongos. Esses resultados representam um índice de novidade de 83,7%. No entanto, deve ser considerado que esses resultados foram obtidos pela atribuição automática de homologia em bases de dados e precisam ser confirmados pela anotação manual. Atribuição automática de homologia pode estar sujeita a erros se parâmetros de buscas bem definidos não forem usados.

Do total de ESTs disponíveis no BodyMap-Xs, 29518 transcritos foram originados de pele de embrião e apenas 5693 ESTs foram geradas a partir de pool de pele de animais Hereford e Shorthorn infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Wang et al. 2008). No entanto, até o momento, nenhum estudo com animais cruzados têm sido relatado. Este é o primeiro estudo realizado com animais cruzados (Holandês x Gir). Os transcritos gerados neste estudo podem contribuir de forma substancial para o melhor entendimento da genômica funcional da interação parasita-hospedeiro neste tecido.

Tabela 1. Resumo das estatísticas das ESTs para as duas bibliotecas de cDNA de pele

Seqüenciamento	Bibliotecas		
	Resistente	Suscetível	Total
3'	3'-279	3'-228	507
5'	5'-1606	5'-1957	3563
Total	1885	2185	4070
Sequências de alta qualidade	1235	1465	2700
Agrupamento			
Sequências únicas	700	592	1292
Contigs	226	223	450
Singlets	512	366	889
Tamanho médio (nucleotídeo)	471,3	424,1	447,7
Alinhamento			
BlastX hits (%)	495 (62,6)	295 (37,4)	790 (61,1)

Conclusões

Nesse estudo, 4070 clones foram produzidos gerando 1292 sequências únicas. Essas sequências representam um acréscimo de 7,3 % ao total de transcritos de pele organizados no BodyMap-Xs. Quando se considera as ESTs derivadas de experimentos semelhantes com infestação com carrapatos, esse número representa um acréscimo de 44,9%. Portanto, a construção dessas duas bibliotecas irá incrementar de forma substancial o número de transcritos derivados de pele de bovinos e contribuir para um melhor conhecimento dos genes expressos neste tecido.

Agradecimentos

Esse trabalho obteve financiamento da FINEP, CNPq, e FAPEMIG.

Literatura citada

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, E.W. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403– 410, 1990.
- OGASAWARA, O.; OTSUJI, M.; WATANABE, K.; IIZUKA, T.; TAMURA, T.; et al. BodyMap-Xs: Anatomical breakdown of 17 million animal ESTs for cross-species comparison of gene expression. *Nucleic Acids Research*, v.34, p.D628–D631, 2006.
- UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn Cattle for Resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. *Australian Journal Agricultural Research*, v. 29, n. 2, p. 411-422, 1978.
- WANG, Y.H.; REVERTER A.; KEMP D.; MCWILLIAM S.M.; INGHAM A et al. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. *Australian Journal Experimental Agricultural*, v.47, p.1397-1407, 2007.