

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO

Transcriptômica e imunoinformática para identificação de  
estratégias de controle complementar do carrapato do boi

Isabella Maiumi Zaidan Blecha

CAMPO GRANDE, MS  
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

Transcriptômica e imunoinformática para identificação de estratégias  
de controle complementar do carrapato do boi

*Transcriptional and immunoinformatics to identify strategies of complementary  
control of the cattle tick*

**Isabella Maiumi Zaidan Blecha**

**Orientador: Dr. Renato Andreotti  
Co-Orientadora: Dra. Fabiane Siqueira**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2018



## **Gado de Corte**

**Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da  
Embrapa Gado de Corte**

### CERTIFICADO

<b>Protocolo Nº: 015/2014</b>
<b>Pesquisador / Orientador: Renato Andreotti</b>
<b>Responsável pelo Projeto: Fabiane Siqueira</b>
<b>Título do Projeto: Estudos de genômica funcional para identificação de genes e rotas de regulação gênicas associadas à resposta imunológica de bovinos de corte ao carrapato.</b>

A CEUA da Embrapa Gado de Corte, após análise das adequações solicitadas, emitiu o parecer **APROVADO** referente a este Protocolo, conforme exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Vanessa Felipe de Souza  
Coordenador da CEUA

Campo Grande, 20 de outubro de 2014.

*Aos meus zelosos pais, Lilyan e Ailton  
Ao meu amado marido, Diego  
Dedico com carinho*

## **AGRADECIMENTOS**

A realização de uma tese só se torna possível com muito envolvimento pessoal, com a participação de colegas, com parcerias e integração entre diferentes instituições acadêmicas e de pesquisa. Dessa forma, gostaria de agradecer à Embrapa Gado de Corte, empresa que ingressei como estagiária de iniciação científica em 2007 e estou até hoje, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, juntamente com os professores do curso de Pós-graduação e demais funcionários por colaborarem na minha jornada acadêmica.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) em Piracicaba/SP, em especial ao Laboratório de Biotecnologia Animal, ao Professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho, Marcela e Pilar pela oportunidade de acompanhar o serviço terceirizado de sequenciamento e à Dra. Polyana Tizioto pela ajuda com a interpretação dos resultados e por disponibilizar seu tempo sempre que possível.

Ao meu orientador, Renato Andreotti, pela oportunidade, incentivo, confiança, pelos conselhos que contribuíram para meu crescimento profissional e, acima de tudo, ao seu comprometimento para que tudo ocorresse bem durante esses anos de doutorado.

À minha co-orientadora, Fabiane Siqueira, que me acompanha desde 2007. Obrigada pela primeira oportunidade, por continuar acreditando em mim, por estar envolvida diretamente com meu crescimento pessoal e científico. Grata pela acolhida, pela confiança e paciência.

À Jacqueline Cavalcante e Anna Beatriz R. Ferreira, analistas da Embrapa Gado de Corte, pelo tempo dedicado ao meu projeto.

Ao Dr. Wilson Werner Koller, por tornar essa jornada mais leve, sempre com uma palavra amiga ou um sábio conselho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório do Carrapato (Alexandre Silva, André de Abreu Rangel Aguirre, Bárbara Csordas Guimarães, Francisco Tobías Barradas-Piña, Leandra Marla Oshiro, Leandro de Oliveira Souza Higa, Marcos Valério Garcia, Namor Pinheiro Zimmermann, Pâmella Oliveira Duarte e Vinicius da Silva Rodrigues), por participarem efetivamente de várias etapas do projeto, por todo auxílio prestado, pelo convívio e ambiente de trabalho sempre afáveis.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório Genômica e Melhoramento Animal (Catherine Cecília Walker, Franciele da Silva Oliveira, Gustavo Garcia Santiago, Isadora

Inácio Sousa e Thalles Policarpo de Carvalho Lima), pela torcida, incentivo, otimismo e pela satisfação em compartilhar o agradável convívio de tantos anos.

Aos senhores Ari da Silva Charão e Rubens Luiz Soares, assistentes da Embrapa Gado de Corte, responsáveis pelo cuidado com os animais experimentais no período que ficaram alojados nas baias da Sanidade Animal.

Aos meus pais, Ailton e Lilyan, pela dedicação na minha educação, incentivo, confiança, amor, respeito, compreensão, pelos valores repassados, por acreditarem que a maior herança que podem deixar aos filhos é a educação, por estarem sempre presentes e comemorarem a conclusão de cada etapa.

Ao meu irmão Luís Henrique, por ser meu exemplo de dedicação.

Ao meu amado marido, Diego Pavanelli, que pacientemente me apoiou e incentivou.

Aos demais familiares e amigos próximos que sempre vibraram com cada conquista minha.

À Casa Branca Agro Pastoral LTDA e ao senhor Gilmar Siqueira de Miranda por cederem os animais experimentais Angus e Cruzados meio sangue.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e à Embrapa pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e para minha formação acadêmica. Muito obrigada!

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino” (Paulo Freire).





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
Bovinos .....	16
<i>Rhipicephalus microplus</i> .....	17
Resistência ou suscetibilidade dos bovinos ao <i>R. microplus</i> .....	20
Relação parasito-hospedeiro .....	21
Bm86 .....	22
RNA-seq e Expressão gênica diferencial .....	24
Referências.....	27
ANÁLISE COMPARATIVA DE TRANSCRIPTOMAS DE PELE DE BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS INFESTADOS ARTIFICIALMENTE PELO CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	36
Resumo.....	37
Introdução .....	38
Material e métodos.....	39
Resultados e Discussão .....	46
Conclusão.....	70
Agradecimentos.....	71
Referências.....	72
ANÁLISE DE EPÍTOPOS CONSERVADOS DA BM86: É POSSÍVEL UMA VACINA GLOBAL CONTRA CARRAPATO-DO-BOI? .....	77
Resumo.....	79
Introdução .....	80
Material e métodos.....	82
Resultados .....	85
Discussão.....	86
Conclusão.....	90
Agradecimentos.....	91
Referências.....	92
Figuras.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	106
APENDICE.....	107

## Resumo

BLECHA, I. M. Z. Transcriptômica e imunoinformática para identificação de estratégias de controle complementar do carrapato do boi. 2018. 109 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

*Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago responsável por grandes perdas à pecuária mundial. A principal forma de controle utilizada contra infestações por carrapatos é a utilização de acaricidas. Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos acarreta em danos ao meio ambiente, contaminação dos trabalhadores que utilizam esses químicos, dos animais e dos produtos de origem animal. Além disso, já foram relatadas diversas populações de carrapatos resistentes às mais variadas bases químicas. Um método de controle complementar ao uso de acaricidas é a vacina comercializada contendo a proteína Bm86, entretanto essa ferramenta apresenta variações de eficácia em relação a diferentes cepas de carrapatos e às diversas localizações geográficas. Nesse contexto, é extremamente importante o desenvolvimento de pesquisas que visam à busca por métodos de controle mais eficientes. Utilizou-se a metodologia de sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-Seq) para obtenção do transcriptoma de pele de diferentes grupos genéticos de bovinos frente à infestação artificial por *R. microplus* e análise *in silico* para determinar o efeito da variabilidade de sequência dentro do loco Bm86 nos principais epítomos da proteína Bm86 como um meio de identificar possíveis isolados que confirmam proteção contra cepas de *R. microplus* de várias origens geográficas. O conhecimento gerado com o mapeamento e a identificação de genes candidatos poderá ser usado na seleção de indivíduos resistentes ao carrapato em programas de melhoramento genético e para descoberta de novos antígenos com capacidade imunoprotetora, permitindo, assim, o desenvolvimento de produtos e/ou tecnologias para combater este ectoparasita. Além disso, considerando a conservação dos epítomos selecionados na análise *in silico*, concluiu-se que pode ser possível a obtenção de uma vacinação efetiva contra esses carrapatos usando um único antígeno universal conservado baseado na proteína Bm86. De forma geral, são apresentados neste trabalho, alternativas para o desenvolvimento de métodos de controle complementares para o carrapato do boi, como os genes diferencialmente expressos identificados nos três grupos genéticos de bovinos analisados e o possível uso dessas informações em programas de melhoramento, além da evidência da possibilidade do desenvolvimento de uma vacina de uso geral, assegurando

um grau de eficácia uniforme e global para todas as populações de carrapatos de interesse econômico.

Palavras-chave: Bm86. Bovinos. Expressão gênica. *Rhipicephalus microplus*. Sequenciamento de RNA. Vacina.

## Abstract

BLECHA, I. M. Z. *Transcriptional and immunoinformatics to identify strategies of complementary control of the cattle tick*. 2018. 109 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

*Rhipicephalus microplus* is a hematophagous ectoparasite responsible for large losses in livestock worldwide. The main form of control used against tick infestations is the use of acaricides. However, the indiscriminate use of these products causes damage to the environment, contamination of workers who use these chemicals, animals and products of animal origin. In addition, several populations of ticks resistant to the most varied chemical bases have been reported. A method of complementary control to the use of acaricides is the commercialized vaccine containing the Bm86 protein, however this tool shows variations of efficacy in relation to different populations of ticks and to the different geographic locations. In this context, it is extremely important to develop research that aims to search for more efficient control methods. The large-scale RNA sequencing methodology (RNA-Seq) was used to obtain the skin transcriptome of different bovine genetic groups against artificial infestation by *R. microplus* and in silico analysis to determine the effect of sequence variability within of the Bm86 locus in the major epitopes of the Bm86 protein as a means of identifying possible isolates that confer protection against strains of *R. microplus* from various geographic origins. The knowledge generated with the mapping and identification of candidate genes can be used in the selection of tick-resistant individuals in genetic breeding programs and in the discovery of new antigens with immunoprotective capacity, thus allowing the development of products and / or technologies to combat this ectoparasite. In addition, considering the conservation of the selected epitopes in the in silico analysis, it was concluded that it may be possible to obtain an effective vaccination against these ticks using a single conserved universal antigen based on Bm86 protein. In general, are shown alternatives for the development of complementary control methods for cattle tick, such as the differentially expressed genes identified in the three genetic groups of cattle analyzed, and the possible use of this information in breeding programs, besides the evidence of the possibility of development of a vaccine of general use, ensuring a uniform and global rate of effectiveness for all populations of ticks of economic interest.

Keywords: Bm86. Bovine. Gene expression. *Rhipicephalus microplus*. RNA sequencing. Vaccine.

## INTRODUÇÃO

Grande parte das diferenças fenotípicas e genotípicas consideráveis entre as subespécies de bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são decorrentes das diferenças nos processos de domesticação e seleção desses animais durante todo o período evolutivo (O'NEILL et al., 2010). Bovinos de origem zebuína (*Bos taurus indicus*) são reconhecidamente mais resistentes à infestação por ectoparasitas em regiões tropicais quando comparados aos de origem taurina (*Bos taurus taurus*).

Essa resistência pode ser devido a características do hospedeiro bovino, como cor de pelagem, espessura do couro, peso, idade, sexo e estado nutricional. Entretanto, grande parte da diferença que caracteriza resistência ou suscetibilidade ao carrapato do boi está sob controle genético. Dessa forma, o uso de avaliações genéticas para classificar a resistência ou susceptibilidade em bovinos tem sido demonstrada em trabalhos previamente publicados (MACHADO et al., 2010; BIEGELMEYER et al., 2015; SOLLERO et al., 2017).

A resistência do bovino ao carrapato pode também sofrer influência quanto à época do ano. Esses animais ficam mais sensíveis no outono do que no inverno, possivelmente devido ao fato do fotoperíodo mais curto afetar o processo de resposta inflamatória no local da picada (SUTHERST et al., 1983; GOMES et al., 1989).

Além disso, as variáveis climáticas, como temperatura e umidade, também influenciam o desenvolvimento e a sobrevivência dos carrapatos. Dependendo da altitude da região, a variação de um ou outro desses fatores causa prejuízos biológicos diminuindo a quantidade de larvas na pastagem (FURLONG, 2005).

Devido o Brasil ser um país de um clima tropical, o carrapato do boi tornou-se um dos ectoparasitas bovinos mais prevalentes, acarretando em prejuízos da ordem \$ 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014) e para seu controle deve-se abordar princípios apoiados no conhecimento da epidemiologia e ecologia destes ácaros, aliado a técnicas de manejo dos animais e das pastagens, dificultando a sobrevivência das fases de vida livre do parasita (BIEGELMEYER et al., 2012).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* interfere na relação parasito-hospedeiro secretando moléculas anti-hemostáticas, substâncias anti-inflamatórias, anestésicas e imunomoduladores no local da picada (RIBEIRO, 1995; KAZIMÍROVÁ & ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013). Por serem parasitas hematófagos, quando presente em grande número, podem causar debilitação em seus hospedeiros, como perda de apetite, perda de peso e morte em

decorrência de anemia. A infestação com cerca de 200 carrapatos por mais de seis semanas pode ser fatal (FRISCH et al., 2000).

O método mais usual de controle do carrapato que tem sido utilizado desde o final do século XIX baseia-se na utilização de produtos químicos, que atuam na fase de vida parasitária do carrapato. Entretanto, tem-se relatado a multiplicação de populações de carrapatos resistentes a acaricidas em todas as regiões com produção pecuária intensa (ANDREOTTI et al., 2011; RECK et al., 2014; SINGH et al., 2015), culminando com o aumento de resíduos na carne e no leite e na escassez de novas bases químicas para controle do carrapato. Os prejuízos causados pelos carrapatos tendem a ser ainda maiores com o estabelecimento de barreiras sanitárias contra resíduos químicos, justificando a necessidade de desenvolver alternativas sustentáveis e não poluentes para o controle deste ectoparasita.

O controle de carrapatos por meio de vacinas é um complemento ao uso de acaricidas. Alguns exemplos de vacinas usam a proteína Bm86 como imunógeno contra carrapatos, entre eles a vacina cubana Gavac TM (Heber Biotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba) (DE LA FUENTE et al., 1998) e a TickGARD, que já não está comercialmente disponível (Intervet Australia Pty. Ltd., 91-105 Harpin Street Bendigo, East Vic.) (WILLADSEN, 1997). Entretanto, essas vacinas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir de imediato o uso de acaricidas, sugerindo a necessidade de métodos de controle complementares. O percentual de eficácia de TickGARD e GavacTM em teste de estábulo com isolado regional de Campo Grande – MS (Brasil) de *R. microplus* foi de 46,4% e 49,2%, respectivamente (ANDREOTTI, 2006).

Os avanços científicos acumulados nas últimas décadas permitiram incluir ferramentas imunológicas no controle do *R. microplus*, destacando-se o desenvolvimento de outras vacinas contendo o antígeno recombinante Bm86 (RODRÍGUEZ VALLE et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2007).

As vacinas baseadas em peptídeos sintéticos (BEN-YEDIDIA & ARNON, 1997) e a orientação de estratégias de cruzamentos entre raças bovinas estão cada vez mais em evidência (UTECH et al., 1978a; MATTIOLI et al., 1993; DA SILVA et al., 2007). Segundo Fraga et al. (2003), existe variação genética aditiva para o grau de infestação por carrapatos suficiente para se obter progresso genético para resistência, pela seleção de animais menos infestados, sendo assim, um programa promissor para controle do carrapato, que também poderá ser associado a outras medidas de controle.

Neste contexto, objetivou-se com esse trabalho, a busca por métodos complementares de controle do carrapato *R. microplus*, buscando genes diferencialmente expressos e vias

metabólicas enriquecidas por meio de análise de RNA-seq em bovinos com diferentes graus de resistência (Nelore, Angus e Cruzados  $\frac{1}{2}$  Angus X  $\frac{1}{2}$  Nelore) infestados artificialmente com larvas de *R. microplus* (Artigo 1) e propondo uma vacina universal baseada em uma análise em sílico de epítomos conservados na proteína Bm86 (utilizada na vacina comercial), contra as múltiplas populações geograficamente distintas de *R. microplus* e de espécies de carrapatos relacionadas com impacto econômico de outras regiões geográficas (Artigo 2).

Os conhecimentos gerados, de forma geral, constituem a base para realização de novas análises para identificação de genes candidatos, de polimorfismos relacionados à resistência bovina ao carrapato, visando o direcionamento de cruzamentos entre raças no melhoramento genético animal, além de oferecer novas tecnologias e alternativas para controle desse ectoparasita.



## REVISÃO DE LITERATURA

### Bovinos

Os bovinos podem ser divididos de acordo com duas classificações: os taurinos, de origem europeia, e os zebuínos, originários da Ásia. Esses dois grupos são basicamente diferenciados entre si pela ausência ou presença de cupim. Os tempos de divergência estimados em estudo realizado por Hiendleder et al. (2008) indicaram que as duas subespécies de gado se separaram entre 1,7 e 2,0 milhões de anos atrás.

O caminho evolutivo dos bovinos desde a sua domesticação fornece uma visão sobre os níveis atuais de aptidão física, bem como uma melhor compreensão das interações entre genótipos, ambientes e estratégias de intervenção de manejo (O'NEILL et al., 2010).

Os taurinos são da Europa Setentrional (Norte) de clima temperado. Esses animais apresentam orelhas curtas e ausência de corcunda e pelagem mais espessa, além disso, algumas raças são suscetíveis a queimaduras solares (CHAN et al., 2010).

Entre as raças taurinas o Aberdeen Angus se destaca por reunir um maior número de características positivas que lhe asseguram um excelente resultado econômico como gado de corte, como: habilidade materna, precocidade, desempenho produtivo, qualidade de carne e alta indicação para uso em cruzamentos devido aos seus atributos genéticos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANGUS, ANGUS.ORG, 2018). Entretanto, essa raça é altamente afetada por parasitas (ZHAO et al., 2013), podendo esta característica estar relacionada com o fato dos animais *B. taurus taurus* apresentarem reduzida adaptação aos trópicos e sofrerem com o estresse térmico (WEST, 2003), além das diferenças nos perfis de resposta imune, onde por exemplo, bovinos resistentes a carrapatos reconhecem mais proteínas salivares do carrapato que estão supostamente envolvidas em várias funções do parasitismo e da alimentação quando comparados a bovinos sensíveis (GARCIA et al., 2017).

Além disso, os bovinos zebuínos são mais resistentes a *R. microplus* do que as de bovinos taurinos possivelmente porque animais *Bos taurus indicus* foram domesticados na Ásia (BRADLEY et al., 1998), possível local de origem do carrapato (ESTRADA-PENA et al, 2006). As importações de gado Zebu da Índia ocorreram ao longo dos séculos XIX e XX (SANTIAGO, 1985). A raça Nelore, correspondente à raça Ongole na Índia, apresenta seus primeiros registros de importação para o Brasil em meados do século XX (ARAÚJO et al., 2014). Segundo Magnabosco et al. (1997), seis touros importados contribuíram

significativamente para a formação do rebanho brasileiro Nelore, sendo esses considerados a base genética dessa raça no Brasil.

A raça Nelore mostrou uma excelente adaptação às condições ambientais locais, o que causou um crescimento populacional significativo (VOZZI et al., 2006). Atualmente, o rebanho bovino brasileiro é composto por, aproximadamente, 218,2 milhões de cabeças (IBGE, 2016), estimando-se que 80% do rebanho bovino nacional é composto por animais zebu puros ou com sangue de zebu. Esta raça agregou qualidade ao rebanho que existia no Brasil devido a adaptação ao clima tropical, facilidade de partos, habilidade materna, resistência a parasitas, ganho de peso, dentre outros requisitos.

Embora a composição racial dos animais utilizados no sistema brasileiro de produção seja predominantemente Nelore, devido sua adaptabilidade ao clima tropical, bovinos de outras raças também são utilizados em sistemas de cruzamentos visando à melhoria de algumas características de interesse econômico. Utilizar grupos genéticos com maior proporção de genética taurina possibilita reduzir a idade de abate dos bovinos, diminuindo os tempos no sistema de produção e aumentando a lucratividade (EUCLIDES FILHO, 1998).

Neste contexto, o melhoramento genético animal baseia-se em duas principais ferramentas: seleção e cruzamento. A seleção objetiva a melhoria e/ou fixação de alguma característica de importância, ou seja, tem por finalidade aumentar a frequência de alelos favoráveis na população e o cruzamento é uma forma de se conseguir melhoria genética e incrementos de produção e de produtividade (EUCLIDES FILHO, 1999).

Segundo Frisch et al. (1999), uma alternativa viável para se contornar todos os problemas provocados pelo carrapato é a seleção de animais geneticamente resistentes com a introdução nos rebanhos de alelos relacionados à resistência bovina a esse ectoparasita. Dessa forma, o uso racional de raças bovinas resistentes ao carrapato e seus cruzamentos são opções viáveis para a cadeia produtiva (UTECH et al., 1978a; MATTIOLI et al., 1993; DA SILVA et al., 2007).

### ***Rhipicephalus microplus***

Os carrapatos formam um grupo de artrópodes hematófagos obrigatórios. Segundo a classificação do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – ID: 6941), *R. microplus* pertence ao Reino Metazoa, Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae, Gênero *Rhipicephalus*, Subgênero *Boophilus*, Espécie *R.*

*microplus*. Aproximadamente 80% dos carrapatos existentes na fauna pertencem a família *Ixodidae* (GUGLIELMONE et al., 2010), dentre eles a espécie *R. microplus*.

*R. microplus* teve origem na Ásia e está presente em áreas tropicais e subtropicais (JOHNSTON et al., 1986). O primeiro relato de um bovino sendo parasitado por *R. microplus* foi em 1872, na Ilha de Darwin (AGRICULTURE HANDBOOK, 1976). Segundo Gonzales (1974), esse carrapato é o mais comumente encontrado em bovinos, por isso é conhecido como carrapato do boi, apesar de também ser encontrado parasitando outros animais, como, por exemplo, equinos (BITTENCOURT, 1990), ovinos deslanados em pastagens próximas ou compartilhadas com bovinos infestados (GARCIA et al., 2014; KOLLER et al., 2015).

Até o ano de 2003, era classificado como *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), mas por meio de estudos filogenéticos realizados por Murrell e Barker (2003), foi reposicionado no gênero *Rhipicephalus*, passando a ser denominado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Trata-se de uma espécie monóxena, ou seja, necessita de um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida (ROCHA, 1984). A sua fase de vida parasitária começa com a fixação da larva no hospedeiro até o estágio de adulto ingurgitado (fêmea) que, ao se desprender do animal, começa a fase de vida livre dando início à postura, incubação e posterior eclosão das larvas. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas (GONZALES, 1974; FURLONG, 1993).

A saliva dos carrapatos possui moléculas que exibem diversas funções para mediar uma refeição de sangue bem sucedida, agindo contra as respostas hemostáticas, inflamatórias e imunológicas do hospedeiro. Esses componentes salivares do carrapato podem alterar a eficiência da adesão dos leucócitos às células endoteliais na corrente sanguínea (CARVALHO et al., 2010).

Os carrapatos em geral, são vetores de uma variedade de agentes patogênicos que estão implicados em patologias severas em muitas espécies (GUGLIELMONE et al., 2006; DE LA FUENTE et al. 2008). Riek (1957) estimou que cada fêmea ingurgitada é responsável pela perda de 1 mililitro (mL) de sangue. Essas infestações podem causar anemia, reações alérgicas, desvalorização do couro, queda na produção de leite, diminuição no ganho de peso, transmissão das doenças babesiose e anaplasiose e morte (DE CASTRO, 1997; FRISH et al., 2000; GOMES, 2000; JONGEJAN & UILENBERG, 2004; JONSSON, 2006).

Devido aos fatores supracitados, os carrapatos compõem o complexo de artrópodes que causam os maiores prejuízos à produção animal no mundo. As perdas, diretas e indiretas,

com infestações por carrapatos no Brasil foram estimados em \$ 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

Sabe-se que 95% dos carrapatos se encontram em vida livre, ou seja, no ambiente, estando sob a forma de fêmeas ingurgitadas em pré-postura e postura, ovos em incubação e larvas esperando um hospedeiro. Os demais 5% estão em fase parasitária, sobre os bovinos (POWELL & REID, 1982).

O método mais comum utilizado para o controle do carrapato, empregado desde 1885, (ARTECHE, 1982 apud MERLINI & YAMAMURA, 1998) baseia-se na utilização de produtos químicos. Entretanto, estes ácaros desenvolveram uma alta capacidade de adaptação às bases químicas e, como consequência, surgiram populações resistentes aos acaricidas (FRISCH, 1999; ANDREOTTI et al., 2011; RECK et al., 2014; SINGH et al., 2015). No Brasil, existem registros de resistência dos carrapatos a diversas bases químicas acaricidas em 13 estados (HIGA et al., 2015).

O controle por meio de formulações químicas, devido a pouca ou nenhuma instrução técnica adequada, também tem acarretado em contaminação do trabalhador, poluição ambiental, presença de resíduos nos produtos de origem animal, além de ações deletérias nos organismos que atuam como inimigos naturais do carrapato, por exemplo, as formigas, aranhas e galinhas domésticas (ROCHA 1984; GONZALES, 1995).

O manejo integrado de carrapatos consiste na combinação sistemática de pelo menos duas tecnologias de controle com o objetivo de reduzir a pressão de seleção em favor de indivíduos resistentes a acaricidas e controlar populações de carrapatos que afetam negativamente as espécies hospedeiras (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018).

Andreotti et al., (2016) recomenda para o Centro Oeste brasileiro a realização de uma série de cinco tratamentos com carrapaticida de contato com intervalos menores que 21 dias, evitando assim, o desenvolvimento das larvas do carrapato por um período de 105 dias, retirando grande parte da população de larvas das pastagens e, conseqüentemente, diminuindo significativamente a quantidade de teleóginas no pasto.

Além disso, outras medidas complementares, como a vacinação com antígenos dos próprios carrapatos, rotação de acaricidas, rotação de pastagens, manejo nutricional, controle biológico natural (predadores, fungos e nematoides), utilização de raças bovinas resistentes para direcionar cruzamentos, podem auxiliar no controle desse parasita.

## **Resistência ou suscetibilidade dos bovinos ao *R. microplus***

A resistência bovina ao carrapato é definida como a capacidade do gado limitar o número de carrapatos que sobrevivem até o estágio de vida adulto (UTECH et al., 1978b). A manifestação da característica de resistência ao carrapato pode ser relacionada a várias características morfológicas do hospedeiro, como a cor e o tipo de pelagem, espessura da pele e do pêlo, idade, sexo, ou fatores ambientais e climáticos como estação do ano (WHARTON E UTECH, 1970) e diferenças na expressão gênica, principalmente, relacionadas à resposta imune (GASPARIN et al., 2007; IBELLI et al., 2012, FOSTER et al., 2013), sendo que já está bem estabelecido que o sucesso da fixação e alimentação do carrapato *R. microplus* no bovino depende muito da origem genética do hospedeiro.

De acordo com Frisch (1999), durante o período evolutivo dos bovinos, o contato com carrapatos fez com que determinadas espécies bovinas desenvolvessem uma grande quantidade de genes de efeitos menores, sendo que essa característica foi observada de forma mais acentuada em raças resistentes quando comparadas a raças suscetíveis.

O conhecimento de estimativas de parâmetros genéticos de características de importância econômica é o primeiro pré-requisito para seleção em programas de melhoramento animal. As contrastantes cargas de carrapatos são de caráter hereditário (UTECH et al., 1978b; WAMBURA et al., 1998), sendo que a herdabilidade da resistência ao carrapato varia de muito baixa a alta em diversos estudos (HENSHAL, 2004; ALENCAR et al., 2005). Cardoso et al. (2006) consideraram a baixa herdabilidade dessa característica como um fator limitante da seleção convencional para resistência a carrapatos, já Porto Neto et al. (2011) analisaram diversos valores para herdabilidade da característica de resistência ao carrapato e afirmaram que uma herdabilidade de 0,30 para carga de carrapatos em bovinos é suficiente para resultar no sucesso de programas de seleção para resistência ao carrapato.

Variações consideráveis entre e dentro das raças quanto à resistência ao carrapato são bem documentadas na literatura, com evidências de maior resistência das raças indianas (*B. taurus indicus*) quando comparadas as raças europeias (*B. taurus taurus*) (FRISCH & O'NEILL, 1998; WAMBURA et al., 1998; SANTOS JR et al., 2000; FRAGA et al., 2003; ZHAO et al., 2013), por exemplo, os bovinos puros da raça Brahman (*B. taurus indicus*) apresentam, geralmente, um décimo do número de carrapatos quando comparados aos bovinos puros da raça Hereford (*B. taurus taurus*), expostos às mesmas infestações (JONSSON, 2006).

Devido à importância do controle do carrapato para a cadeia produtiva bovina e saúde pública é necessário viabilizar novas estratégias de controle e elucidar as principais causas genéticas observadas nas diferenças de resistência ou suscetibilidade entre animais taurinos e zebuínos.

### **Relação parasito-hospedeiro**

Em um estudo conduzido por Riek (1962), a resistência de bovinos *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus* e de seus cruzamentos, foi avaliada por infestação experimental repetida com o carrapato *R. microplus*. Foram observados dois tipos de resistência: uma resistência adquirida que se tornou evidente após a exposição repetida e uma resistência inata que estava presente em alguns animais, nunca antes expostos, na primeira infestação. A resistência adquirida foi menos evidente em taurinos puros. Quando taurinos puros (Shorthorns) e um grupo de Cruzados de *B. taurus taurus* (Shorthorn) x *B. taurus indicus* (Zebu) foram expostos a infestações naturais, os animais Cruzados apresentaram significativamente maior resistência.

Uma das primeiras formas do hospedeiro se livrar do incômodo causado pelo parasita se dá por meio de auto limpeza ou lambedura, conhecida também como *grooming*, e fricção do corpo em alguma superfície para retirada mecânica (ROCHA, 1976). No entanto, as informações sobre as estratégias imunológicas utilizadas pelos hospedeiros para combater esse tipo de ectoparasita ainda não estão muito consolidadas (CONSTANTINOIU et al., 2010).

A saliva do carrapato contém moléculas que são inoculadas no local da fixação e da picada do carrapato em seus hospedeiros, a fim de modular a resposta imune local e obter sucesso na alimentação (RIBEIRO, 1995). Entretanto, fenótipos contrastantes são observados em bovinos infestados com *R. microplus* (KASHINO et al., 2005) e estão relacionados com diferenças na composição celular e molecular de infiltrados inflamatórios provocados por picadas do parasita.

São descritas mudanças histológicas na pele após a ligação dos vários instares de carrapato. Em bovinos altamente resistentes, a concentração de histamina no sangue atingiu um pico de 48 horas após a infestação com larvas e diminuiu para níveis normais após uma semana. Em bovinos suscetíveis, houve pouca ou nenhuma variação nos níveis de histamina durante o ciclo de vida parasita do carrapato (RIEK, 1962).

Carvalho et al. (2010) demonstraram em um estudo histológico, que as reações cutâneas de hospedeiros resistentes a picadas de carrapatos adultos continham significativamente mais basófilos e eosinófilos em comparação com reações de bovinos da raça suscetível. Além disso, elevados níveis de E-selectina (que promove a adesão das células T de memória) foram encontrados sendo expressos na pele de animais resistentes. Isso pode explicar a capacidade do hospedeiro resistente ser mais eficiente em produzir respostas em infestações posteriores, limitando, dessa forma, a fixação das teleóginas e a hematofagia.

Pesquisa conduzida por Franzin et al. (2017) sugere que as respostas cutâneas aos carrapatos se desenvolvem mais gradualmente em raças de bovinos geneticamente suscetíveis utilizadas no estudo (Holstein), o que possibilita maior sucesso na alimentação dos carrapatos.

Ainda, dependendo de sua origem (taurina ou zebuína), os bovinos expressam diferentes fenótipos quando expostos ao carrapato *R. microplus*. Kashino et al. (2005), indicaram que existem diferenças significativas nas respostas de anticorpos aos antígenos salivares de carrapatos em raças suscetíveis e resistentes de bovinos e que, em raças sensíveis, os níveis de anticorpos IgG1 específicos de saliva são modulados pelo nível de exposição a carrapatos.

O estudo da pele infestada por esses artrópodes pode revelar se existem mecanismos especializados de defesa para controlar esses ectoparasitos (FRANZIN et al., 2017). A existência de divergências genéticas entre bovinos indicam diferenças nos mecanismos imunológicos desenvolvidos pelos hospedeiros em resposta ao parasita, ressaltando, assim, a relevância de trabalhos desta natureza.

## **Bm86**

Um método complementar ao uso de acaricidas para o controle de *R. microplus* em bovinos é a utilização de vacinas baseadas no antígeno Bm86, como a vacina cubana Gavac TM (Heber Biotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba) (DE LA FUENTE et al., 1998) e a TickGARD, que já não está comercialmente disponível (Intervet Australia Pty. Ltd., 91-105 Harpin Street Bendigo, East Vic.) (WILLADSEN, 1997).

Bm86 é uma glicoproteína de 89 quilodáltons (kDa), ligada à membrana localizada na superfície das células do intestino em *R. microplus* (WILLADSEN et al., 1989). É expresso, além de células intestinais de fêmeas adultas, em larvas, ninfas, machos adultos e ovários de fêmeas adultas de *R. microplus* parcialmente ingurgitadas (BASTOS et al., 2010). Por possuir

vários domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico pode estar envolvida na coagulação sanguínea e no crescimento celular (RAND et al., 1989).

O antígeno Bm86 é uma proteína imunogênica do carrapato que não entra em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, sendo denominada de antígeno oculto por Willadsen & Kemp (1988). O gado imunizado com Bm86 produz anticorpos que reconhecem a Bm86 presente na superfície das células de digestão intestinal (WILLADSEN et al., 1989). Depois que os carrapatos ingerem sangue, esses anticorpos, juntos com outros componentes do sistema imunológico, causam lise das células epiteliais do intestino, ocasionando em morte ou conseqüente redução no número de fêmeas ingurgitadas, redução da produção e viabilidade de ovos (RAND et al., 1989; KEMP et al., 1989).

Jonsson et al. (2000) relataram que a vacinação com Bm86 da vacina comercial australiana (TickGARD) em um rebanho leiteiro contra o carrapato bovino resultou em uma redução de 56% no número de carrapatos no campo em uma única geração, redução de 72% no desempenho reprodutivo do carrapato e um aumento no ganho de peso vivo dos bovinos.

No Brasil, o percentual de eficácia de TickGARD e GavacTM em teste de estábulo com isolado regional de Campo Grande – MS (Brasil) de *R. microplus* foi de 46,4% e 49,2%, respectivamente (ANDREOTTI, 2006).

As respostas imunes protetoras contra *R. microplus* geradas por meio da Bm86 variam de acordo com variabilidade genética das populações de carrapatos e bovinos (RODRIGUEZ et al., 1995; ANDREOTTI et al., 2008). Dessa forma, diversos homólogos e ortólogos estão sendo relatados na literatura e seu uso sugerido como possíveis candidatos a novas vacinas. Canales et al. (2009) mostraram que a proteína Ba86 (um ortólogo de Bm86 de *R. microplus*) é eficaz no controle da infestação com *R. annulatus* e *R. microplus*. Liao et al., (2007) relataram um homólogo de Bm86 em *Haemaphysalis longicornis*, designado como o gene HI86, onde seu silenciamento por RNAi reduziu o peso de fêmeas ingurgitadas. Além disso, outras proteínas são descritas como Hao3, homólogo Bm86 do isolado iraniano de *Hyalomma anatolicum* (EBRAHIMI et al., 2013), Bd86, homólogo de Bm86 de *R. decoloratus* (ODONGO et al., 2007) entre outros.

Neste contexto, é de fundamental importância, elucidar o papel desempenhado por Bm86 em *R. microplus*, conhecer bem sua sequência de aminoácidos, bem como os homólogos e ortólogos de Bm86 em diferentes espécies de carrapatos, para identificar métodos adicionais para reduzir a infestação por esses ectoparasitas.



## RNA-seq e Expressão gênica diferencial

O DNA (ácido desoxiribonucleico) é detentor de toda a informação genética da qual dependem todas as características estruturais e funcionais de cada organismo vivo. O DNA está organizado em genes, as unidades fundamentais da informação genética (AZEVEDO, 1999). De acordo com o dogma central da biologia molecular, moléculas de RNA são sintetizadas a partir de moldes de DNA (transcrição), e as proteínas são sintetizadas a partir de moldes de RNA (tradução).

Os genes atuam determinando a estrutura das proteínas, as quais são responsáveis por direcionar o metabolismo celular em razão da sua atividade como enzimas. Dessa forma, o primeiro passo na expressão de um gene, ou seja, a transcrição do DNA em mRNA (RNA mensageiro), corresponde ao nível primário do processo de expressão gênica (COOPER, 2001).

O estado de uma célula é governado pela seleção de genes submetidos à transcrição e tradução, influenciados pela função celular e fatores ambientais. Este conceito é a base para o perfil de expressão gênica, o que nos permite estudar o transcriptoma (O'BRIEN et al., 2012), que é conjunto completo de transcritos (RNAs) em um tecido, e sua quantidade, para um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica.

A população de transcritos específica a identidade da célula e participa na modulação de suas atividades em diferentes situações biológicas. Os diversos padrões de expressão gênica permitem que seus vários tipos celulares possuam conjuntos diferentes de proteínas, tornando cada célula exclusivamente especializada em fazer seu trabalho.

Em uma análise de expressão gênica bem sucedida, a integridade do RNA total é uma das características mais importantes, devendo-se considerar a escolha e o tratamento do tecido utilizado e subsequente qualidade do RNA e das bibliotecas de cDNA (DNA complementar), refletindo com fidelidade o estado das condições experimentais e não de manipulações técnicas para corrigir eventuais problemas (COPOIS et al., 2006; O'BRIEN et al., 2012).

Em geral, a quantidade de RNA total é determinada medindo a absorvância a 260 nm (uma OD<sub>260</sub> nm de 0,1 corresponde a 4 µg / mL de RNA) com a desvantagem de incorporar interferência no ensaio por possíveis contaminantes (proteínas, nucleotídeos livres, etc.). A razão DO<sub>260</sub> nm / DO<sub>280</sub> nm, que deve se aproximar de 2 em tampão Tris/HCl pH 7,5, indica a pureza da amostra (BASTARD et al., 2002). A avaliação da qualidade do RNA total geralmente é determinada por quantificação de RNA ribossomal 28S e/ou 18S em géis de agarose utilizando corantes intercalantes para visualização (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Outro método para avaliar o RNA é o software RIN (projetado especificamente para o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*® (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) que classifica uma amostra de RNA total com base em características críticas pré-definidas extraídas do rastreamento eletroforético (SCHROEDER et al., 2006).

O sequenciamento de RNA de nova geração (*Next-generation sequencing* - NGS) vem revolucionando a exploração da expressão gênica em seres vivos, fornecendo novos *insights* sobre a mudança dos níveis de expressão que ocorrem em condições contrastantes. Ele pode ser usado para elucidar a função e as interações genéticas e protéicas e identificar uma lista de transcritos de RNA específicos (mRNAs, RNAs não codificantes e RNAs pequenos) (PICKRELL et al., 2010; VAN DIJK et al., 2014).

Para o sequenciamento de RNA em larga escala podem ser utilizadas diferentes plataformas que estão disponíveis comercialmente. Essas plataformas incluem uma série de métodos agrupados e uma combinação específica de protocolos que diferencia uma tecnologia da outra e determina o tipo de dado que é produzido. Embora as estimativas de precisão e qualidade sejam fornecidas por cada fabricante, não há consenso de que uma "base de qualidade" de uma plataforma seja equivalente à de outra plataforma (METZKER, 2010).

Resultados obtidos a partir de padrões de expressão gênica analisados após a infestação artificial de animais resistentes e suscetíveis são importantes para identificação de genes candidatos e de vias metabólicas envolvidos com a característica de resistência bovina ao carrapato.

Wang et al. (2007) analisaram uma população de animais Hereford x Shorthorn resistentes e suscetíveis ao carrapato utilizando um microarranjo derivado de cDNAs obtidos de pele. A infestação com as larvas de carrapato resultou em um padrão de expressão gênica que foi comum aos dois grupos. Especificamente, 72 genes apresentaram maior nível de expressão e 76 genes tiveram nível menor de expressão na pele dos dois grupos de animais após a infestação. Dezoito genes foram mais expressos nos bovinos considerados altamente resistentes enquanto 48 genes apresentaram maiores níveis de expressão nos animais de baixa resistência. Entre eles, os genes do colágeno tipo I, III e IV apresentaram expressão mais alta nos animais resistentes quando comparados aos animais suscetíveis. Esses resultados sugerem que parte da variação genética para esta característica pode ser explicada por genes relacionados ao tecido epitelial.

Piper et al. (2010) avaliando a expressão gênica em bovinos sem e com infestação (pele retirada de locais de fixação de larvas) demonstraram que citocinas, quimiocinas e

fatores do complemento foram diferencialmente expressos entre a pele de bovinos que nunca tiveram contato com o carrapato e a pele infestada em bovinos Holstein-Friesian suscetíveis.

Franzin et al. (2017) analisaram os aspectos moleculares e histológicos da pele do hospedeiro em paralelo com aspectos transcricionais e comportamentais do carrapato. Esses autores acompanharam infestações artificiais em hospedeiros de duas raças bovinas reconhecidamente resistentes (Nelore) e suscetíveis (Holandês) ao *R. microplus* e que não tiveram exposição prévia a carrapatos. Foram encontrados 1.1.31 GDEs nas peles amostradas, onde mais genes foram diferencialmente expressos entre as duas categorias (larvas e ninfas) de pele infestada de carrapatos em hospedeiros sensíveis ao carrapato do que nos hospedeiros resistentes aos carrapatos. Os dados de transcrição desse estudo apontam que os genes que codificam enzimas que produzem compostos voláteis (odoríferos) exibem expressão significativamente menor em hospedeiros resistentes, o que pode torná-los menos atraentes para as larvas, foi observado também que esses hospedeiros resistentes desenvolvem a uma resposta inflamatória mais precoce.

Apesar do conhecimento de que o MHC contribui efetivamente para a variação genética da resistência ao carrapato em bovinos, no entanto, ainda não foi identificado um genótipo único e consistente de qualquer gene deste complexo que esteja fortemente associado com alta ou baixa resistência a carrapatos entre diferentes raças e sistemas de produção (TABOR et al., 2017).

Diante do exposto, este trabalho visa buscar informações sobre os mecanismos envolvidos na resistência bovina ao *Rhipicephalus microplus*, por meio da identificação de genes diferencialmente expressos e de vias metabólicas em bovinos, além de identificar determinantes antigênicos das sequências de proteínas homólogas a Bm86 buscando uma sequência que poderá ser usada como vacina universal contra as múltiplas populações geograficamente distintas de *R. microplus* e espécies de carrapatos relacionados, sendo de extrema importância para a geração de conhecimentos, dada à escassez na identificação de um antígeno verdadeiramente eficaz contra os desafios de carrapatos.

Ambos os estudos visam contribuir com o desenvolvimento de métodos de controle complementares ao controle químico, baseados em seleção de animais resistentes para cruzamentos, genômica e imunização.

## REFERÊNCIAS

- AGRICULTURE HANDBOOK – **Animal and plant health inspection**. United States Department of agriculture, 1976. 133p.
- ALENCAR, M. M.; FRAGA, A. B.; SILVA, A. M. Adaptação de genótipos a ambientes tropicais: resistência à mosca-doschifres (*Haematobia irritans*, Linnaeus) e ao carrapato (*Boophilus microplus*, Canestrini) em diferentes genótipos bovinos. **Agrociência**, v. 9, p. 579–585, 2005.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 97–100, 2006.
- ANDREOTTI, R.; PEDROSO, M. S.; CAETANO, A. R.; MARTINS, N.F. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 93–98, 2008.
- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; PEREZ DE LEON, A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* acaricide resistance in the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 127-133, 2011.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; REIS, F. A.; RODRIGUES, V. S.; BARROS, J. C. Proposta de controle de carrapatos para o Brasil Central em sistemas de produção de bovinos associados ao manejo nutricional no campo. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2016. 34 p. (Documentos EMBRAPA Gado de Corte, 214). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/158191/1/Proposta-de-controle-de-carrapatos.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANGUS. **Manual do Criador**. <http://angus.org.br/category/downloads-raca/>. <Acesso em 27 de mar. de 2018>.
- ARAÚJO, C. V.; LÔBO, R. B.; FIGUEIREDO, L. G. G.; MOUSQUER, C. J.; LAUREANO, M. M. M.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C; ARAÚJO, S. I. Estimates of genetic parameters of growth traits of Nellore cattle in the Midwest region of Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 4, p. 846-853, 2014.
- ARTECHE, C. C. P. Resistência do *B. microplus* aos carrapaticidas-mecanismos de resistência. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 3., 1982, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú, 1982. p.101-109.
- AZEVEDO, C. **Biologia celular e molecular**. 1999, Lisboa: Lidel-edições técnicas lda. 131-157.
- BASTARD, J. P.; CHAMBERT, S.; CEPPA, F.; COUDE, M.; GRAPEZ, E.; et al. RNA isolation and purification methods. **Annales De Biologie Clinique**, v. 60, n. 5, p. 513-23,

2002.

BASTOS, R. G.; MASSARO, W. U.; DONALD, P. K.; SCOLES, G. A. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. **Parasites & Vectors**, v. 3, p.111, 2010.

BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Design of peptide and polypeptide vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 442-448, 1997.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; DA SILVA, S. S.; DOS SANTOS, T. R. B.; et al. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, p. 208:231–237, 2015.

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, p. 1-11, 2012.

BITTENCOURT, A. J.; FONSECA, A. H.; FACCINI, J. L. H.; BUENO, B. H. Comportamento do *B. microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. **Arquivo Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 173-182, 1990.

BRADLEY, D. G.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; MACHUGH, D. E. Genetics and domestic cattle origins. **Evolutionary Anthropology Issues News and Reviews**, v. 6, p. 79 - 86., 1998.

CANALES, M.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. **BMC Biotechnology**, v. 9, p. 29, 2009.

CARDOSO, V.; FRIES, L. A.; ROSO, V. M.; BRITO, F. V. Estimates of heritability for resistance to *Boophilus microplus* tick evaluated by an alternative method in a commercial Polled Hereford x Nelore population in Brazil. In: 8TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2006, Belo Horizonte, Brasil, **Proceedings...**, 2006.

CARVALHO, W. A.; FRANZIN, A. M.; ABATEPAULO, A. R.; DE OLIVEIRA, C. J.; MORE, D. D.; DA SILVA, J. S.; et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 260–273, 2010.

CHAN, E. K. F.; NAGARAJ, S. H.; REVERTER, A. The evolution of tropical adaptation: comparing taurine and zebu cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 5, p. 467–477, 2010.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEW-TABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 865–875, 2010.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular** / Geoffrey M. Cooper: trad. Itabajara da Silva Vaz Junior et al. – 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

COPOIS, V.; BIBEAU, F.; BASCOUL-MOLLEVI, C.; SALVETAT, N.; CHALBOS, P.; BAREIL, C., et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiles: Assessment of different methods to reliably determine RNA quality. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 549-559, 2006.

DA SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 1150–1155, 2007.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2–3, p. 77–97, 1997.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, p. 366-373, 1998.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K.M.; et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, p. 23-28, 2007.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6938–6946, 2008.

EBRAHIMI, S. M.; PAYKARI, H.; MEMARNEJADIAN, A. Molecular characterization of HAO3, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from the Iranian isolate of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 726–734, 2013.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F., et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, p. 219–235, 2006.

EUCLIDES FILHO, K. A situação do melhoramento genético com relação à maciez da carne bovina, e sua importância para a pecuária de corte brasileira. In: **WORKSHOP SOBRE QUALIDADE DA CARNE E MELHORAMENTO GENÉTICO DE BOVINOS DE CORTE**, 1., 1998, São Carlos. Estado da arte, necessidade de pesquisa e direcionamento de programas de melhoramento genético. Anais. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE/São Paulo: FUNDEPEC/Campo Grande: EMBRAPA CNPGC, 1998. p.105-113.

EUCLIDES FILHO, K. **Melhoramento genético animal no Brasil: fundamentos, história e importância**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1999. 63p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 75).

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas

da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 (suplemento 1), p. 1578-1586, 2003.

FOSTER, L. A.; FOURIE, P. J.; NESER, F. W. C.; FAIR, M. D. (2013). Differences in physical traits such as coat score and hide-thickness together with tick burdens and body condition score in four breeds in the Southern Free State. Disponível em: <<http://blackhills.co.za/Ticks.pdf>>. Acessado em: 20 abr. de 2018.

FRANZIN, A. M.; MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; RIBEIRO, J. M. C.; BISHOP, R.; et al. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 51, p. 1-24, 2017.

FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J. Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. 2. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. **Animal Science**, v. 67, p. 39-48, 1998.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 57-71, 1999.

FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J.; KELLY, M. J. Using genetics to control cattle parasites - the Rockhampton experience. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 253-264, 2000.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG, n. 8, p. 49-61, 1993.

FURLONG J. Carrapato : problemas e soluções. 1º ed. Furlong J, organizador. Juiz de Fora: Embrapa; 2005. 65 p.

GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C.; et al. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & Vectors, on line**, v. 7, p. 515 (inicial), 2014.

GARCIA, G. R.; MARUYAMA, S. R., NELSON, K.T.; RIBEIRO, J. M.; GARDINASSI, L. G.; et al. Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host. **Parasites & Vectors**, v. 10 (1):144, 2017.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L. L.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, p. 453-459, 2007.

GOMES, A.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibage and Nellore × European crossbreds in the Brazilian savanna. **Tropical Animal Health Production**, v. 21, n. 1, p. 20-24, 1989.

GOMES, A. Carrapato-de-boi: prejuízos e controle. Divulgação CNPGC EMBRAPA, Campo Grande, MS, dez. 2000, n. 42.

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

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2a ed. Porto Alegre: Edição do Autor 1995.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, G. R.; APANASKEVICH, A. D.; PETNEY, N. T.; ESTRADAPEÑA, A.; et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, n. 2528, p. 1-28, 2010.

HENSHALL, J. M. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, p. 1109–1116, 2004.

HIENDLEDER, S.; LEWALSKI, H.; JANKE, A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, p. 150-156, 2008.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.

IBELLI, A. M.; RIBEIRO, A. R.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S., et al. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 425-430, 2012.

IBGE. (2016). Indicadores. Pesquisa da pecuária. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/> Acesso em 15 mar. de 2018.

JOHNSTON, L. A. Y.; KEMP, D. H.; PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**, v. 16, p. 27-34, 1986.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, 129, S3-S14, 2004.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P.E.; ALBRECHT, M.S.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. Evaluation of tick-GARD(PLUS), a novel vaccine against



*Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 275–285, 2000.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1–10, 2006.

KASHINO, S. S.; RESENDE, J.; SACCO, A. M.; ROCHA, C.; PROENCA, L.; CARVALHO, W. A., et al. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 12-21, 2005.

KAZIMIROVÁ, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defenses and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 43, p. 1-19, 2013.

KEMP, D. H.; PEARSON, R. D.; GOUGH, J. M.; WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental and Applied Acarology**, v.7, p. 43–58, 1989.

KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; et al. **Carrapatos em ovelhas deslanadas e suas implicações**. -- Dados eletrônicos -- Brasília, DF: Embrapa, 2015. 6p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 130).

LIAO, M.; ZHOU, J.; HATTA, T.; UMEMIYA, R.; MIYOSHI, T.; TSUJI, N.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 homologue from *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 148-157, 2007.

MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G. C. D.; et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, p. 280, 2010.

MAGNABOSCO, C de U; CORDEIRO, C. M. T; TROVO, J. B de F; MARIANTE, A. da S; LOBÔ, R. B; JOSAHKIAN, L. A. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília. Embrapa CENARGEN, 1997. 52p. (Documento, 23).

MATTIOLI, R. C.; BAH, M.; FAYE, J.; KORA, S.; CASSAMA, M. A comparison of field tick infestation on N'dama, Zebu and N'dama x Zebu crossed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 47, p. 139–148, 1993.

MERLINI, L. S.; YAMAMURA, M. H. Estudo in vitro da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 19, p. 38-44, 1998.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 31-46, 2010.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 169-172, 2003.

O'BRIEN, M. A.; COSTIN, B. N.; MILES, M. F. Using Genome-Wide Expression Profiling to Define Gene Networks Relevant to the Study of Complex Traits: From RNA Integrity to Network Topology. **International Review of Neurobiology**, v. 104, p. 91–133, 2012.

ODONGO, D.; KAMAU, L.; SKILTON, R.; MWAURA, S.; NITSCH, C.; MUSOKE, A.; TARACHA, E.; DAUBENBERGER, C.; BISHOP, R. Vaccination of cattle with TickGARD induce cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. **Vaccine**, v. 25, p. 1287–1296, 2007.

O'NEILL, C. J.; SWAIN, D. L.; KADARMIDEEN, H. N. Evolutionary process of *Bos taurus* cattle in favourable versus unfavourable environments and its implications for genetic selection. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 422–433, 2010.

PICKRELL, J. K.; MARIONI, J. C.; PAI, A. A.; DEGNER, J. F.; ENGELHARDT, B. E. et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 768-772, 2010.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E. JONSSON N: Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 431-441, 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, p. 165–172, 2011.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control. Queensland. Agricultural Journal, v.108, p.279-300, 1982.

RAND, K.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 9657-9661, 1989.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; et al. First report of fluzuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 128-136, 2014.

RIBEIRO, J. M. How ticks make a living. **Parasitology Today**, v. 11, n. 3, p. 91-93, 1995.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. I. Tick anaemia. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 209–214, 1957.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 3, p. 532-550, 1962.

ROCHA, U. F. **Panorama da parasitologia na África e na Austrália**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1976.

- ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Boletim Técnico da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal**, n. 3, p. 1-32, 1984.
- RODRÍGUEZ, M.; PENICHER, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LUACES, L. L.; RUBIERA, R. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p.339–49, 1995.
- RODRÍGUEZ VALLE, M.; MÉNDEZ, L.; VALDEZ, M.; REDONDO, M.; ESPINOSA, C. M.; et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. **Experimental and Applied Acarology**, v. 34, p. 375-382, 2004.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd ed. Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord, NY. 2001.
- SANTIAGO, A. A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 744p.
- 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, p. 305-311, 2000.
- SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M., et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 3, 2006.
- SINGH, N. K.; GELOT, I. S.; JYOTI, SINGH, V.; RATH, S. S. Detection of amitraz resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from North Gujarat, India. **Journal of parasitic diseases**, v. 39, p. 49-52, 2015.
- SOLLERO, B. P.; JUNQUEIRA, V. S.; GOMES, C. C. G.; CAETANO, A. R.; CARDOSO, F. F. Tag SNP selection for prediction of tick resistance in Brazilian Braford and Hereford cattle breeds using Bayesian methods. **Genetics, Selection, Evolution : GSE**, v. 49, n. 49. doi:10.1186/s12711-017-0325-2, 2017.
- SUTHERST, R. W.; KERR, J. D.; MAYWALD, G. F.; STEGEMAN, D. A. The effect of season and nutritions on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 329–39, 1983.
- TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; GARCIA, G. R.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle tick *Rhipicephalus microplus* - host interface: A review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 506, p. 1-18, 2017.

- UTECH, K. B. W.; SEIFERT, G. W.; WHARTON, R. H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. 1. Factors affecting resistance. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p. 411–422, 1978a.
- UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p. 885–95, 1978b.
- VAN DIJK, E. L.; AUGER, H.; YAN JASZCZYSZYN, Y.; THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418–426, 2014.
- VOZZI, P. A.; MARCONDES, C. R.; MAGNABOSCO, C. U.; BEZERRA, L. A. F.; LÔBO, R. B. Structure and genetic variability in Nellore (*Bos indicus*) cattle by pedigree analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 482–485, 2006.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associate resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 63–70, 1998.
- WANG, Y. H.; REVERTER, A.; KEMP, D.; MCWILLIAM, S. M.; INGHAM, A.; DAVIS, C. K.; MOORE, R.J.; LEHNERT, S. A. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 47, p. 1397–1407, 2007.
- WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2131–2144, 2003.
- WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 171–182, 1970.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigen for tick control. **Parasitology Today**, Oxford, v. 4, p. 196–198, 1988.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.; MCKENNA, R.; KEMP, D.; TELLAM, R.; NIELSEN, J.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, v. 143, p. 1346–1351, 1989.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 209–222, 1997.
- ZHAO, G.; YU, M.; CUI, Q. W.; ZHOU, X.; ZHANG, J. C.; LI, H. X.; QU, K. X.; WANG, G. L.; HUANG, B. Z. Association of bovine Toll-like receptor 4 with tick infestation rates and blood histamine concentration. **Genetics and molecular research**, v. 12, n. 3, p. 2783–2793, 2013.

Artigo 1: Revista *BMC Genomics* (Qualis A2 na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

**Análise comparativa de transcriptomas de pele de bovinos de diferentes grupos genéticos infestados artificialmente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus***

Isabella Maiumi Zaidan Blecha<sup>1</sup>; Fabiane Siqueira<sup>2</sup>; Marcos Valério Garcia<sup>3</sup>; Vinícius da Silva Rodrigues<sup>4</sup>; Francisco Tobías Barradas Pinã<sup>5</sup>; Leandro Higa<sup>6</sup>; Bárbara Csordas<sup>6</sup>; Renato Andreotti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP, Mexico

<sup>6</sup>Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Endereço para correspondência:

Embrapa Gado de Corte (Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato)

Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil

Fone: +55 (67) 3368-2169

email: renato.andreotti@embrapa.br

Resumo:

**Contexto:** A suscetibilidade bovina ao carrapato é uma característica extremamente importante para a produção animal, devido ao prejuízo gerado em decorrência de altas infestações e dos custos com tratamentos. No entanto, os reais motivos que afetam essa característica permanecem mal compreendidos. Com o advento da genética molecular e das plataformas de sequenciamento de nova geração tornou-se possível identificar genes e suas respectivas rotas de regulação com o intuito de elucidar a questão das diferenças de resistência observadas entre e dentro de raças bovinas. Neste contexto, este estudo objetivou identificar genes diferencialmente expressos (GDEs) por meio do sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq) em três grupos genéticos de bovinos de corte (Angus, Nelore e Cruzados ½ Angus X ½ Nelore) antes e após infestação artificial com larvas do carrapato *R. microplus* a fim de obter informações sobre os mecanismos de defesa frente a ectoparasitas hematófagos em hospedeiros com diferentes níveis de suscetibilidade.

**Resultados:** Foram sequenciados 13.902 genes. A análise da expressão diferencial identificou 86 GDEs (9 *up-regulated* e 77 *down-regulated*) para a raça Angus, 814 GDEs (588 *up-regulated* e 226 *down-regulated*) para os animais Cruzados e 1.676 GDEs (607 *up-regulated* e 1.069 *down-regulated*) para Nelore. Analisando todos os genes (*up-* e *down-regulated*) foram identificadas 221 vias metabólicas que desempenham papéis fundamentais na resposta imune, como sistema complemento e cascata de coagulação, apresentação e processamento de antígenos, agregação plaquetária, entre outros, diferentemente nos três grupos genéticos. Analisando apenas os genes *up-regulated*, ou seja, genes que tiveram maior expressão após a infestação, foram evidenciadas as famílias das quitinases, claudinas, catepsinas, quimiocinas e interleucinas para Nelore. Para o grupo genético Cruzados foram evidenciados diversos ligantes e receptores para fator de necrose tumoral (TNF), genes do antígeno leucocitário bovino (*BOLA-DRB3*, *BOLA-DMA*, *BOLA-DOB*, *BOLA-DQA2*, *BOLA-DQA5*, *BOLA-DRA*). Apenas um gene (*IL17A*) relacionado com resposta inflamatória/estímulo ao ferimento estava *up-regulated* nas amostras do grupo Angus.

**Conclusão:** A compreensão dos mecanismos de genes relacionados com resistência bovina ao carrapato poderá ajudar a desenvolver vacinas mais eficazes, além da possibilidade da inclusão dessas informações em programas de melhoramento genético animal, visando à seleção de animais resistentes.

Palavras-chave: Angus, expressão gênica, Nelore, resistência genética, sequenciamento de RNA

## INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita hematófago presente em áreas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Austrália [1] e é responsável pelos maiores prejuízos à produção animal no mundo. Só no Brasil, esses danos potenciais foram estimados em \$ 3,24 bilhões de dólares ao ano [2].

O mecanismo de resistência dos bovinos ao carrapato *R. microplus* é um fenômeno complexo, onde diferentes níveis de suscetibilidade são observados entre animais de origem taurina (*Bos taurus taurus*) e zebuína (*Bos taurus indicus*) e também entre animais dentro de uma mesma raça [3].

Apesar de relacionados a diversos fatores, como estação do ano, características físicas e condição nutricional dos bovinos, as causas dos diferentes níveis de resistência observados ainda não foram completamente elucidadas. Neste contexto, diversos estudos foram realizados a fim de se explicar essa diversidade, entre eles estão estudos de expressão gênica que objetivaram identificar genes associados com esta característica [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

*Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*, também conhecido como RNA-Seq, é uma técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) que utiliza bibliotecas de DNA complementar (cDNA) oriundas do RNA de interesse. Com essa técnica, é possível capturar a maior parte de transcritos que estiverem sendo expressos em condições contrastantes conhecidas [11].

Dessa forma, objetivou-se prospectar genes diferencialmente expressos (GDEs) e vias metabólicas relacionados à resistência ou suscetibilidade bovina ao carrapato por meio da análise dos perfis de expressão gênica de bovinos Angus, Nelore e Cruzados ( $\frac{1}{2}$  Angus X  $\frac{1}{2}$  Nelore), sem e com infestação artificial com larvas de *R. microplus*, a fim de contribuir com o esclarecimento dos diferentes níveis de resistência encontrados entre bovinos taurinos e

zebúinos e seus respectivos mecanismos de resposta imune.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local**

O experimento foi conduzido em Campo Grande/Mato Grosso do Sul, Brasil, na Embrapa Gado de Corte, na área da Sanidade Animal, nas coordenadas geográficas 20° 27' S e 54° 37' W. O clima dessa região é classificado como tropical chuvoso de savana, caracterizado pela distribuição anual irregular das chuvas, com ocorrência bem definida de um período seco, durante os meses mais frios, e um período chuvoso, durante os meses de verão.

### **Animais**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Corte, de acordo com o protocolo 15/2014 e conforme exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizadas fêmeas desmamadas com aproximadamente nove meses de idade de fenótipos estabelecidos resistentes ao carrapato *R. microplus* (*Bos taurus indicus*, Nelore; n=4), suscetíveis (*Bos taurus taurus*, Angus; n=4) e Cruzados (½ Angus X, origem paterna, ½ Nelore, origem materna; n=4). Os animais da raça Nelore foram selecionados a partir do rebanho geral da Embrapa Gado de Corte e os animais Angus e Cruzados foram cedidos de rebanhos de criadores parceiros de propriedades diferentes.



Esses animais já haviam tido contato prévio com carrapatos e foram desinfestados com uso de acaricida *pour on* e permaneceram no pasto de *Brachiaria decumbens* livre de carrapatos, por quatro meses. Após esse período, foram conduzidos até as baias do departamento de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte. Essas baias eram individuais, de aproximadamente 6m<sup>2</sup>, cobertas, de alvenaria e com fundo falso, ou seja, assoalhos de madeira com espaçamentos que permitem a passagem dos dejetos e restos de alimento fornecido, sendo lavados diariamente. Todos os animais receberam alimentação de silagem de sorgo puro (17 Kg/dia/animal), concentrado (1 Kg/dia/animal) e água a vontade durante o período de experimento.

#### **Colônia de *R. microplus* e infestação artificial**

Os carrapatos utilizados no experimento para infestação artificial foram provenientes de uma colônia de *R. microplus*, mantida no Laboratório de Biologia do Carrapato da Embrapa Gado de Corte. Teleóginas de um bovino (Caracu X Nelore) estabelecido foram coletadas, acondicionadas em placas de petri e levadas a câmara de demanda biológica de oxigênio (BOD) com temperatura de +/- 28°C e +/- 80% de umidade. Decorrida a postura dos ovos, estes foram recolhidos e separados em alíquotas de 25 miligramas (mg), contendo o equivalente a 5.000 larvas [12].

As amostras de ovos foram colocadas em seringas de 10 mililitros (mL) com os bicos removidos permitindo o seu fechamento com algodão e foram levadas novamente a BOD para incubação dos ovos e posterior eclosão larval. As seringas contendo as larvas não alimentadas foram utilizadas para a infestação artificial dos bovinos, na região do dorso dos animais que permaneceram amarrados nas portas das baias durante um período de duas horas para evitar autolimpeza. Foi utilizada uma seringa por animal e por infestação.

## **Coletas de Pele**

A escolha da pele como tecido alvo para o perfil de expressão gênica foi devido ao fato da pele ser o local imediato de interação do bovino com o ectoparasita, ao papel do sistema imune nas respostas do ectoparasita e a oportunidade de amostragem de biópsia deste local.

Durante todo o processo de coleta de amostras de pele tomou-se o máximo cuidado para garantir um método uniforme de coleta considerando a profundidade e tamanho do tecido coletado, evitando-se a contaminação das amostras de tecido com sangue ou outros contaminantes. Em todos os animais, foram realizadas duas coletas de biópsias de tegumento com auxílio de um *punch* de aço inoxidável de oito milímetros (mm) de diâmetro, garantindo que toda área de inflamação da pele no local onde o carrapato se fixou fosse amostrada e evitando coletar tecidos não inflamados e, conseqüentemente, com diferentes perfis de transcritos de RNA.

Todas as coletas foram realizadas nos dorsos dos animais experimentais e no local de fixação do carrapato, sendo que a primeira coleta (coleta 1), designada coleta controle, ocorreu antes da infestação artificial e, em seguida, os animais foram infestados com aproximadamente 5.000 larvas não alimentadas de 17 dias de vida. Após seis dias dessa infestação, os animais foram infestados novamente visando observar a resposta imune dos bovinos com a alta infestação provocada com diferentes estágios de vida do carrapato. A segunda coleta (coleta 2) de amostras de pele ocorreu 16 dias após a primeira infestação, portanto, dez dias após a segunda infestação.

## **Confirmação de fenótipos dos animais experimentais**

Após as duas coletas das biópsias de pele que foram feitas para extração de RNA total (coleta 1 e coleta 2), foi realizada em todos os animais experimentais uma nova infestação

artificial com aproximadamente 15.000 larvas de carrapatos a fim de estabelecer/reafirmar os fenótipos dos animais, como resistentes ou suscetíveis. Foi realizado um teste de estábulo com lavagem das baias para recolhimento e coleta das teleóginas, contagem diária e soma das teleóginas desprendidas durante um período de nove dias. As lavagens eram acompanhadas de um sistema padrão de coleta (balde/peneira), onde se acumulava os dejetos juntamente com os carrapatos que desprendiam dos animais, só então os carrapatos eram recolhidos de cada uma das baias.

### **Análise estatística**

Para análise estatística utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com valor de significância  $P < 0,05$ , que foi adequado para relatar as diferenças entre a contagem total de teleóginas para os três grupos genéticos no teste de estábulo.

### **Extração e quantificação de RNA total**

Imediatamente após a coleta, as amostras de pele foram divididas em duas partes iguais e armazenadas em duplicadas em nitrogênio líquido até o momento da extração de RNA. O processamento das amostras (meia biópsia) de pele foi feito com o auxílio do equipamento *Tissue Ruptor* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) para trituração do tecido e a purificação do RNA total utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo protocolo adaptado [13].

A pureza e a quantidade do RNA total foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo e determinada por espectrofotometria a 260 nanômetros (nm) em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA). A qualidade e a integridade do RNA total foram analisadas pelo método "*Lab on a Chip*" usando o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*® (Agilent Technologies, Palo Alto,

EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse equipamento permite o exame visual das bandas de RNA ribossômico (rRNA) 18S e 28S como uma medida dos números de integridade do RNA (RIN).

Devido o RNA ser uma molécula instável e muito sensível à degradação, o RIN é uma ferramenta importante na condução e validação de experimentos de expressão gênica [14]. O algoritmo do software RIN permite a classificação do RNA total, baseado em um sistema de numeração de 1 a 10, sendo 1 o perfil mais degradado e 10 o mais intacto, facilitando a interpretação de um eletroferograma, a comparação de amostras e assegurando a repetibilidade do experimento [15].

### **Preparação das bibliotecas de cDNA e sequenciamento**

A preparação das bibliotecas e o sequenciamento de nova geração através da técnica RNA-Seq foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Animal, localizado na ESALQ-USP (Piracicaba-SP).

Para a preparação das amostras de RNA mensageiro (mRNA) para sequenciamento foi utilizado o *TruSeq RNA Sample Preparation Kit*® (Illumina, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento do mRNA foi realizado com a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) por meio do equipamento HiSeq2500 (Illumina – San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e foi utilizado o protocolo de *pair-end reads* [16].

### **Avaliação e pré-processamento dos dados**

Os dados obtidos pelo HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados pelo programa *Real Time Analysis* (Illumina), que faz o *base call* das imagens do sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base

acompanhada de um escore de qualidade Phred [17]. Após a conversão para fastq, a avaliação inicial das leituras do sequenciamento foi feita com o programa FastQC versão 0.11.4 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

A filtragem das bases com qualidade baixa, das sequências de adaptadores e de vetores foi feita com o programa Seqclean versão 1.9.10 (<https://github.com/ibest/seqclean>). O banco de dados de vetores usado foi o UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/>). Leituras menores que 75 pb após a filtragem foram excluídas, visando à remoção de erros de sequenciamento.

### **Mapeamento no genoma de referência *Bos taurus taurus***

Após a filtragem, as leituras do sequenciamento de cada amostra foram alinhadas contra o genoma de referência de bovinos UMD3.1, obtida na página iGenomes da Illumina ([http://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_software/igenome.html](http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html)).

O mapeamento e a contagem das leituras foram feitos com o programa STAR versão 2.5.2a [18]. Leituras com mapeamento ambíguo foram descartadas na contagem utilizada para a estimativa de expressão diferencial.

### **Análise de expressão diferencial**

Após obtenção das contagens, a análise de expressão gênica diferencial foi realizada com o programa edgeR versão 3.12.0 [19], um pacote do R/Bioconductor [20]. De maneira resumida: 1) as contagens obtidas pelo STAR foram lidas no R; 2) as contagens de cada biblioteca foram normalizadas pela média moderada dos M-values (TMM - *Trimmed Mean of M-values*) entre cada par de amostras [21]; 3) os dados foram descritos por um modelo linear generalizado (*Generalized Linear Model* - GLM), ajustando uma binomial negativa [22]; 4) e, finalmente, um Teste de Razão de Verossimilhança foi usado para testar expressão diferencial

gene a gene entre os contrastes de interesse (coleta 1 X coleta 2), para cada grupo genético, com os *p-values* sendo corrigidos com o critério de taxa de falsa descoberta (FDR) para controlar a quantidade de falsos positivos [23]. O sinal do log<sub>2</sub> (fold change) foi usado para separar os GDEs em *grupos up-* e *down-regulated*, onde genes *up-regulated* são os genes que tinham maior expressão após a infestação e *down-regulated* são os genes que tinham menor expressão após a infestação e, portanto, maior expressão antes da infestação.

### **Diagrama de Venn**

Foram gerados dois Diagramas de Venn por meio da ferramenta online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) com os GDEs *up-regulated* e *down-regulated* entre os três grupos genéticos para o contraste coleta 1 x coleta 2.

### **Anotação funcional (vias metabólicas) para todos os genes**

Os resultados da análise gene a gene foram utilizados para realizar testes de enriquecimento usando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) pelo programa CAMERA (*Correlation Adjusted Mean Rank gene set test*) [24]. Uma vantagem da análise realizada pelo programa CAMERA é que ela pode ser realizada mesmo quando não são detectados genes diferencialmente expressos na análise gene a gene. O programa CAMERA aplica um teste de conjunto de genes competitivos (*competitive gene set test*) que contabiliza a correlação entre genes. Os métodos competitivos comparam as estatísticas dos genes da via metabólica (p-valor ou *fold-change*) com as estatísticas de genes fora da via, para determinar se a via está mais associada ao fenótipo em comparação com outras vias.

### **Anotação funcional para os genes *up-regulated***

Os genes diferencialmente expressos *up-regulated* para Angus, Cruzados e Nelore foram usados para detectar *clusters* funcionais dentro dos conjuntos de dados pelo Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) versão 6.7 [25, 26] usando todos os genes de *Bos taurus taurus* como uma lista de plano de fundo.

Dentro da mesma plataforma também foi utilizada a ferramenta de análise funcional e categorias GO (*Gene Ontology*) de processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF) e vias metabólicas (KEGG) utilizando os modelos *Bos taurus taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* para anotação (Material Suplementar 1).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Confirmação de fenótipos**

Com o teste de estábulo e lavagem das baias foi possível obter o número total de teleóginas desprendidas por dia, a soma ao final do teste de nove dias e a média por grupo genético. Os fenótipos dos animais com a soma total das teleóginas desprendidas estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Número de teleóginas desprendidas de cada animal experimental ao final do teste de estábulo

<b>ID</b>	<b>Grupo Genético</b>	<b>Número de teleóginas* coletadas</b>
1	Angus	373
2	Angus	223
3	Angus	421
4	Angus	488
	Total de teleóginas (Angus)	1505 <sup>a</sup>
	<b>Média de teleóginas (Angus)</b>	<b>376</b>
1	Cruzado	84

2	Cruzado	132
3	Cruzado	141
4	Cruzado	81
Total de teleóginas (Cruzado)		438 <sup>ab</sup>
<b>Média de teleóginas (Cruzado)</b>		<b>109</b>
1	Nelore	61
2	Nelore	21
3	Nelore	26
4	Nelore	64
Total de teleóginas (Nelore)		172 <sup>b</sup>
<b>Média de teleóginas (Nelore)</b>		<b>43</b>

ID = Identificação do animal; a e b indicam diferenças significativas entre os grupos de acordo com o teste de variância de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

Com essa avaliação de contagem foi possível confirmar os fenótipos dos animais do grupo experimental. O teste estatístico mostrou que os grupos genéticos Angus e Nelore são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ), mas o grupo de animais Cruzados não apresentou diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparados com os grupos Nelore e Angus. [27] descreveram que animais *B. taurus taurus* apresentam em média 10,5 vezes mais carrapatos que os *B. taurus indicus* ou seus cruzamentos. Esses resultados estão próximos dos encontrados em nosso estudo, onde animais Angus apresentaram 8,75 vezes mais carrapatos quando comparados aos animais da raça Nelore. [28] também relatou que animais zebuínos possuem um décimo do número de carrapatos quando comparados com animais taurinos sob a mesma infestação.

### **Número de integridade do RNA (RIN)**

Em nosso estudo, por meio do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) encontramos valor médio de RINs de 6,0. [29] avaliaram o efeito da integridade do RNA na estabilidade da expressão gênica de referência em pele humana normal e após a morte em amostras com RINs variando de 2 a 7,8 (média de  $4,4 \pm 1,8$ ). Os autores dividiram essas amostras em dois grupos: degradação extensa ( $RIN \leq 4$ ) e degradação moderada ( $RIN \geq 4$  e  $\leq 7,8$ ), e observaram que o grupo com maior integridade de



RNA (degradação moderada) apresentou maior estabilidade de expressão gênica de referência quando comparado ao grupo com amostras com degradação extensa. [30] encontraram um valor médio de RIN de qualidade de RNA de 8,1 (mínimo RIN 3,3 e máximo RIN 9,4) para amostras de pele de humanos e valor médio de RIN de 7,5 (mínimo RIN 6,5 e máximo RIN 8,0) para as biópsias de rato. Já para amostras de pele de bovinos, [10] encontraram valores de RIN de 7,1 a 9,1. Embora seja evidente que o RNA intacto constitui a melhor representação do estado natural do transcriptoma, existem situações em que a análise da expressão gênica mesmo em RNA parcialmente degradado é aceitável, como por exemplo, o desafio do isolamento do RNA das biópsias de pele, devido à natureza rígida do tecido da pele [31] e à alta presença de RNases [32].

### **Sequenciamento**

O RNA-Seq é uma tecnologia precisa para medir os níveis de expressão gênica e o número de *reads* mapeados para cada tipo de RNA é linearmente correlacionado com a sua abundância dentro do tecido estudado.

Neste trabalho, foram mapeados, em média, 10.930 *reads* para as amostras de Angus, 10.686 *reads* para as amostras de Cruzados e 11.044 *reads* para as amostras de Nelore. Desse total, 94,26% de *reads* foram mapeadas com o genoma de referência (UMD3.1) para Angus, 94,34% de *reads* foram mapeadas com o genoma de referência para Cruzados e 93,96% de *reads* foram mapeadas com o genoma de referência para Nelore e apenas 2,10%, 2,15% e 2,37% de *reads* não foram mapeadas com o genoma de referência para Angus, Cruzados e Nelore, respectivamente. Existe ainda uma pequena porcentagem relacionada à *reads* mapeadas em múltiplas posições do genoma de referência.

De acordo com a literatura o alinhamento preciso de dados obtidos de RNAseq é um problema devido a estrutura transcrita não contígua, aos comprimentos de leitura

relativamente curtos e também ao aumento do rendimento das tecnologias de sequenciamento [18].

### **Análise do transcriptoma e anotação funcional**

A análise da expressão diferencial entre o contraste sem infestação (coleta 1) e após duas infestações artificiais com larvas de *R. microplus* (coleta 2) está disposta na Tabela 2 para os três grupos genéticos. Nesta análise foram identificados 86 GDEs para Angus, 814 para Cruzados (½ Angus X ½ Nelore) e 1.676 para Nelore. O sinal do  $\log_2$  (*fold change*) foi usado para separar os GDEs em grupos *up-* e *down-regulated*.

Tabela 2. Quantidade de genes diferencialmente expressos (GDEs) (*up-* e *down-regulated*) para os três grupos genéticos considerando o contraste sem infestação (coleta 1) e após duas infestações artificiais (coleta 2) com larvas de *R. microplus*

ANIMAIS	GDEs	<i>UP-REGULATED</i>	<i>DOWN-REGULATED</i>
Angus	86	9	77
Cruzados (½ Angus x ½ Nelore)	814	588	226
Nelore	1.676	607	1.069

\*GDEs = genes diferencialmente expressos

Foram gerados gráficos SMEAR (ou MA) para cada grupo genético. Esses gráficos fornecem uma visão geral útil para a distribuição dos coeficientes estimados no modelo e as comparações de interesse, em todos os genes [33]. Neles está representada a alteração do *log-fold change* versus o log das contagens corrigidas (CPM - *Counts per million*) (isto é, o nível médio global de expressão para cada gene) para Angus (Figura 1), Cruzados (Figura 2) e Nelore (Figura 3).

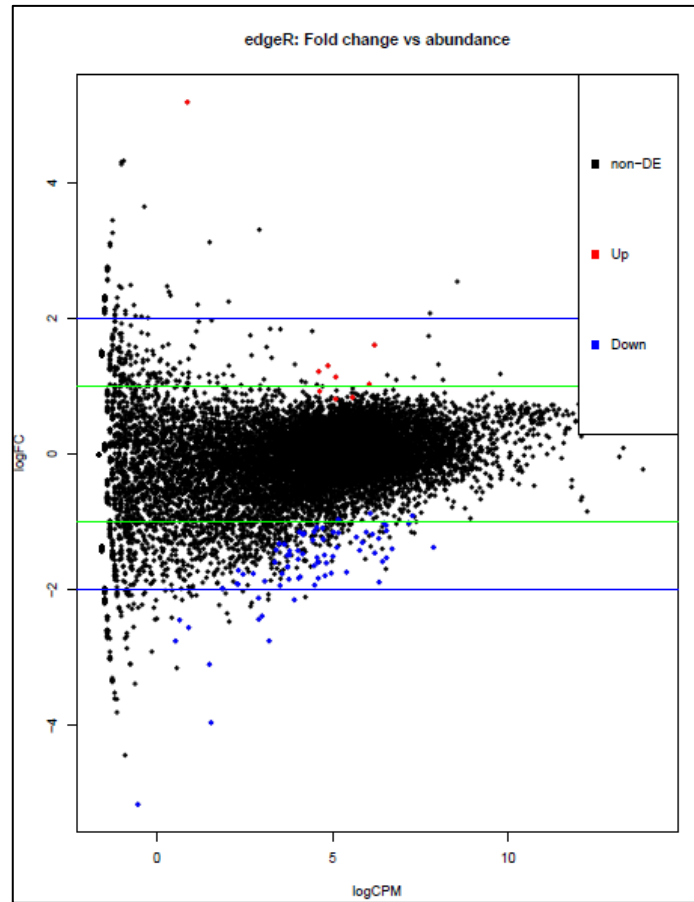


Figura 1. Gráfico SMEAR para amostras do grupo genético Angus.  $\text{Log}_2$  (*fold change*) para uma comparação particular é plotada no eixo y e a média das contagens normalizadas por fator de tamanho é mostrada no eixo x. Cada gene é representado com um ponto.

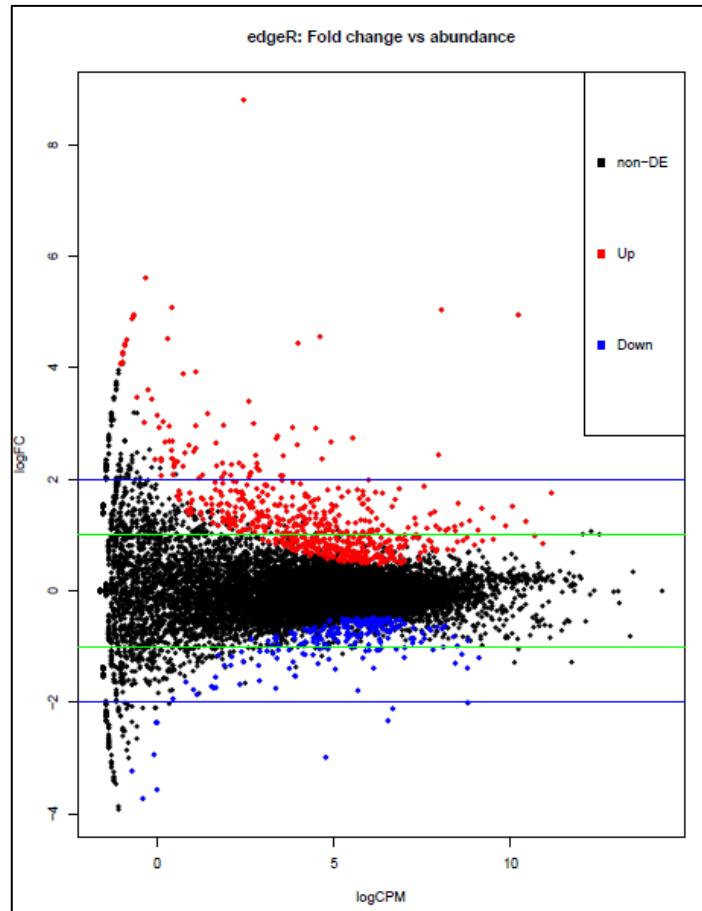


Figura 2. Gráfico SMEAR para amostras do grupo genético Cruzados.  $\text{Log}_2$  (*fold change*) para uma comparação particular é plotada no eixo y e a média das contagens normalizadas por fator de tamanho é mostrada no eixo x. Cada gene é representado com um ponto.

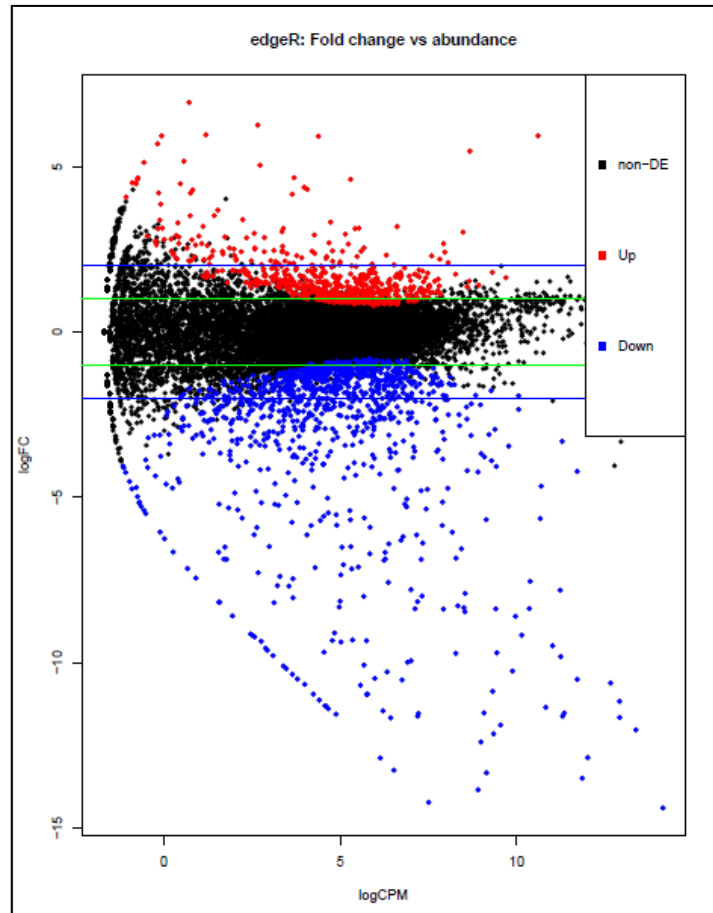


Figura 3. Gráfico SMEAR para amostras do grupo genético Nelore.  $\log_2$  (*fold change*) para uma comparação particular é plotada no eixo y e a média das contagens normalizadas por fator de tamanho é mostrada no eixo x. Cada gene é representado com um ponto.

Foi realizada a análise de ontologia dos genes, por meio do Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) versão 6.7 [25, 26] (Tabela 3), abordando o percentual de cada função para os genes *up-* e *down-regulated* para cada grupo genético, mediante três aspectos: função molecular (atividades de nível molecular realizadas por produtos genéticos), componente celular (as localizações relativas a estruturas celulares nas quais um produto gênico desempenha uma função) e processo biológico (os processos maiores, ou 'programas biológicos' realizados por múltiplas atividades moleculares).

Tabela 3. Percentual de cada termo de ontologia para os genes *up-* e *down-regulated* para os diferentes grupos genéticos

	Componente Celular	Processo Biológico	Função Molecular
Nelore ( <i>Up</i> )	79,6%	72,8%	67,2%
Nelore ( <i>Down</i> )	87,4%	82,3%	76,6%
Cruzados ( <i>Up</i> )	89,4%	80,0%	70,5%
Cruzados ( <i>Down</i> )	75,1%	81,8%	75,1%
Angus ( <i>Up</i> )	80,0%	60,0%	70,0%
Angus ( <i>Down</i> )	90,9%	87,0%	88,3%

Para calcular e desenhar um diagrama de Venn foi utilizada a ferramenta *online* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) com os GDEs *up-regulated* (Figura 4) e *down-regulated* (Figura 5) entre os três grupos genéticos para o contraste coleta 1 x coleta 2. Este diagrama é um sistema de organização de conjuntos numéricos, onde os elementos são agrupados em figuras geométricas para facilitar a visualização da divisão feita entre os diferentes grupos genéticos.

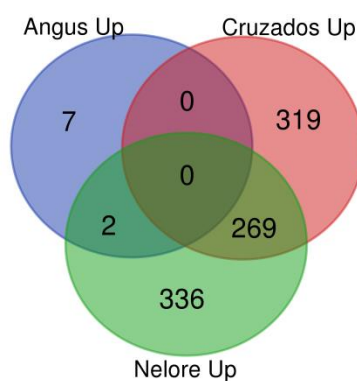


Figura 4. Diagrama de Venn mostrando sobreposições entre os genes diferencialmente expressos (GDEs) *up-regulated* encontrados para as coletas 1 e 2 nos três diferentes grupos genéticos.

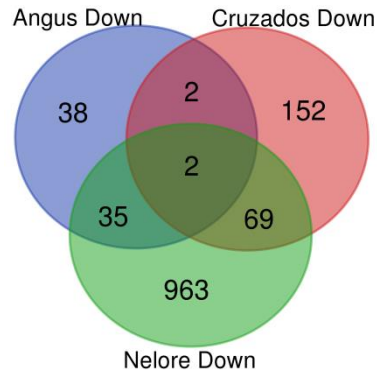


Figura 5. Diagrama de Venn mostrando sobreposições entre os genes diferencialmente expressos (GDEs) *down-regulated* encontrados para as coletas 1 e 2 nos três diferentes grupos genéticos.

As Figuras 4 e 5 mostram todas as correlações entre os conjuntos de dados. A visualização gráfica por meio do diagrama de Venn permitiu selecionar facilmente um subconjunto desejado de genes para inspeção adicional, ou seja, os genes diferencialmente expressos exclusivos de cada grupo genético.

Por meio dos números de GDEs da observação gráfica dos Diagramas de Venn é possível notar que animais Nelore ativam muitos mais genes diante de uma infestação quando comparados com animais Cruzados ou Angus. Até mesmo antes da infestação artificial realizada para o experimento, animais Nelore apresentaram 963 GDEs comparados com 152 de Cruzados e 38 de Angus, podendo indicar uma eficácia melhor e mais rápida para responder a estímulos externos. Cabe ressaltar ainda que esses animais já haviam sido infestados naturalmente em um período anterior ao início do experimento, portanto, esses números de genes representam tanto resposta inata como a resposta adquirida. Sabe-se que o nível de resistência dos animais se torna maior após várias infestações quando comparados com a primeira exposição ao carrapato [34, 35].

Do total de genes *up-regulated* exclusivos de cada grupo genético, 88 genes não apresentaram nenhum termo GO em Nelore, seguidos de 3 para Angus e 82 para animais Cruzados.

Avaliando expressão gênica diferencial por meio de microarranjos, em animais das raças Holstein-Friesian (*B. taurus taurus*) e Brahman (*B. taurus indicus*), sem infestação por carrapatos, [7] obtiveram uma pequena lista de genes detectados como diferencialmente expressos entre as raças antes da infestação, relativamente poucos termos GO (*gene ontology*) e nenhuma via KEGG foi identificada nesta lista. Uma categoria de genes foi evidenciada e associada com processo biológico de redução da oxidação (cinco genes) e função molecular de atividade oxidoreductase (seis genes).

Avaliando GDEs no sítio de fixação de carrapatos na pele de gado Holstein-Friesian e Brahman [7] identificaram que nove genes foram mais expressos na pele de animais Holstein-Friesian e estavam relacionados com resposta imune inata e adaptativa, enquanto 22 genes foram mais altamente expressos na pele de animais Brahman, incluindo genes que codificam constituintes da matriz extracelular, como dois tipos de colágenos (tipo 1 alfa 1, tipo 2 alfa 1).

A expressão gênica diferencial por meio de microarranjo derivado de cDNAs obtidos de pele em uma população de animais Hereford x Shorthorn, sendo três animais altamente resistentes e dois de menor resistência ao carrapato foi analisada por [4]. A infestação com as larvas de carrapato resultou em um padrão de expressão gênica que foi comum aos dois grupos. Apesar do pequeno número de animais analisados neste estudo, assim como a diferença entre grupos designados de alta e baixa resistência (99% e 95% de resistência), foi possível identificar 18 genes mais expressos nos bovinos considerados altamente resistentes enquanto que outros 48 genes apresentaram maiores níveis de expressão nos animais de baixa resistência. Entre eles, os genes do colágeno tipo I, III e IV apresentaram expressão mais alta nos animais resistentes quando comparados aos animais suscetíveis, sugerindo que parte da variação pode estar relacionada com o tecido epitelial.



[36, 6] encontraram genes possivelmente implicados na resistência do carrapato, incluindo as desidrogenases NADH: *NDUFA12*, *NDUFA9*, *NDUFAF1* e *NDUFV2*. Entretanto, esses genes não foram revelados como GDEs no presente estudo.

### Vias metabólicas

Uma via enriquecida pode ser definida como aquela cujos genes estão mais fortemente associados ao fenótipo do que aqueles genes fora da via [37]. Uma análise de anotação funcional conjunta utilizando ambos os genes *down-regulated* e *up-regulated* foi realizada para evitar potenciais perdas de vias metabólicas nos quais os genes *down-regulated* regulam outros GDEs e vice-versa.

Foram identificadas 221 vias metabólicas para os três grupos genéticos nos contrastes de interesse (coleta 1 x coleta 2). Desse total, 65 vias foram filtradas e significativamente enriquecidas para Angus (Tabela 4), 24 vias filtradas e significativamente enriquecidas para Nelore (Tabela 5) e 17 vias para os animais Cruzados (Tabela 6).

Tabela 4. Vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos (GDEs) na raça Angus no contraste coleta 1 x coleta 2

<b>Código KEGG</b>	<b>Via Metabólica</b>	<b>Nº de genes</b>	<b>Direção</b>	<b>P Value</b>	<b>FDR</b>
bta04520	<i>Adherens junction</i>	53	<i>Down</i>	0.00106805397 429144	0.0102626055 790612
bta00520	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	43	<i>Up</i>	0.00099127593 8512908	0.0102626055 790612
bta00970	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	40	<i>Up</i>	0.00192194479 603409	0.0138730787 028839
bta04360	<i>Axon guidance</i>	134	<i>Down</i>	.147890466679 43e-05	0.0013095482 7590879
bta04662	<i>B cell receptor signaling pathway</i>	57	<i>Down</i>	0.01418132936 94694	0.0488771743 535027
bta01230	<i>Biosynthesis of amino acids</i>	69	<i>Up</i>	0.00068222995 6099235	0.0093274493 4666135

bta04020	<i>Calcium signaling pathway</i>	146	<i>Down</i>	0.00077235587 2350557	0.0093274493 4666135
bta04024	<i>cAMP signaling pathway</i>	149	<i>Down</i>	0.00103056307 277659	0.0102626055 790612
bta01200	<i>Carbon metabolism</i>	103	<i>Up</i>	0.00022594962 6594844	0.0049934867 4774605
bta04260	<i>Cardiac muscle contraction</i>	59	<i>Up</i>	0.00211157808 628871	0.0138730787 028839
bta04514	<i>Cell adhesion molecules (CAMs)</i>	113	<i>Down</i>	0.00132073978 158966	0.0109049927 654017
bta04022	<i>cGMP-PKG signaling pathway</i>	134	<i>Down</i>	0.00075569404 8513584	0.0093274493 4666135
bta04062	<i>Chemokine signaling pathway</i>	142	<i>Down</i>	0.00353592703 988465	0.0186057113 289169
bta04725	<i>Cholinergic synapse</i>	95	<i>Down</i>	0.00056148984 6311188	0.0093274493 4666135
bta04713	<i>Circadian entrainment</i>	79	<i>Down</i>	0.00249630400 660478	0.0150357026 003674
bta04710	<i>Circadian rhythm</i>	25	<i>Down</i>	0.00990413575 531715	0.0402918691 121135
bta00020	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	29	<i>Up</i>	0.00686266012 087922	0.0309519976 880471
bta00270	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	39	<i>Up</i>	0.01237117526 76859	0.0440972537 767512
bta03030	<i>DNA replication</i>	33	<i>Up</i>	0.00035591426 9307712	0.0066200469 9538376
bta00983	<i>Drug metabolism - other enzymes</i>	27	<i>Up</i>	0.01188274853 46695	0.0430506135 436386
bta04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	52	<i>Down</i>	0.00243841259 366632	0.0150357026 003674
bta04012	<i>ErbB signaling pathway</i>	66	<i>Down</i>	0.00251728957 562713	0.0150357026 003674
bta04915	<i>Estrogen signaling pathway</i>	78	<i>Down</i>	0.00067452166 236621	0.0093274493 4666135
bta04664	<i>Fc epsilon RI signaling pathway</i>	55	<i>Down</i>	0.00944735437 856242	0.0393936852 389112
bta04666	<i>Fc gamma R-mediated phagocytosis</i>	67	<i>Down</i>	0.00616643531 491521	0.0283912959 290888
bta04510	<i>Focal adhesion</i>	145	<i>Down</i>	0.00188351748 239027	0.0138730787 028839
bta04068	<i>FoxO signaling pathway</i>	101	<i>Down</i>	0.00213431980 044368	0.0138730787 028839
bta04971	<i>Gastric acid secretion</i>	64	<i>Down</i>	0.00598288033 143523	0.0281384756 573781
bta04724	<i>Glutamatergic synapse</i>	92	<i>Down</i>	0.00127405745 568551	0.0109049927 654017
bta00480	<i>Glutathione</i>	42	<i>Up</i>	0.01437563951	0.0488771743

	<i>metabolism</i>			57361	535027
bta00010	<i>Glycolysis Gluconeogenesis</i>	56	<i>Up</i>	0.00100758524 306729	0.0102626055 790612
bta04912	<i>GnRH signaling pathway</i>	74	<i>Down</i>	0.00569583827 051734	0.0279728946 174296
bta04340	<i>Hedgehog signaling pathway</i>	31	<i>Down</i>	0.00066182900 9340714	0.0093274493 4666135
bta04750	<i>Inflammatory mediator regulation of TRP channels</i>	85	<i>Down</i>	0.00021282399 6589831	0.0049934867 4774605
bta00562	<i>Inositol phosphate metabolism</i>	56	<i>Down</i>	0.00035945956 5360204	0.0066200469 9538376
bta04630	<i>Jak-STAT signaling pathway</i>	127	<i>Down</i>	0.00207865877 897101	0.0138730787 028839
bta04730	<i>Long-term depression</i>	48	<i>Down</i>	0.00508720947 493186	0.0255516657 718168
bta04010	<i>MAPK signaling pathway</i>	210	<i>Down</i>	0.00503572880 376207	0.0255516657 718168
bta01100	<i>Metabolic pathways</i>	1042	<i>Up</i>	0.01039202054 02284	0.0402918691 121135
bta00980	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	33	<i>Up</i>	0.01138741446 20237	0.0428211466 283236
bta04380	<i>Osteoclast differentiation</i>	103	<i>Down</i>	0.00134879584 407196	0.0109049927 654017
bta00190	<i>Oxidative phosphorylation</i>	115	<i>Up</i>	7.95568955231 156e-14	8.7910369553 0427e-12
bta04921	<i>Oxytocin signaling pathway</i>	118	<i>Down</i>	0.00138162804 267533	0.0109049927 654017
bta00030	<i>Pentose phosphate pathway</i>	27	<i>Up</i>	0.00259051680 5442	0.0150659003 684916
bta04070	<i>Phosphatidylinositol signaling system</i>	78	<i>Down</i>	3.93484012491 068e-06	0.0002173999 16901315
bta04611	<i>Platelet activation</i>	103	<i>Down</i>	3.50245705427 275e-05	0.0012900716 8165713
bta00860	<i>Porphyrin and chlorophyll metabolism</i>	24	<i>Up</i>	0.00286186066 403665	0.0162172104 29541
bta04917	<i>Prolactin signaling pathway</i>	71	<i>Down</i>	0.01010199392 27345	0.0402918691 121135
bta03050	<i>Proteasome</i>	43	<i>Up</i>	3.10921565849 965e-10	2.2904555350 9474e-08
bta00240	<i>Pyrimidine metabolism</i>	88	<i>Up</i>	0.00320938509 904729	0.0177318526 722363
bta00620	<i>Pyruvate metabolism</i>	36	<i>Up</i>	0.00937087109 567006	0.0393936852 389112
bta04015	<i>Rap1 signaling pathway</i>	173	<i>Down</i>	0.00339812309 767415	0.0183167123 069753
bta04014	<i>Ras signaling</i>	186	<i>Down</i>	0.00598420070	0.0281384756

	<i>pathway</i>			541525	573781
bta04810	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	160	<i>Down</i>	0.00080190740 9893962	0.0093274493 4666135
bta04140	<i>Regulation of autophagy</i>	110	<i>Down</i>	0.01143188982 38511	0.0428211466 283236
bta03010	<i>Ribosome</i>	125	<i>Up</i>	8.59641433806 549e-21	1.8998075687 1247e-18
bta03008	<i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i>	60	<i>Up</i>	0.00205538964 932464	0.0138730787 028839
bta03013	<i>RNA transport</i>	122	<i>Up</i>	0.01037218185 28653	0.0402918691 121135
bta04970	<i>Salivary secretion</i>	74	<i>Down</i>	0.01380305776 30901	0.0484202502 483003
bta04726	<i>Serotonergic synapse</i>	92	<i>Down</i>	0.00813440175 924594	0.0352490742 900658
bta04071	<i>Sphingolipid signaling pathway</i>	97	<i>Down</i>	0.01176003218 58325	0.0430506135 436386
bta03040	<i>Spliceosome</i>	110	<i>Up</i>	2.08037790089 116e-05	0.0009195270 32193893
bta04919	<i>Thyroid hormone signaling pathway</i>	89	<i>Down</i>	9.10114029644 609e-05	0.0025141900 0689323
bta04370	<i>VEGF signaling pathway</i>	47	<i>Down</i>	0.00123448791 789364	0.0109049927 654017
bta04310	<i>Wnt signaling pathway</i>	106	<i>Down</i>	0.00758564366 012611	0.0335285449 777574

bta = código do KEGG (cada código corresponde a uma via metabólica)

FDR = *False Discovery Rate* (taxa de falsa descoberta)

Tabela 5. Vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos (GDEs) na raça Nelore no contraste coleta 1 x coleta 2

<b>Código KEGG</b>	<b>Via Metabólica</b>	<b>Nº de genes</b>	<b>Direção</b>	<b>P Value</b>	<b>FDR</b>
bta03010	<i>Ribosome</i>	125	<i>Up</i>	2.9893095997 382e-08	6.6063742154 2143e-06
bta00020	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	29	<i>Down</i>	1.2890902175 8747e-06	0.0001424444 69043416
bta00640	<i>Propanoate metabolism</i>	30	<i>Down</i>	2.6531663870 8541e-05	0.0019544992 3848625
bta04612	<i>Antigen processing and presentation</i>	58	<i>Up</i>	0.0001301792 36333274	0.0071924028 0741339
bta03008	<i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i>	60	<i>Up</i>	0.0001997085 6876328	0.0088271187 3933698
bta04152	<i>AMPK signaling pathway</i>	96	<i>Down</i>	0.0002448135 35153211	0.0090172985 4480994
bta00280	<i>Valine, leucine and isoleucine</i>	45	<i>Down</i>	0.0003388012 62429505	0.0106964398 567029

	<i>degradation</i>				
bta04610	<i>Complement and coagulation cascades</i>	75	<i>Up</i>	0.0005870702 75538487	0.0160433489 604191
bta00511	<i>Other glycan degradation</i>	13	<i>Up</i>	0.0006533490 5268675	0.0160433489 604191
bta03040	<i>Spliceosome</i>	110	<i>Up</i>	0.0007367369 37163618	0.0162818863 11316
bta04012	<i>ErbB signaling pathway</i>	66	<i>Down</i>	0.0008760798 67230149	0.0176012409 688966
bta04120	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	114	<i>Down</i>	0.0010559093 0838118	0.0183723860 298271
bta04140	<i>Regulation of autophagy</i>	110	<i>Down</i>	0.0010807285 8998983	0.0183723860 298271
bta04710	<i>Circadian rhythm</i>	25	<i>Down</i>	0.0012848038 2955494	0.0202815461 665458
bta04640	<i>Hematopoietic cell lineage</i>	78	<i>Up</i>	0.0015609207 0422423	0.0223969242 400593
bta04145	<i>Phagosome</i>	141	<i>Up</i>	0.0016214967 7756085	0.0223969242 400593
bta04142	<i>Lysosome</i>	108	<i>Up</i>	0.0017407342 5129807	0.0226295452 668748
bta04720	<i>Long-term potentiation</i>	54	<i>Down</i>	0.0021328037 1963067	0.0261860901 132432
bta04672	<i>Intestinal immune network for IgA production</i>	43	<i>Up</i>	0.0025227684 793596	0.0293437807 336037
bta04064	<i>NF-kappa B signaling pathway</i>	80	<i>Up</i>	0.0028056564 669681	0.0310025039 599975
bta00531	<i>Glycosaminoglycan degradation</i>	15	<i>Up</i>	0.0031759608 9032054	0.0334232074 648019
bta04921	<i>Oxytocin signaling pathway</i>	118	<i>Down</i>	0.0033727523 3124323	0.0338808302 365797
bta00510	<i>N-Glycan biosynthesis</i>	39	<i>Up</i>	0.0043352372 9391997	0.0404048849 908272
bta04623	<i>Cytosolic DNA-sensing pathway</i>	45	<i>Up</i>	0.0043878608 134835	0.0404048849 908272

bta = código do KEGG (cada código corresponde a uma via metabólica)

FDR = *False Discovery Rate* (taxa de falsa descoberta)

Tabela 6. Vias metabólicas representadas pelos genes diferencialmente expressos (GDEs) no grupo genético de animais Cruzados no contraste coleta 1 x coleta 2

<b>Código KEGG</b>	<b>Via Metabólica</b>	<b>Nº de genes</b>	<b>Direção</b>	<b>P Value</b>	<b>FDR</b>
bta03010	<i>Ribosome</i>	125	<i>Up</i>	2.1679679037 8642e-15	4.7912090673 6799e-13
bta04640	<i>Hematopoietic cell lineage</i>	78	<i>Up</i>	5.0706556822 6568e-09	5.6030745289 0357e-07

bta04672	<i>Intestinal immune network for IgA production</i>	43	<i>Up</i>	1.5118420675 132e-08	9.9895696099 0046e-07
bta04612	<i>Antigen processing and presentation</i>	58	<i>Up</i>	2.0065496262 4362e-08	9.9895696099 0046e-07
bta04610	<i>Complement and coagulation cascades</i>	75	<i>Up</i>	2.2600836221 4942e-08	9.9895696099 0046e-07
bta04514	<i>Cell adhesion molecules (CAMs)</i>	113	<i>Up</i>	4.9047724465 3641e-06	0.0001806591 18447424
bta04650	<i>Natural killer cell mediated cytotoxicity</i>	85	<i>Up</i>	1.2585908116 0643e-05	0.0003973550 99092886
bta04062	<i>Chemokine signaling pathway</i>	142	<i>Up</i>	0.0001558846 02414271	0.0043063121 4169423
bta04060	<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	192	<i>Up</i>	0.0002437520 42048466	0.0059854668 1030123
bta04380	<i>Osteoclast differentiation</i>	103	<i>Up</i>	0.0004156634 28508834	0.0091861617 7004523
bta04064	<i>NF-kappa B signaling pathway</i>	80	<i>Up</i>	0.0009712398 40977044	0.0195130913 505388
bta04390	<i>Hippo signaling pathway</i>	110	<i>Down</i>	0.0011405163 9770194	0.0210045103 243441
bta00531	<i>Glycosaminoglycan degradation</i>	15	<i>Up</i>	0.0013901139 8858544	0.0236319378 059525
bta00062	<i>Fatty acid elongation</i>	20	<i>Down</i>	0.0021521614 2067141	0.0339734052 834558
bta04666	<i>Fc gamma R-mediated phagocytosis</i>	67	<i>Up</i>	0.0025157233 8709991	0.0360286891 83676
bta00640	<i>Propanoate metabolism</i>	30	<i>Down</i>	0.0026084118 8660098	0.0360286891 83676
bta04120	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	114	<i>Down</i>	0.0035409142 603476	0.0460318853 845188

bta = código do KEGG (cada código corresponde a uma via metabólica)

FDR = *False Discovery Rate* (taxa de falsa descoberta)

A via “*Inflammatory mediator regulation of TRP (Transient receptor potential) channels*” com genes em sua maioria *down-regulated* é uma via enriquecida nas amostras dos animais do grupo Angus. Essa via está relacionada com sensação de dor, além de outros fatores. A dor resulta do processamento complexo de sinais neurais em diferentes níveis do sistema nervoso central. Alterações na transcrição e tradução de canais TRP podem mudar o fenótipo químico dos neurônios de seu estado em condições normais para um estado alterado

durante a inflamação [38]. A bradicinina e a histamina são mediadores importantes da dor [39]. A bradicinina é uma substância promotora de edema, que, por sua vez, pode ser um componente significativo na rejeição de carrapatos pelos bovinos [40, 41]. A dor e a irritação podem ser suprimidas por uma dipeptidil-carboxi-peptidase que desativa a bradicinina e por uma proteína que se liga à histamina [42], ao inativar o mediador de dor, a geração de dor é evitada juntamente com a tendência de coceira e fricção, o que poderia levar à remoção dos parasitas [43]. Essa supressão da dor pode estar ocorrendo nos animais do grupo Angus e, dessa forma, os carrapatos conseguem maior sucesso na alimentação.

A hemostasia ocorre após a lesão vascular e compreende os eventos de: constrição vascular, agregação plaquetária e coagulação sanguínea. Os carrapatos possuem agentes anti-hemostáticos que são considerados essenciais para sua sobrevivência bem sucedida, prevenindo, assim, a formação de coágulos sanguíneos no hospedeiro e a coagulação da hemolinfa no próprio carrapato [44]. Foi observada neste estudo que a via “*Platelet aggregation*” se comporta *down-regulated* em animais do grupo Angus, podendo ser uma evidência da maior suscetibilidade desses animais às infestações por carrapatos, pois o recrutamento das plaquetas é o primeiro estímulo do organismo quando o endotélio é danificado [45].

A via das moléculas de adesão (CAMs) (bta04514) se mostrou *down-regulated* para os animais da raça Angus e *up-regulated* para os bovinos Cruzados. Essas moléculas de adesão celular são proteínas expressas na superfície celular e desempenham um papel crítico em uma ampla gama de processos biológicos que incluem hemostasia, resposta imune e inflamação [46]. A expressão de moléculas de adesão aumenta quando as células endoteliais são ativadas por estímulos pró-inflamatórios ou por forças hemodinâmicas relacionadas ao fluxo sanguíneo, sendo, assim, consideradas marcadores precoces de ativação endotelial e inflamação sistêmica [47].

[48] observaram que a expressão das moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e moléculas de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) foi maior na pele infestada de hospedeiros suscetíveis submetidos a baixas infestações em comparação com hospedeiros resistentes, entretanto, quando o hospedeiro foi exposto a infestações elevadas, a expressão dessas moléculas de adesão foi regulada negativamente em ambos os fenótipos de infestações.

Outra via interessante para resposta imune e relatada aqui como *down-regulated* para os animais da raça Angus e *up-regulated* para bovinos Cruzados é a “*Chemokine signaling pathway*” (bta04062), pois uma resposta imune inflamatória eficaz requer primeiro o recrutamento de células para o local da inflamação e, em seguida, sua ativação e regulação. As quimiocinas são pequenos peptídeos quimioatrativos que fornecem pistas direcionais para o tráfego celular. As quimiocinas podem influenciar tanto a fase inata quanto a resposta adquirida, portanto, são vitais para a resposta protetora do hospedeiro [49].

Neste trabalho, reportamos também a via “*Complement and coagulation cascades*” (bta4610) *up-regulated* entre animais dos grupos genéticos Nelore e Cruzados. O sistema complemento está envolvido no desenvolvimento da imunidade pelo hospedeiro contra o carrapato, ele é constituído por um grande número de proteínas plasmáticas distintas que reagem umas com as outras para opsonizar os patógenos e induzem uma série de respostas inflamatórias que ajudam a combater a infecção. Já o sistema de coagulação do sangue é um exemplo de uma cascata de enzimas ativadas. Nesse caso, uma pequena lesão na parede dos vasos sanguíneos leva ao desenvolvimento de um grande trombo [50], dificultando assim, o sucesso na alimentação do carrapato.

Diversos estudos analisaram transcriptomas em pele de bovinos e identificaram o envolvimento da cascata do complemento tanto em hospedeiros resistentes quanto em suscetíveis [4, 7, 9]. O fato dessa via estar *up-regulated* em animais dos grupos Nelore e em



bovinos cruzados pode indicar que esses animais são mais eficientes em induzir respostas inflamatórias que ajudam a combater a infecção ocasionada pelo carrapato.

A via metabólica “*Antigen processing and presentation*”, representada por 58 genes, se evidenciou como significativa e *up-regulated* para animais do grupo Nelore e animais Cruzados no presente estudo. As células T reconhecem os fragmentos de peptídeos derivados de antígenos proteicos e se ligam a moléculas da superfície celular codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células que exibem peptídeos associados ao MHC são chamadas de células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs convertem antígenos proteicos em peptídeos e eles exibem complexos peptídeo-MHC para o reconhecimento pelas células T. A conversão de proteínas nativas em fragmentos de peptídeos associados ao MHC por APCs é chamada de processamento de antígeno [51].

Essa via não foi significativa para os animais do grupo Angus, podendo estar relacionada com o fato dos carrapatos serem capazes de modular os macrófagos do hospedeiro e a resposta de citocinas de células T, suprimir proliferação de linfócitos T, diminuir a resposta de anticorpos e inibir as atividades dos componentes do sistema complemento. Essa supressão da função das APCs e linfócitos T reduz a habilidade de gerar e expressar imunidade efetiva para qualquer tipo de imunógeno [52].

De acordo com os genes e vias metabólicas encontrados neste estudo, os animais Cruzados parecem compartilhar mais mecanismos de defesa contra o carrapato com o grupo Nelore do que com o grupo Angus. Essa informação é extremamente importante, pois os animais Cruzados criados em ambiente tropical agregam valor ao mercado da pecuária por possuírem a rusticidade do zebu com qualidade de carne a aumento de produtividade do gado taurino. Informações obtidas a partir da identificação de genes candidatos associados com a resistência bovina ao carrapato poderão ser usadas nos programas de melhoramento genético,

contribuindo, assim, para a seleção de animais resistentes e sistemas de cruzamentos direcionados.

### **Anotação funcional genes *up-regulated* (DAVID)**

Por meio das ferramentas do Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) versão 6.7 [25, 26] foram gerados 13 *clusters* enriquecidos para os genes diferencialmente expressos *up-regulated* em bovinos Nelore. Dos quais, alguns merecem destaque, como um *cluster* de valor de enriquecimento de 2,26 englobando a atividade da enzima quitinase (*CHI3L1*, *CHID1*, *CHIA*), processo catabólico de quitina (*CHI3L1*, *CHID1*, *CHIA*), ligação de quitina (*CHI3L1*, *CHID1*, *CHIA*) e processo metabólico de carboidratos (*PGLS*, *AMDHD2*, *CHI3L1*, *CHID1*, *CHIA*, *GBGT1*, *GUSB*).

A quitinase atua na função de muda e digestão em artrópodes [53,54]. Efeitos positivos da vacinação utilizando uma proteína recombinante de quitinase (rCHT1) oriunda de *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) foram observados por [55] em camundongos infestados com diferentes estágios de desenvolvimento de carrapato *Haemaphysalis longicornis*. Os períodos de muda nos carrapatos alimentados em camundongos imunizados com rCHT1 tenderam a ser mais longos que os dos controles, onde ninfas que se alimentaram em camundongos imunizados com rCHT1 mostraram menor taxa de muda (76,7%) em comparação com 96,7% para o grupo controle, sugerindo que essa proteína recombinante obtida da quitinase pode ser um antígeno candidato ao desenvolvimento de uma vacina eficiente para o controle do carrapato.

Além disso, os artrópodes possuem um exoesqueleto cuticular rígido consistindo, principalmente, de quitina e muitos artrópodes hematófagos apresentam dentro do seu intestino uma estrutura acelular, denominada membrana peritrófica (MP). Os constituintes moleculares ou bioquímicos da MP variam consideravelmente entre os artrópodes, mas sabe-

se que a MP é organizada em uma rede altamente estruturada de fibrilas de quitina mantidas juntas por proteínas de ligação à quitina [56]. Notavelmente, *Babesia microti*, que é transmitida por carrapatos Ixodes, é conhecida por possuir uma organela altamente especializada, que facilita a dispersão de patógenos através da MP [57]. A presença de um *cluster* enriquecido em relação à atividade das quitinases pode evidenciar a hipótese que os animais Nelore expressam esses genes em resposta à quitina presente no exoesqueleto dos carrapatos, para combater ações de patógenos presentes nos carrapatos ou ainda para catalisar as reações induzidas durante o processo de alimentação.

Além disso, foi indicado que as enzimas quitinase e protease produzidas por diferentes espécies fúngicas poderiam ser utilizadas para o controle biológico, devido a sua ação ovicida, em infestação por carrapatos de camelo (*Hyalomma dromedarii*) [58], sendo que esse carrapato é pertencente a mesma ordem (Acari: Ixodidae) que *R. microplus*.

Outro *cluster* de interesse, para GDEs *up-regulated* de Nelore, com valor de enriquecimento de 1,48, está relacionado com resposta imune (7 genes), englobando atividade do receptor ativado pelo fator de necrose tumoral (4 genes), regulação do processo apoptótico (8 genes), interação do receptor citocina-citocina (11 genes).

Alguns genes foram avaliados individualmente devido a sua interessante ontologia ou por serem previamente descritos na literatura e associados com a característica de resistência ou suscetibilidade ao carrapato. A proteína *Claudin-11* pode contribuir para a inflamação cutânea alérgica local no sítio de fixação do carrapato, onde sua expressão aumentada pode indicar migração celular em curso e reparo de ferida da pele onde os carrapatos se alimentam [10]. Em nosso, estudo esse gene foi identificado como *up-regulated* em animais do grupo Nelore, além de outras proteínas pertencentes a família das claudinas (*Claudin-5* e *Claudin-7*).

Outro gene *up-regulated* em Nelore e relacionado com reparo a ferida é o *ALOX5* (*arachidonate 5-lipoxygenase*), um gene de codificação de proteínas, relacionado com resposta à ferimento ou estímulo e redução da oxidação. Entre suas vias relacionadas está a via de sinalização de citocinas no sistema imune.

O gene *CD1b molecule, up-regulated* em Nelore, codifica um membro da família CD1 de glicoproteínas transmembrana, que estão estruturalmente relacionadas com as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entre as suas vias relacionadas encontram-se o processamento e a apresentação de antígenos mediados pelo MHC e pelo sistema imune inato.

O gene *PYCARD (PYD and CARD Domain Containing)* é um gene de codificação de proteínas e merece destaque devido apresentar entre as suas vias relacionadas, a via de sinalização do receptor de tipo Toll (TLR).

Já o gene *APOE (apolipoprotein E)* está relacionado com desenvolvimento de vasos sanguíneos, processo vascular no sistema circulatório, regulação da coagulação sanguínea, regulação do tamanho dos vasos sanguíneos e regulação da resposta ao estresse. Por estar *up-regulated* em animais do grupo Nelore, pode ser um indicativo que esses animais conseguem regular o fluxo sanguíneo perante uma injúria e consequentemente suprimir a alimentação dos parasitas hematófagos. [4] relataram que muitos GDEs indicaram uma supressão da resposta inflamatória e restrição do fluxo sanguíneo em animais resistentes, podendo estes fatos, dificultarem o sucesso da alimentação dos carrapatos. A saliva do carrapato pode conter moléculas que interferem na adesão de leucócitos ao endotélio e hospedeiros resistentes podem montar um perfil inflamatório que é mais eficiente para dificultar a refeição de sangue do carrapato [48].

O gene *CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) ligand 5)* envolvido no processo do sistema imunológico, quimiotaxia, resposta imune, resposta ao estímulo externo. Esse gene também

foi descrito como *up-regulated* por [7] em bovinos holandeses infestados por carrapatos comparados à bovinos Holandeses “naive” sem infestação e juntamente com os genes *IL-8* (*CXCL-8*), *CXCL-2*, são responsáveis por induzirem a quimiotaxia e ativar neutrófilos.

As enzimas do citocromo P450 são uma superfamília de hemoproteínas conhecido por estar envolvido na síntese ou metabolismo de vários moléculas e produtos químicos dentro das células [59]. Um gene P450, chamado *CYP4F3* (citocromo 450 grupo 4, subfamília F, gene 3), conhecido por degradar mediadores químicos de respostas alérgicas [60] já foi previamente descrito como *down-regulated* em um grupo de bovinos resistentes infestados com carrapatos [7] e *up-regulated* em bovinos susceptíveis [9] mostrando uma correlação para a atividade desta enzima em bovinos suscetíveis a carrapatos. Em nosso estudo foi encontrado o gene *CYP27B1* (cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1) como *up-reguled* no grupo Nelore, divergindo dos resultados encontrados para gene da mesma família em outros estudos.

Não foi formado nenhum *cluster* para os GDEs *up-regulated* em Angus. Dos sete GDEs *up-regulated* exclusivos em Angus, *IL17A* (interleucina 17A) merece destaque por fazer parte de uma família de citocinas e por estar envolvida nos processos biológicos de resposta ao estresse, resposta de defesa, resposta inflamatória, resposta ao estímulo externo, resposta ao ferimento, regulação de processo biossintético, entre outros. Evidências mostram que a interleucina 17A, um fator indutor de neutrófilos, desempenha um papel importante na resposta imune em várias doenças [61] e parece possuir também um papel importante no curso de infecções por fungos [62].

Durante a alimentação sanguínea, os carrapatos são capazes de inibir as respostas do hospedeiro, como dor e coceira, hemostasia, angiogênese, ativação do complemento e respostas imunes inatas e adaptativas. No entanto, essa supressão parece não ocorrer de forma eficiente em animais zebuínos puros ou com proporção de sangue zebuíno, pois ambos

apresentaram GDEs envolvidos nesses processos de resposta imune, o que não acontece para os animais do grupo Angus.

A lista de genes *up-regulated* em Cruzados formou 11 *clusters*, onde 245 termos não foram clusterizados. Desse total, foi evidenciado um *cluster* relacionado com resposta imune, com valor de enriquecimento de 6,31 englobando 17 genes relacionados à infecção por *Staphylococcus aureus* (*FCGR2B*, *FCGR3A*, *BLA-DQB*, *C1R*, *C1S*, *C3AR1*, *C5AR1*, *CFI*, *ITGAM*, *BOLA-DMA*, *BOLA-DOA*, *BOLA-DOB*, *BOLA-DQA2*, *BOLA-DQA5*, *BOLA-DRA*, *BOLA-DRB3*, *SELPLG*), 13 genes da via de processamento e apresentação de antígeno (*CD74*, *CD8A*, *BLA-DQB*, *CTSS*, *LGMN*, *BOLA-DMA*, *BOLA-DOA*, *BOLA-DOB*, *BOLA-DQA2*, *DQA5*, *BOLA-DRA*, *BOLA-DRB3*, *MGC126945*) oito genes do complexo proteico do MHC de classe II (*CD74*, *BLA-DQB*, *BOLA-DMA*, *BOLA-DOB*, *BOLA-DQA2*, *BOLA-DQA5*, *BOLA-DRA*, *BOLA-DRB3*), além de diversos genes relacionados como doenças como leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, doença intestinal inflamatória, asma, influenza A, miocardite viral, infecção por herpes e doenças autoimunes.

Outro *cluster* formado para esse grupo, com valor de enriquecimento de 2,99 está relacionado com resposta inflamatória (17 genes), quimiotaxia (10 genes), interação do receptor citocina-citocina (20 genes), via de sinalização de quimiocinas (17 genes), resposta celular ao fator de necrose tumoral (4 genes), entre outras atividades.

Os genes do antígeno linfocitário bovino (BoLA) estão associados a algumas infestações parasitárias e à incidência de doenças [63]. Associação entre alelos do complexo principal de histocompatibilidade bovina (MHC) (BoLA) classe II e resistência à carrapato já foi previamente relatada [64].

Esses resultados bem pronunciados em relação à resposta imune no grupo de Cruzados e que parecem ser a razão pelo qual foram relativamente eficazes na resistência ao carrapato, podem ser devido a heterose, que é a medida que o desempenho de um cruzamento em uma

ou mais características é melhor do que o desempenho médio dos dois genitores, onde essa característica será mais pronunciada quanto maior a distância genética entre as raças envolvidas no cruzamento (com benefício máximo quando se cruza um taurino com um zebuíno).

A investigação do cruzamento é importante para verificar as vantagens da heterose. Embora a raça Nelore seja reconhecida como sendo resistente a carrapatos, pouca informação está disponível sobre cruzamentos com esta raça para a característica de resistência ao carrapato [65].

Existem diversas especulações sobre os mecanismos imunológicos que contribuem para a resistência bovina ao carrapato, entretanto a comparação com outros estudos previamente publicados se torna difícil devido a variação existente nas estratégias experimentais como, por exemplo, estágio de vida do carrapato, tipo de tecido analisado e quantidade de dias para coleta de tecido infestado, raça dos hospedeiros, localização geográfica do estudo, metodologias utilizadas, entre outros.

## **CONCLUSÃO**

Nossos dados fornecem informações sobre a base genética da resistência ao carrapato em bovinos de corte. Identificamos vias metabólicas específicas correlacionadas e genes que tiveram sua expressão alterada após a infestação artificial com larvas de *R. microplus*.

Poucos genes são ativados em animais suscetíveis ao carrapato frente a infestação artificial, comparados com bovinos resistentes ou de resistência intermediária. Até mesmo antes de uma infestação, animais da raça Nelore parecem apresentar um perfil capaz de produzir uma resposta mais rápida e eficaz.

Esses resultados contribuem para uma compreensão mais profunda da resposta imune entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* contra o carrapato do boi, além de ressaltar a utilidade da análise bioinformática de dados de sequência de alta densidade para identificar novos transcritos e genes candidatos que poderão ser aplicados ao melhoramento genético de bovinos em resposta ao controle deste parasita.

### **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, à Embrapa pelo financiamento do projeto de pesquisa, ao Laboratório Multiusuários da ESALQ-USP (Piracicaba-SP) pelo serviço de sequenciamento e à Casa Branca Agro Pastoral LTDA, juntamente com o senhor Gilmar Siqueira de Miranda, por cederem os animais experimentais Angus e Cruzados meio sangue. À Dra. Anna Beatriz Robotton Ferreira pelo auxílio no desenvolvimento do delineamento experimental e a Dra. Polyana Cristine Tizioto pelo auxílio com a interpretação das análises.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Johnston LAY, Kemp DH, Pearson RD. Immunization of cattle against boophilus microplus using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int J Parasitol.* 1986;16(1):27-34.
- [2] Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, PHD Cançado, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(2):150-156.
- [3] Utech KBW, Wharton RH, Kerr DJ. Resistance to *B. microplus* (Canestrini) in diferente breeds of cattle. *Aust J Agric Res.* 1978;29:885-895.
- [4] Wang YH, Reverter A, Kemp D, McWilliam SM, Ingham A, Davis CK, Moore RJ, Lehnert SA. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. *Aust J Exp Agric.* 2007;47:1397–1407.
- [5] Piper EK., Jackson LA., Bagnall NH., Kongsuwan KK., Lew AE. & Jonsson NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;126:110–119.
- [6] Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, Vance ME. & Jackson LA. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1074–1086.
- [7] Piper EK, Jackson LA, Bielefeldt-Ohmann H, Gondro C, Lew-Tabor AE, Jonsson N: Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *Int J Parasitol.* 2010;40:431-441.
- [8] Rodriguez-Valle M, Lew-Tabor A, Gondro C, Moolhuijzen P, Vance M, Guerrero FD et al. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *BMC Genomics.* 2010;11:437.
- [9] Carvalho WA, Domingues R, de Azevedo Prata MC, da Silva MV, de Oliveira GC, Guimarães SE, et al. Microarray analysis of tick-infested skin in resistant and susceptible cattle confirms the role of inflammatory pathways in immune activation and larval rejection. *Vet Parasitol.* 2014;205:307–317.
- [10] Franzin AM, Maruyama SR, Garcia GR, Oliveira RP, Ribeiro JMC, Bishop R. et al. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors.* 2017;10(51):1-24.
- [11] Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;11:951–969.
- [12] Labruna MB, Leite RC, Oliveira PR. Study of the Weight of Eggs from Six Ixodid

Species from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1997;92(2):205-207.

[13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156–159.

[14] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7(1):3.

[15] Mueller O, Lightfoot S, Schröder A: RNA Integrity Number (RIN) Standardization of RNA Quality Control. Tech. Rep. 5989-1165EN, Agilent Technologies, Application Note. 2004.

[16] Holt RA, Jones SJ. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Res.* 2008;18:839–846.

[17] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8:175-185.

[18] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29:15-21.

[19] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010;26:139-140.

[20] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.

[21] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11:R25.

[22] McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:4288-4297.

[23] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 1995;57:289-300.

[24] Wu D, Smyth GK. Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e133.

[25] Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, et al. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic acids research* 2007;35(2):169-175.

[26] Huang DW, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, et al. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics* 2009; 13: Unit 13 11

- [27] Francis J, Little DA. Resistance of droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. *Aust Vet J.* 1964;40:247–53.
- [28] Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 2006;137:1–10.
- [29] Liapi E, Rothschild MA, Schneider PM, Gomes I. Effect of RNA integrity on reference gene expression stability in human post-mortem wounded and normal skin. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5* (2015) e186–e188.
- [30] Bruning O, Rodenburg W, Radonic T, Zwinderman AH, Vries A, Breit TM, et al. RNA isolation for transcriptomics of human and mouse small skin biopsies. *BMC Res Notes.* 2011;4:438.
- [31] Berglund SR, Schwietert CW, Jones AA, Stern RL, Lehmann J, Goldberg Z: Optimized methodology for sequential extraction of RNA and protein from small human skin biopsies. *J Invest Dermatol.* 2007;127:349-353.
- [32] Trost A, Bauer JW, Lanschützer C, Laimer M, Emberger M, Hintner H, Onder K: Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin. *Exp Dermatol* 2007;16:185-190.
- [33] Dudoit, Rine, Yee H. Yang, Matthew J. Callow, and Terence P. Speed. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. In *Statistica Sinica.* 2002;111–39.
- [34] Riek RF. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res.* 1962;13(3):532-550.
- [35] Wagland BM. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos Indicus*) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. *Aust J Agric Res.* 1975;26:1073–1080.
- [36] Chan EKF, Nagaraj SH, Reverter A. The evolution of tropical adaptation: comparing taurine and zebu cattle. *Anim Genet.* 2010;41(5):467–477.
- [37] Evangelou M, Rendon A, Ouwehand WH, Wernisch L, Dudbridge F. Comparison of methods for competitive tests of pathway analysis. *PLoS One.* 2012;7:e41018.
- [38] Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):55-68.
- [39] Clark WG. Kinins and the peripheral and central nervous systems. *Handb Exp Pharmacol.* 1979;25:311– 356.
- [40] Ribeiro JM. Role of saliva in tick/host interactions. *Expl Appl Acarol.* 1989;7:15–20.

- [41] Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJ, Sampaio UM, Sampaio CA. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacol.* 1999;45(1-3):171–177.
- [42] Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell.* 1999;3:661– 671.
- [43] Ribeiro JM. How ticks make a living. *Parasitol Today.* 1995;11(3):91-93.
- [44] Maritz-Olivier C, Stutzer C, Jongejan F, Neitz AW, Gaspar AR. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* 2007;23(9):397–407.
- [45] Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004;114(5):447-53.
- [46] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.
- [47] Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pagès M. Circulating biomarkers. *Thromb Res.* 2012;130 (Suppl 1):S12-5.
- [48] Carvalho WA, Franzin AM, Abatepaulo AR, de Oliveira CJ, More DD, da Silva JS, et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet Parasitol.* 2010;167:260–273.
- [49] Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 2003;15:5-14.
- [50] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The complement system and innate immunity. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
- [51] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* 6a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2008. 564 p.
- [52] Wikel SK. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol.* 1996;41:1–22.
- [53] Kimura, S. The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 1973;19:115–123.
- [54] Koga D, Funakoshi T, Mizuki K, Ide A, Kramer KJ. Immunoblot analysis of chitinolytic enzymes in integuments and molting fluids of the silkworm, *Bombyx mori*, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1992;22:305-311.
- [55] You M, Fujisaki K. Vaccination effects of recombinant chitinase protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *J Vet Med Sci.* 2009;71(6):709–712.

- [56] Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol.* 2009;54:285–302.
- [57] Rudzinska MA, Spielman A, Lewengrub S, Piesman J, Karakashian S. Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell Tissue Res.* 1982;221:471-481.
- [58] Habeeb SM, Ashry HM, Saad MM. Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick *Hyalomma dromedarii* eggs (Acari:Ixodidae). *J Parasit Dis.* 2017;41(1):268–273.
- [59] Estabrook Ronald W. A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug metab dispos.* 2003;31:1461–1473.
- [60] Karasuyama H, Wada T, Yoshikawa S, Obata K. Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites. *Trends Immunol.* 2011;32:125–130.
- [61] Wang W, Zhou A, Zhang X, Xiang Y, Huang Y, Wang L, et al. Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infect Immun.* 2014;82(6):2368–2377.
- [62] Conti HR, Gaffen SL. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J Immunol.* 2015;195(3):780–788.
- [63] Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva MVGB, Teodoro RL, Furlong J. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet Mol Res.* 2006;5(3):513-524.
- [64] Acosta-Rodríguez et al. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: Class II is probably associated with susceptibility. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4):313-21.
- [65] Ibelli AM, Ribeiro AR, Giglioti R, Regitano LC, Alencar MM, Chagas ACS, et al. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. *Vet Parasitol.* 2012;186(3-4):425-430.

Artigo 2: Aceito na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária ( Qualis B1 em Zootecnia e Recursos Pesqueiros)

## **ORIGINAL ARTICLE**

**Analysis of Bm86 conserved epitopes: is a global vaccine against cattle tick *Rhipicephalus microplus* possible?**

**Análise de epítomos conservados da Bm86: é possível uma vacina global contra carrapato-do-boi *Rhipicephalus microplus*?**

**RUNNING TITLE: Analysis of Bm86 conserved epitopes**

Isabella Maiumi Zaidan Blecha<sup>1,2</sup>, Bárbara Csordas Guimarães<sup>1,3</sup>, André de Abreu Rangel Aguirre<sup>4</sup>, Rodrigo Casquero Cunha<sup>5</sup>, Marcos Valério Garcia<sup>1,6</sup>, \*Renato Andreotti<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia do Carrapato, Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Entomologia Médica, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Porto Velho, RO, Brasil

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC, Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, Pelotas, RS, Brasil

<sup>6</sup>Programa de Desenvolvimento Científico Regional – DCR, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia – FUNDECT, Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>7</sup>Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil

Autor correspondente: Renato Andreotti. Laboratório de Biologia do Carrapato, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Avenida Rádio Maia, nº 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil.

email: [renato.andreotti@embrapa.br](mailto:renato.andreotti@embrapa.br)

## ABSTRACT

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* causes significant economic losses in agribusiness. Control of this tick is achieved mainly through the application of chemical acaricides, often resulting in contamination of animal food products and of the environment. Another major concern associated with acaricide use is the increasing reports of resistance of this tick vector against the active ingredients of many commercial products. An alternative control method is vaccination. However, the commercially available vaccine based on a protein homologous to Bm86 exhibits variations in efficacy relative to the different geographical locations. This study aimed to identify antigenic determinants of the sequences of proteins homologous to Bm86. Phylogenetic analyses were performed to determine the extent of divergence between different populations of *R. microplus* to identify the sequence that could be used as a universal vaccine against the multiple geographically distinct populations of *R. microplus* and related tick species. Considering the extensive sequence and functional polymorphism observed among strains of *R. microplus* from different geographical regions, we can conclude that it may be possible to achieve effective vaccination against these cattle ticks using a single universal Bm86-based antigen.

Keywords: Immuno-bioinformatics, phylogenetic analyses, *Rhipicephalus microplus*, ticks.

## Resumo:

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável por perdas significativas no agronegócio. O controle deste carrapato é feito principalmente por meio da aplicação de acaricidas químicos, geralmente resultando na contaminação de produtos de origem animal e do meio ambiente. Outra preocupação importante associada ao uso de acaricidas é o crescente aumento de relatos sobre a resistência deste carrapato a princípios ativos de vários produtos comerciais. Uma alternativa de controle é por meio de vacinação. Porém, a vacina comercializada contendo proteína homóloga à Bm86, apresenta variações de eficácia em relação às diferentes localizações geográficas. Este estudo buscou identificar determinantes antigênicos das sequências de proteínas homólogas a Bm86. As análises filogenéticas foram feitas para determinar a extensão da divergência entre diferentes populações de *R. microplus* com o objetivo de identificar a sequência que poderia ser usada como vacina universal contra as múltiplas populações geograficamente distintas de *R. microplus* e espécies de carrapatos relacionados. Considerando-se a extensa sequência e o polimorfismo observados entre



linhagens de *R. microplus* de diferentes regiões geográficas, podemos concluir que pode ser possível obter uma vacinação efetiva contra esses carrapatos bovinos utilizando um único antígeno universal baseado em Bm86.

Palavras-chave: Imuno Bioinformática, análise filogenética, *Rhipicephalus microplus*, carrapatos.

## INTRODUCTION

The morpho taxonomy of *Rhipicephalus microplus* complex has been challenged in recent years, and until now, they are known as a complex composed of five taxa, namely *R. australis*, *R. annulatus*, *R. microplus clade A sensu*, *R. microplus clade B sensu* and *R. microplus clade C sensu* (BURGER et al., 2014; LOW et al., 2015; CSORDAS et al., 2016). This complex causes significant economic losses to livestock. In Brazil alone, the potential damage caused by this species amounts to US \$3.24 billion per year (GRISI et al., 2014).

Control of these parasites is mainly achieved through the use of acaricides. However, the pressure of use has genetically selected tick populations resistant to these products, resulting in serious problems such as a shortage of new acaricidal chemical entities and the accumulation of residues in both the environment and products of animal origin (ANDREOTTI et al., 2011, RECK et al., 2014; SINGH et al. 2015). Therefore, the search for alternative control methods has become increasingly necessary.

Tick control through vaccines is an alternative to the use of acaricides. Some examples of vaccines that use the Bm86 protein as an immunogen against ticks include TickGard<sup>PLUS</sup> (formerly, Intervet Australia) (WILLADSEN et al., 1995) which is no longer commercially available and Gavac<sup>TM</sup> (Heber Biotec) (CANALES et al., 1997) which is the only one still available and, more recently, Bovimune Ixovac, Mexico (<http://www.ixovac.com/>).

To understand why many vaccine strains should be tested, a better understanding of the history of the cattle tick *R. microplus* is necessary. Based on the history of the dissemination of *R. microplus* according to Barré & Uilenberg (2010), *R. microplus* originated in the southern and southeastern regions of Asia and was thus regarded as one of the most successful invasive tick species, colonizing wide areas in Central and South America, South East Asia, Australia, and islands in the Pacific Ocean.

Vaccines, such as TickGARD<sup>PLUS</sup> (formerly, Intervet Australia), against the cattle tick in Australia, which was previously named *R. microplus* until it was morphologically and

genetically distinguished from *Rhipicephalus australis* and now is part of the *R. microplus* complex (LABRUNA et al., 2009; ESTRADA-PEÑA, et al. 2012; LOW et al., 2015; CSORDAS et al., 2016) are effective against susceptible strains of Australian origin. Numerous tests have been performed and might exhibit a different pattern of sensitivity and therefore induce poorer control when applied against *R. microplus* in America (SUTHERST & BOURNE, 2009).

Bm86-derived vaccines cause reduced weight of engorged adult female ticks, reduced egg mass weight, reduced numbers of ticks in the field over one generation, a decrease in the reproductive capacity of *R. microplus* females, decreased frequency of treatments with acaricides, and a positive impact on the implementation of integrated control programs (JONSSON et al., 2000; ODONGO et al., 2007; VARGAS et al., 2010). The TickGARD<sup>PLUS</sup> (formerly, Intervet Australia) and Gavac<sup>TM</sup> (Heber Biotec) vaccines were shown to be 46.9% and 49.2% effective, respectively, against a Brazilian *R. microplus* strain (ANDREOTTI, 2006). This effectiveness is lower than that reported globally for other strains (RAND et al., 1989; RICHARDSON et al., 1993; PATARROYO et al., 2002). Bm86 from the Campo Grande strain (GenBank: ACA57829) collected from cattle under field conditions in Campo Grande municipality, Brazil, exhibits differences in hydrophobic regions compared with the vaccine proteins. These differences may contribute to the binding of antibodies to the target protein, which may explain the variation in efficacy in other regions worldwide (ANDREOTTI et al., 2008).

Humoral and cellular immune responses are important to an organism to react against specific regions of pathogens via a process known as the adaptive response. Vaccines based on subunits or synthetic peptides, which is a strategy that focuses on epitopes recognized by B and T cells and the major histocompatibility complex (MHC), that could elicit a specific immune response have been studied in recent decades (BEN-YEDIDIA & ARNON, 1997). *In silico* epitope prediction tools are necessary to evaluate which regions of such proteins of interest could be candidates for a peptide-based vaccine. Initially, the predictions focused on epitopes that bind on MHC class I molecules for the development of cellular immune response against virus-infected cells and cancer (KAST et al., 1991; TOES et al., 1996). Examples of some classes of methods used in predictions are quadratic programming, linear programming and the use of sequence profiles obtained by clustering known epitopes of a given MHC allele to score candidate peptides (FLOREA et al., 2003).

The interaction of innate and acquired immune responses to ticks is what will determine the success of the host or the parasite. The innate response consists of an

inflammatory reaction and a hemostatic process, such as vasoconstriction, clot activation and platelet aggregation (SZABÓ, 2008). Hypersensitivity related to histamine release by mast cells is noted in resistant animals (RIEK, 1962). Resistant animals exhibit increased cell infiltrate in the tick attachment site, which suggests that cellular immune response is important to confer natural resistance to the host (SZABÓ & BECHARA, 1999).

Studies on peptide-based vaccines against ticks have been performed in the last decade. *In silico* analysis of Bm86 gut glycoprotein revealed that it contains antigenic epitopes, one of which has elicited greater than 80% efficacy in immunized cattle, against *R. microplus* (PATARROYO et al., 2002). Monoclonal antibodies against a peptide designed based on B cell epitopes from Bd86 (a Bm86 ortholog from *Rhipicephalus decoloratus*) could bind to gut cells from several *Rhipicephalus* species (including *R. microplus*) (KOPP et al., 2009). Reverse vaccinology approaches to identify new tick antigens are currently under investigation. However, the number of tick genome databases available is limited given that these parasites are eukaryotes and have a large genome (LEW-TABOR & RODRIGUEZ-VALLE, 2016).

The post-genomic era revolution has produced massive sequence data on genomes, transcriptomes and proteomes, including those of *R. microplus* (BARRERO et al., 2017). This study aimed to identify antigenic determinants of the sequences of proteins homologous to Bm86 that could be used as a universal vaccine against the multiple geographically distinct populations of *R. microplus*. Variations in the Bm86 locus sequence have been reported in the literature (RODRÍGUEZ et al., 1994; COBON et al., 1995; GARCÍA-GARCÍA et al., 1999). This study aimed to determine the effect of sequence variability within the Bm86 locus on the major epitopes of the Bm86 protein as a means of identifying possible isolates that confer protection against *R. microplus* strains of various geographic origins.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. *In silico* analyses for epitope predictions

For the analyses, we used tools based on the major histocompatibility complexes (MHCs) of cattle (bovine leukocyte antigen (BoLA)) and mice (H-2 antigen). Mouse MHC class I and II predictions are exclusively based on mouse H-2 antigen because it is an animal model commonly used to screen candidate antigens before testing in cattle (AGUIRRE et al., 2016; CONTRERAS et al., 2016; LEW-TABOR & RODRIGUEZ-VALLE, 2016). A variety

of algorithms were run to generate a combination of results capable of predicting qualities that altered the statistical probability of a peptide sequence having antigenic potential for the host immune system in question (bovine MHC I via BoLA loci and mouse MHC I and II via the H-2 locus). We used the following prediction parameters to predict three major epitopes based on the Brazilian Bm86-CG (ACA57829) amino acid sequences published in GenBank: cattle MHC class I binding epitopes for the BoLA-AW10, BoLA-N:00101 and BoLA-D18.4 alleles (<http://tools.iedb.org/mhci/>); binding to the mouse MHC I H-2-Qa1, H-2-Dd and H-2-Ld alleles (<http://tools.iedb.org/mhci/>); binding to the mouse MHC class II H-2-IAb and H-2-IAd alleles (<http://tools.iedb.org/mhcii/>); linear epitopes for B lymphocytes (<http://tools.iedb.org/bcell/>, Bepipred Linear Epitope Prediction); epitopes exposed on the protein surface in the tertiary structure (<http://tools.iedb.org/bcell/>, Emini Surface Accessibility Prediction); prediction of transmembrane helices (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); prediction of intrinsically disordered protein regions (<http://iupred.enzim.hu/>); prediction of the signal peptide (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); and prediction of glycoposphatidylinositol (GPI) anchors (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>).

The function of each *in silico* tool mentioned above was to predict Bm86 regions with the potential to trigger cellular immune responses in cattle (the only available source for predictive tools for several animal species, netMHCpan, is based on MHC class I); predict regions with the potential to trigger cellular and humoral immune responses in mice (MHC class I was evaluated for comparison with cattle results) (VORDERMEIER et al., 2003; NENE et al., 2012; RODRIGUEZ-VALLE et al., 2013; AGUIRRE et al., 2016); predict B lymphocyte epitopes to ensure immunological memory and generate rapid antibody responses in immunized hosts exposed to the tick to avoid selecting epitopes in transmembrane helices, as these structures can mask epitopes because they are anchored to the cell membrane; evaluate intrinsically disordered regions, which are of some interest because they do not have a constant tertiary structure and the epitope is more likely to be exposed to the immune system when it is located in a flexible region of the protein, to avoid epitopes located in signal peptides, which are typically cleaved after the protein reaches its final destination; and predict glycoposphatidylinositol anchors (GPI) that may increase triggering of immune responses in the host.

To determine whether the epitopes predicted with the algorithms listed above are conserved among the different Bm86 sequences deposited in GenBank, all sequences were

analyzed using the Mega 6.0 program (TAMURA et al., 2013), and an alignment was constructed using Gonnet modeling.

Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) was used to perform alignments of the epitopes predicted with *Bos taurus* protein sequences available in the SwissProt database using the BLASTP 2.5.1 program. This analysis aimed to ensure that the predicted sequences did not have homologies with host proteins, thereby minimizing autoimmune responses following vaccination.

## 2. Sequence alignment and phylogenetic tree construction

The Bm86-CG protein sequence (GenBank: ACA57829) and the three predicted epitope sequences were aligned with the sequences available from GenBank using the BLASTp program. In this way, a database was constructed that contained all similar sequences obtained from the analysis. The Mega 6.0 program (TAMURA et al., 2013) was applied to align the sequences taken from GenBank using the Gonnet protein weight matrix.

A Bayesian phylogenetic analysis was performed using the MrBayes 3.2.6 program (RONQUIST et al., 2003). An amino acid analysis was performed using the Dayhoff model (DAYHOFF et al., 1978). For the data set used in this study, approximately 500,000 generations were found to be sufficient for topology and were plotted using the FigTree 1.4.2 program (TREE BIO, 2016). All analyses for Bm86 epitopes and partial protein of Bm86 were initiated with random starting trees and were run for  $1 \times 10^6$  generations, with trees being sampled every 1,000 generations. To determine the stationarity of the Markov chain, the log-likelihood scores of sample points were plotted against generation time. The first 25% of samples was estimated as burn-in for each data set. The remaining samples were retained for generating consensus trees. Each sample included a tree topology that incorporates branch length and substitution model parameter values. These topologies were used to generate a 50% majority rule consensus tree, with the percentage of sample recovering any particular clade representing the posterior probability of a clade (1=100%). No manual editing of the trees was performed. The clades of *R. microplus* - THAILAND (KAEWMONGKOL et al., 2015), *R. appendiculatus* (NIJHOF et al., 2009; KAMAU et al., 2011; KAMAU et al., 2016), *R. decoloratus* (ODONGO et al., 2007, CANALES et al., 2008), were collapsed (tree's triangle). Species of the tick *Hyalomma detritum* (AEK31101), *H. detritum* (AEK31102), *H. anatolicum* (ACD14076) were used as outgroups in phylogenetic analyses.

## RESULTS

The bioinformatics analysis predicted three major relatively conserved regions (Figure 1) in the Bm86 sequences from different geographical regions. The Bm86-CG protein sequence (GenBank: ACA57829) was used as a reference because it originated from a strain of *R. microplus* from the study region (ANDREOTTI et al., 2008). The established mouse MHC class II and B cell epitopes were as follows: epitope 1 - SSGQRCVMENGNVCKEKSDATT (23 amino acids, located between residues 566 and 588); epitope 2 - KCPDDHECSREPAKDSCSEEDNGK (24 amino acids, located between residues 540 and 563); and epitope 3 - DSYCSPGSPKGPDGQCKNAC (20 amino acids, located between residues 170 and 189) (Figure 1).

Epitope 1 (Figure 2) formed a distinct clade with high convergence for *R. microplus* populations from the geographical regions of Brazil, the United States and Mozambique, Israel and some populations from Thailand. A collapsed group was formed that included the variants from Thailand. Immediately below was formed with branch with variants from Thailand, USA, Mexico, Egypt and the species *Rhipicephalus annulatus* (GenBank: ACR19242 and ACL27210). The other clades were separated by species divergent for epitope 1.

For epitope 2 (Figure 3), the phylogenetic tree presented a clade with high convergence for *R. microplus* populations from the geographic regions of USA (FREEMAN et al., 2010), Mexico (CANALES et al., 2009), Israel (CANALES et al., 2009), and variants of Thailand (KAEWMONGKOL et al., 2015). High convergence with the *R. annulatus* species and *R. decoloratus* were observed in this same clade. The other clades were separated by species divergent for epitope 2.

For epitope 3 (Figure 4), a large clade with high convergence was formed for all of the Brazilian *R. microplus* populations reported by Sossai et al. (2005) together with the Brazilian strain reported by Andreotti et al. (2008). In the same clade, high convergence was observed for the geographic regions of the United States (FREEMAN et al., 2010) and Mexico (CANALES et al., 2009), for all of variants *R. microplus* from Thailand (KAEWMONGKOL et al., 2015). High convergence for orthologous species *R. annulatus* (ABY58969) and *R. decoloratus* (ABY58970, ABG21130, ABG21131).

The *R. annulatus* species from Freeman et al. (2010) was located outside the large clade, revealing the average convergence for epitope 3. A distinct clade was formed for *R. appendiculatus*, and this clade exhibited divergence among the other species.

For the Bm86-CG protein (Figure 5), high convergence of Brazilian populations of *R. microplus* with other geographic regions including: USA United States (FREEMAN et al., 2010), Mexico (CANALES et al., 2009), Venezuela, Colombia, Uruguay and Argentina (SOSSAI et al., 2005), Mozambique (CANALES et al., 2008; NIJHOF et al.; 2009) and some variants from Thailand (KAEWMONGKOL et al., 2015).

Other clade was formed for the variants from Thailand (KAEWMONGKOL et al., 2015), the United States (FREEMAN et al., 2010) and the orthologous *R. annulatus* species (GenBank: ADR19242, ADQ19693, ADQ19691 and ACL27210). The other clades were separated by species that showed divergence of the Bm86 protein.

## DISCUSSION

According to De Groot (2006), a vaccine must promote and trigger a strong B cell and/or T cell response to be effective. Because complex cellular interactions occur during the development of an immune response, mapping and characterization of epitopes is of fundamental importance for the selection of peptides with potent antigenicity as candidate vaccine components. The MHC genes of cattle were mapped from bovine autosome 23 (BTA 23) (FRIES et al., 1986; FRIES et al., 1993) and are referred to together as bovine leukocyte antigen (BoLA). This organization distinguishes BoLA from the MHC in humans and rodents, in which the MHC genes are located on chromosome 6 (HLA) and 17 (H-2), respectively (LEWIN, 1996). McShane et al. (2001) used FISH for mapping genes and revealed that tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), heat shock protein 70 (HSP70.1) and 21 steroid dehydrogenase (CYP21) are closely linked in the region of BTA23 band 22 along with BoLA class I genes. Therefore, this gene is important for immunological functions.

Few variations that might be involved in the process associated with the global variability in vaccine efficacy were observed in the three Bm86-CG epitopes that were predicted here to be the most antigenic. In fact that, these epitopes contained regions with major similarities to homologous domains of Bm86 from strains from different geographical regions (RAND et al., 1989; RICHARDSON et al., 1993; DE LA FUENTE et al., 1999; PATARROYO et al., 2002; ANDREOTTI, 2006; ANDREOTTI et al., 2008). Nevertheless, the variability observed in the Bm86 molecule may explain the differences in the efficacy observed when cattle vaccinated with rBm86-CG and rBm86 were challenged by infesting

with the same strain, *R. microplus* Campo Grande (CUNHA et al., 2012; ANDREOTTI, 2006).

Peconick et al. (2008) studied polymorphisms and observed that vaccine efficacy was not decreased despite changes in the amino acid sequences of polypeptide SBm7462 in two Brazilian isolates compared with the sequence of the polypeptide obtained from other isolates by Patarroyo et al. (2002). Despite the variability of proteins homologous to Bm86 and their impact on the immune response, it must be borne in mind that the genes of two MHC class II alleles of cattle have been described with a deletion of three base pairs in their nucleotide sequences, leading to the deletion of a lysine at the antigen recognition site. This deletion was correlated with increased immune response against the commercial vaccine TickGARD<sup>PLUS</sup> (formerly, Intervet Australia) (SITTE et al., 2002). Thus, the influence of the genetic variation of the MCH class II alleles on the cattle immune response against vaccine antigens is also evident.

The criterion established based on the prediction of B lymphocyte-binding linear epitopes had the objective of selecting sequences against which the host could trigger a humoral response in the shortest time following re-exposure to the antigen and that could be used to stimulate immune memory with boosters using vaccine antigen formulations. Were predicted Bm86 regions exposed on the surface of the tertiary structure as a basis for selecting peptide sequences accessible for binding to antibodies produced by the host against each peptide.

Predictions of transmembrane helices were used to define the regions that should be avoided. These regions are usually located next to the lipid bilayer of the cell membrane, hindering their access by host antibodies. Bm86-CG lacks transmembrane helices according to the results of our TMHMM analysis (data not shown). The prediction of intrinsically disordered regions was performed to select peptide sequences that are interesting targets because these peptides do not have a constant tertiary structure. This phenomenon may facilitate exposure of the epitopes in the native protein, thereby facilitating access to the antibodies. Epitopes 1 and 2 located near the C-terminus could have this characteristic to our results for the prediction of intrinsically disordered protein regions.

The signal peptide is usually cleaved during post-translational modification of the protein. Signal peptide prediction is used in reverse vaccinology to select proteins that are likely to be secreted by the target cell of the agent. However, these sequences should not be included in the selected peptide sequences because they typically do not form part of the final structure of the mature protein. The Bm86-CG protein does not appear to have a signal



peptide according to the signalP algorithm (data not shown). This fact is due to the Bm86-CG sequence deposited in GenBank is a partial sequence of the whole protein, which lacks amino acids at the signal peptide site. On the other hand, full Bm86 sequences, such as from isolate N1 from a Thailand strain, present a signal peptide of 20 amino acids, as showed by signal algorithm (data not shown). The prediction of GPI anchors in combination with signal peptide prediction allows us to infer that the protein is anchored in a biological membrane. However, we did not observe a GPI anchor based on PderGPI results (data not shown). Additionally, we can infer its possible location, which is a factor that can enhance the triggering of an immune response in the host.

Alignment of the sequences of Bm86 proteins from distinct isolates allowed us to identify highly conserved regions (supplementary material 1) that could be used to create a vaccine that is based on subunits/peptides. However, these regions do not coincide with the antigenic regions of bovine Bm86 that are capable of binding to the bovine MHC. Thus, when the animal is exposed to Bm86, its antigen-presenting cells (APCs) will process the antigen but will present only peptides from variable regions to CD4+ T lymphocytes via MHC class II. This process may result in nonspecific immune responses against these different strains.

A review by Parizi et al. (2012) indicate that the decades-long search for a universal tick vaccine is making progress, with such a vaccine likely to be based on multiple antigens and consequently successful vaccinations against multiple tick species. Our study shows progress towards a universal tick vaccine, that presented three conserved epitopes for regions of the Bm86 protein. Investigation of Hue et al. (2017) an experimental vaccine was developed based on the orthologous *R. australis* Bm86 sequence identified from local *R. australis* strains and a recombinant protein expressed in *Escherichia coli*. The use of the vaccine reduced the population by 74.2% to each generation. These data once again demonstrate that it is possible to direct for a universal anti-tick vaccine.

de la Fuente et al. (2016) in the review work on vaccine strategies reports the caution should thus be placed on extrapolating the protective abilities of a specific antigen between tick species, as was seen in the case of Bm86 vaccines. It is worth mentioning, that new approaches to tick control depend on host-parasite interactions. Thus, the efficacy of a vaccine also stems from the clarification of the different immunological profiles presented by the hosts, where bovine tick resistance is a hereditary phenotype (KASHINO et al., 2005; CARVALHO et al., 2010).

The present study showed that based on Bm86, *R. microplus* populations were homogeneous and displayed high convergence among the isolates studied by García-García et

al. (2000), Sossai et al. (2005), Andreotti et al. (2008), Canales et al. (2009), Nijhof et al. (2009), Freeman et al. (2010); strains of *R. microplus* - THAILAND (KAEWMONGKOL et al., 2015); and Bm86 orthologs of *R. microplus*, such as *R. annulatus* (ABY58969) and *R. decoloratus* (ABY58970, ABG21130, ABG21131). Therefore, the results in the present study (Figures 4 and 5) suggest that the polymorphisms were not computed as significant changes and that all these peptides (Figures 2, 3 and 4) with polymorphic sites are more conserved when compared with the partial Bm86 protein sequence (Figure 5).

Interestingly, the strain reported by Willadsen et al. (1989) (P20736) and from He et al., (2017) (ATW75471 -76) remained in the clade along with the other Bm86 strains (Figure 4). It is worth remembering that the cattle tick, previously named *R. microplus* until its morphological and genetic distinction to *R. australis* (ESTRADA-PEÑA et al. 2012). These strains obtained high convergence with the other strains of *R. microplus* for epitope 3. As this strain could produce an ortholog of *R. microplus* Bm86, this peptide could become a vaccine candidate for both *R. microplus* and *R. australis*.

Canales et al. (2009) showed that the Ba86 protein (an ortholog of Bm86 from *R. microplus*) is effective in controlling infestation with *R. annulatus* and *R. microplus*. This ortholog was shown to have low convergence in the tree with the partial Bm86 protein (ACR19242) (Figure 5). However, the chosen epitopes have been preserved for this ortholog, and may continue to be efficient in cross-immunity. This shows even orthologs have conserved regions and could be effective antigenic and immunogenic regions.

Differences were observed in the phylogenetic trees of epitope 1 and for total protein Bm86 (Figures 2 and 5) in the Thailand variants, which formed a distinct clade from the other *R. microplus* sequences. These differences could hinder the development of a global vaccine for these variants. However, epitopes 2 and 3 (Figures 3 and 4) presented a larger and more homogeneous clade with convergence among the *R. microplus* Thailand populations (Figure 3), suggesting that this epitope was more conserved and could generate a potential immunogen among the Thailand variants described by Kaewmongkol et al. (2015).

Kamau et al. (2016) demonstrated that intestinal cDNA from four *Rhipicephalus appendiculatus* field populations revealed genotypic polymorphisms and suggested that other factors such as exposure to innate immune components during blood feeding may direct the selection pressure that leads to the observed polymorphisms. Additional polymorphisms may have occurred during the evolution of the *R. microplus* populations (SOSSAI et al., 2005). Population studies performed by Csordas et al. (2016) with the cytochrome c oxidase subunit 1 (COI-1) gene indicated the presence of two haplotypes that differ from other Brazilian *R.*

*microplus* populations. Thus, their antigenic epitopes may have become distinct from the epitopes of other populations. This possibility may indicate that most antigenic characteristics are not located in regions conserved in the Bm86-CG protein but instead are located in more variable regions.

Importantly, some convergence was observed for each phylogenetic tree of each selected epitope, resulting in their distribution among several geographic areas. Conversely, when the entire amino acid sequence of the Bm86-CG protein was analyzed (Figure 5), the polymorphisms formed several clusters associated with various geographic regions. This work presents peptides for a vaccine that has point polymorphisms between conserved regions of the epitopes, but this does not interfere in the immunogenic and antigenic regions and may be candidates for a global vaccine. The *in silico* analysis presented here can be an important tool for related tick populations that have not been challenged with the Bm86 antigen in order to minimize future economic problems arising from infestations.

## CONCLUSION

The phylogenetic analysis of the isolated epitopes and the Bm86-CG protein revealed geographical patterns among *R. microplus* tick isolates collected from the database; these isolates were classified into a major clade based on their amino acid sequences. These sequences may contain epitopes with amino acid residues that have both conserved and antigenic regions. However, this characteristic is found in most variable regions of the protein.

Considering the extensive sequence and functional polymorphism observed among strains of *R. microplus* from different geographical regions, we can conclude that it may be possible to achieve effective vaccination against these cattle ticks using a single universal Bm86-based antigen. These point polymorphisms in some amino acids do not form in a less conserved peptide, not altering their antigenic or immunogenic capacity. As genomic technologies in vaccine development continue to improve and evolve, sequencing of various tick genomes can identify tick vaccine candidates globally applicable to various species of ticks.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect, MS) - Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Aguirre AAR, Lobo FP, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet Parasitol* 2016; 221: 30-38.
- Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15(3): 97-100.
- Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Perez De Leon A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 127-133.
- Andreotti R, Pedroso MS, Caetano AR, Martins NF. Comparison of Predicted Binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Intestine Protein Variants Bm86 Campo Grande Strain, Bm86 and Bm95. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17(1): 93-98.
- Barré N, Uilenberg G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Rev Sci Tech* 2010; 29(1): 149-160, 135-147.
- Barrero RA, Guerrero FD, Black M, McCooke J, Chapman B, Schilkey F, et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *Int J Parasitol* 2017; 47(9): 569-583.
- Ben-Yedidia T, Arnon R. Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8(4): 442-448.
- Burger TD, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Mol Phylogenet Evol* 2014; 76: 241-253.

Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnol* 2009; 9: 29.

Canales M, Pérez de la Lastra JM, Naranjo V, Nijhof AM, Hope M, Jongejan F, et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 2008; 8: 14.

Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 1997; 15(4): 414-422.

Carvalho WA, Franzin AM, Abatepaulo AR, De Oliveira CJ, Moré DD, Da Silva JS, et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet Parasitol* 2010, 167(2-4): 260-273.

Cobon G, Hungerford J, Woodrow M, Smith D, Willadsen P. Vaccination against *Boophilus microplus*: The Australian field experience. In: de la Fuente J. *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*, Elfos Scintiae, Havana; 1995. p. 163-176.

Contreras M, Villar M, Alberdi P, de la Fuente J. Vaccinomics Approach to Tick Vaccine Development. *Methods Mol Biol* 2016; 1404: 275-286.

Csordas BG, Garcia MV, Cunha RC, Giachetto PF, Blecha IMZ, Andreotti R. New insights from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(3): 317-326.

Cunha R, León AP, Leite FPL, Pinto LDS, Santos Júnior AG, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(3): 254-262.

Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC. A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff MO. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, suppl. 3. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD, 1978. p. 345-352.

De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today* 2006; 11(5-6): 203-209.

de la Fuente J, Kopáček P, Lew-Tabor A, Maritz-Olivier C. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol* 2016; 38(12): 754-769.

de La Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999; 15(3-5): 143-148.

Estrada-Peña A, Venzal JM, Nava S, Mangold A, Guglielmone AA, Labruna MB, et al. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *J Med Entomol* 2012; 49(4): 794-802.

Florea L, Halldórsson B, Kohlbacher O, Schwartz R, Hoffman S, Celera SI. Epitope Prediction Algorithms for Peptide-based Vaccine Design. *Proc IEE Comput Biol Conf* 2003; 2: 17-26.

Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit Vectors* 2010; 3: 101.

Fries R, Eggen A, Womack JE. The bovine genome map. *Mamm Genome* 1993; 4: 405-428.

Fries R, Hediger R, Stranzinger G. Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. *Anim Genet* 1986; 17(4): 287-294.

García-García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(11): 883-895.

García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000; 18(21): 2275-2287.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23(2): 150-156.

Hüe T, Petermann J, Bonnefond R, Mermoud I, Rantoen D, Vuocolo T. Experimental efficacy of a vaccine against *Rhipicephalus australis*. *Exp Appl Acarol* 2017; 73(2): 245-256.

Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, et al. Evaluation of TickGARD<sup>PLUS</sup>, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol* 2000; 88(3-4): 275-285.

Kaewmongkol S, Kaewmongkol G, Inthong N, Lakkitjaroen N, Sirinarumitr T, Berry CM, et al. Variation among Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks collected from cattle across Thailand. *Exp Appl Acarol* 2015; 66(2): 247-256.

Kamau LM, Skilton RA, Githaka N, Kiara H, Kabiru E, Shah T, et al. Extensive polymorphism of Ra86 genes in field populations of *Rhipicephalus appendiculatus* from Kenya. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(5): 772-781.

Kamau L, Skilton RA, Odongo DO, Mwaura S, Githaka N, Kanduma E, et al. Differential transcription of two highly divergent gut-expressed Bm86 antigen gene homologues in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodida). *Insect Mol Biol* 2011; 20(1): 105-114.

Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proença I, Carvalho WA, et al. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 2005; 110(1): 12-21.



Kast WM, Roux L, Curren J, Blom HJJ, Voordouw AC, Meloen RH, et al. Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2283-2287.

Kopp N, Diaz D, Amacker M, Odongo DO, Beier K, Nitsch C, et al. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* BM86 homologues. *Vaccine* 2009; 28(1): 261-269.

Labruna MB, Naranjo V, Mangold JA, Thompson C, Estrada-Peña A, Guglielmone AA et al. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 46-58.

Lew-Tabor AE, Rodriguez-Valle. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(4): 573-585.

Lewin HA. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In: Schook LB, Lamont SJ (Eds). *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*, CRC Series in Comparative Immunology, 4th ed. Fla, USA, 1996. p. 65-98.

Low VL, Tay ST, Kho KL, Kho FX, Tan TK, Lim YAL, et al. Molecular characterization of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasit Vectors* 2015; 8: 341.

McShane RD, Gallagher Jr DS, Newkirk H, Taylor JF, Burzlaff JD, Davis SK, et al. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Anim Genet* 2001; 32(5): 235-239.

Nene V, Svitek N, Toye P, Golde WT, Barlow J, Harndahl M, et al. Designing bovine T cell vaccines via reverse immunology. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3(3): 188-192.

Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol* 2009; 10:112.

Odongo D, Kamau L, Skilton R, Mwaura S, Nitsch C, Musoke A, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine* 2007; 25(7): 1287-1296.

Patarroyo JH, Portela RW, Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88(3-4): 163-172.

Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, et al. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet J* 2012; 194(2): 158-165.

Peconick AP, Sossai S, Girão FA, Rodrigues MQ, Souza e Silva CH, Guzman QF, et al. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Exp Parasitol* 2008; 119(1): 37-43.

Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(24): 9657-9661.

Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* 2014; 201(1-2): 128-136.

Richardson MA, Smith DR, Kemp DH, Tellam RL. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein Bm86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. *Insect Mol Biol* 1993; 1(3): 139-147.

Riek RF. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res* 1962; 13(3): 532-550.

Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *P. pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994; 33(2): 135-146.

Rodriguez-Valle M, Moolhuijzen P, Piper EK, Weiss O, Vance M, Bellgard M, et al. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using in silico predicted B and T cell epitopes. *Int J Parasitol* 2013; 43(9): 739-752.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19(12): 1572-1574.

Singh NK, Gelot IS, Jyoti, Singh V, Rath SS. Detection of amitraz resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from North Gujarat, India. *J Parasit Dis* 2015; 39(1): 49-52.

Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85(3-4): 129-135.

Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2005; 37(3-4): 199-214.

Sutherst RW, Bourne AS. Modelling non-equilibrium distributions of invasive species: a tale of two modeling paradigms. *Biol Invasions* 2009; 11: 1231-1237.

Szabó MPJ, Bechara GH. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(11): 915-928.

Szabó MPJ. Imunopatologia da resistência de bovinos ao carrapato *R. (B.) microplus*. In: Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. 1<sup>st</sup> ed. São Paulo: MedVet; 2008. P. 107-126.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-2729.

Toes REM, Offringa R, Blom RJJ, Melief CJM, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhance tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7855-7860.

Tree Bio. FigTree [online]. London; 2016 [cited 2017 Mar 02]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>

Vargas M, Montero C, Sánchez D, Pérez D, Valdés M, Alfonso A, et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet Res* 2010; 6: 43.

Vordermeier P, Whelan AO, Hewinson RG. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infect Immun* 2003; 71(4): 1980-1987.

Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1995; 110: S43-S50.

Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunological control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989; 143(4): 1346-1351.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Analysis of Bm86-CG integration using free algorithms available online, based on T and B cell epitope predictions. Each tool predicts a certain characteristic based on calculations that use the properties of each amino acid in the primary protein sequence to generate graphs indicating which regions of the primary structure have a statistically significant probability of having the desired characteristic. For this purpose, a threshold (horizontal line parallel to the x-axis) is plotted. All regions of the graph that exceed this threshold are considered in the present analysis. By superimposing the graphs from different algorithms, we can better visualize which regions share the largest combination of antigenic characteristics.

Figure 2. Bayesian phylogenetic tree for epitope 1 (SSGQRCVMENGNVAVCKEKSDATT) of protein Bm86-CG with 23 amino acids. The strains of *Rhipicephalus microplus* is shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

Figure 3. Bayesian phylogenetic tree for epitope 2 (KCPDDHECSREPAKDSCSEEDNGK) of protein Bm86-CG with 24 amino acids. The strains of *Rhipicephalus microplus*, is shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

Figure 4. Bayesian phylogenetic tree for epitope 3 (DSYCSPGSPKGPDPGQCKNAC) of protein Bm86-CG with 20 amino acids. Populations of *Rhipicephalus microplus* are shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

Figure 5. Bayesian phylogenetic tree for partial protein Bm86 (83-340 aa). Populations of *Rhipicephalus microplus* are shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

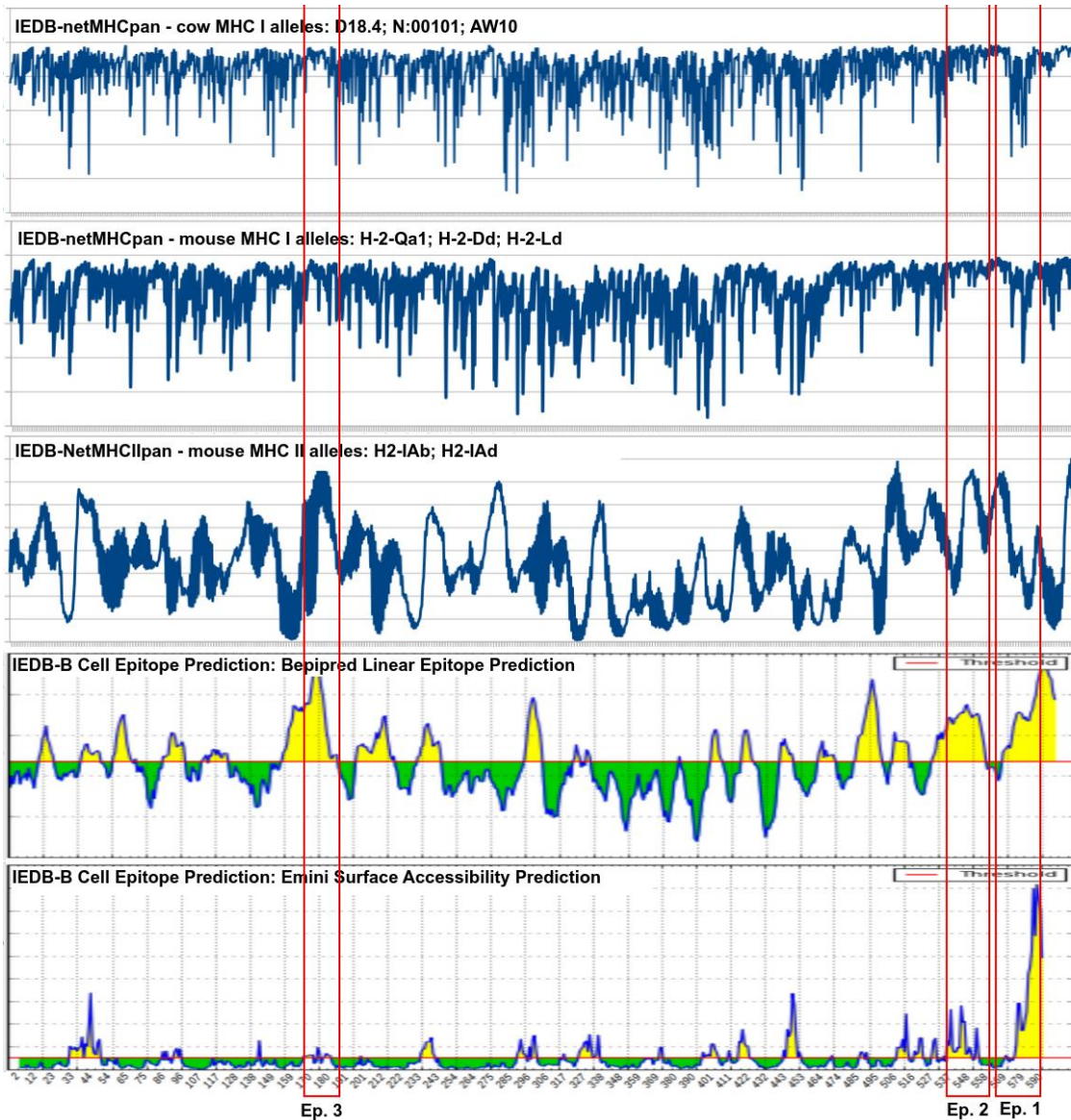


Figure 1. Analysis of Bm86-CG integration using free algorithms available online, based on T and B cell epitope predictions. Each tool predicts a certain characteristic based on calculations that use the properties of each amino acid in the primary protein sequence to generate graphs indicating which regions of the primary structure have a statistically significant probability of having the desired characteristic. For this purpose, a threshold (horizontal line parallel to the x-axis) is plotted. All regions of the graph that exceed this threshold are considered in the present analysis. By superimposing the graphs from different algorithms, we can better visualize which regions share the largest combination of antigenic characteristics.

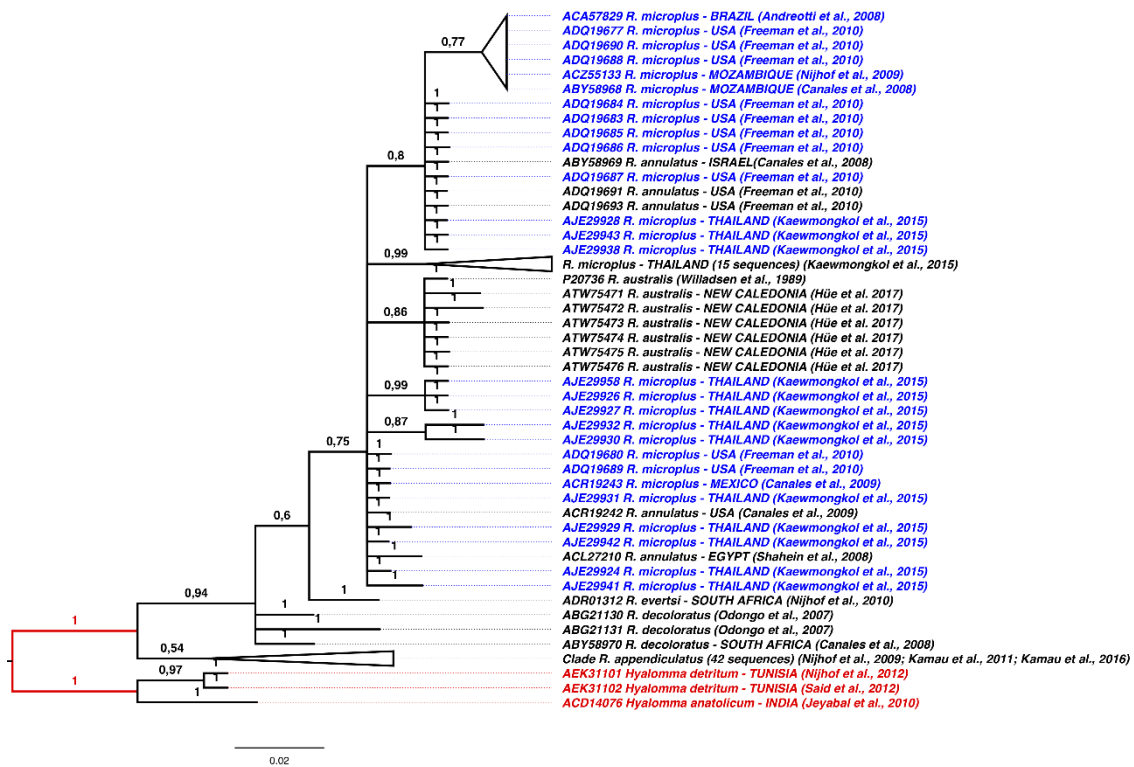


Figure 2. Bayesian phylogenetic tree for epitope 1 (SSGQRCVMENGNVAVCKEKSDATT) of protein Bm86-CG with 23 amino acids. The strains of *Rhipicephalus microplus* is shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.



Figure 3. Bayesian phylogenetic tree for epitope 2 (KCPDDHECSREPAKDCSCSEEDNGK) of protein Bm86-CG with 24 amino acids. The strains of *Rhipicephalus microplus*, is shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.







Figure 5. Bayesian phylogenetic tree for partial protein Bm86 (83-340 aa). Populations of *Rhipicephalus microplus* are shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

## Considerações finais

Considerando a diversidade nos graus de resistência aos carrapatos observada em diferentes raças de bovinos e também a ampla gama de cepas de *R. microplus* existentes em diferentes regiões geográficas, é evidente a necessidade do estabelecimento de um método de controle eficaz, com busca e proposição de novas ferramentas de controle e/ou tecnologias.

É um consenso universal que o gado zebuino apresenta, em média, maior resistência ao carrapato do que bovinos europeus. Devido à resistência ser uma característica herdável, elucidar os mecanismos de como os zebuínos são capazes de prevenir uma alta infestação por carrapatos e identificar genes que se expressam diferentemente nesses animais é um ponto crucial no desenvolvimento de programas de seleção de raças.

O crescente volume de dados em bioinformática abre portas para descoberta de novas informações biológicas, evidenciando a grande utilidade e necessidade de novas de ferramenta desta área.

Observamos que é possível obter uma vacinação efetiva contra carrapatos bovinos usando um único antígeno universal baseado em Bm86. Como as tecnologias genômicas no desenvolvimento de vacinas continuam a melhorar e evoluir, o sequenciamento de vários genomas de carrapatos pode auxiliar na identificação de antígenos candidatos globalmente aplicáveis a várias espécies de carrapatos.

Essas formas de controle complementar tendem a diminuir o impacto desses ectoparasitas na produção animal, reduzindo a transmissão de patógenos, evitando perdas na produção, problemas com resíduos no meio ambiente e produtos de origem animal, além do desenvolvimento do fenômeno de resistência em cepas de *R. microplus* devido ao uso indiscriminado dos acaricidas.

**APENDICE**

## Material Suplementar Artigo 1

Tabela de genes diferencialmente expressos (GDEs) *up regulated* exclusivos de cada um dos três grupos genéticos de acordo com o Diagrama de Venn e sua respectiva ontologia gênica (planilhagenes.xls).