

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM OVINOS INFECTADOS COM *Haemonchus contortus*

TOSCANO, J.H.B.; LOPES, L.G.; GIRALDELO, L.A.; SILVA, M.H.; OKINO, C.H.; CHAGAS, A.C.S.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP; Faculdade de Medicina Veterinária, UNICEP; Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE).

E-mail do orientador: carolina.chagas@embrapa.br

A seleção de animais resistentes à hemonose ovina é uma medida alternativa de controle cada vez mais estudada, tendo em vista o impacto desse parasita nos sistemas de produção e a elevada ocorrência de resistência múltipla aos anti-helmínticos atualmente disponíveis. Para a referida seleção, o conhecimento dos mecanismos imunológicos que conferem a resistência aos hospedeiros é fundamental. Em vista da escassez de anticorpos monoclonais específicos comercialmente disponíveis para imunomediadores de ovinos, as análises de expressão gênica por RT-qPCR merecem destaque. Contudo, para correta interpretação dos resultados, a escolha de um gene de referência adequado é essencial. No presente estudo, foi avaliada a estabilidade de cinco candidatos a gene de referência (GAPDH, G6PDH, YWHAZ, ACTB e B2M) em abomaso (regiões fúndica e pilórica) e linfonodos abomasais de cordeiros Morada Nova resistentes ($n = 5$) e susceptíveis ($n = 5$) à infecção por *Haemonchus contortus*, selecionados dentre 150 cordeiros fenotipados após dois desafios parasitários com 4000 L3. Esses extremos de infecção foram submetidos à terceira infecção artificial e abatidos 7 dias após para colheita das amostras teciduais. Os testes de estabilidade foram conduzidos em três programas computacionais (Bestkeeper, Normfinder e RefFinder). A média geométrica entre GAPDH e YWHAZ foi a mais estável para abomaso (região fúndica) e linfonodos abomasais, enquanto YWHAZ isolado foi o mais estável para a região pilórica do abomaso, sendo esses os genes com menor variação intra e entre grupos e maior estabilidade, considerando os três programas. G6PDH, por sua vez, apresentou menor estabilidade em todos os tecidos, enquanto a posição de ACTB e B2M foi intermediária. Pequenas variações nas metodologias e resultados obtidos pelos programas computacionais indicam a importância da utilização de mais de um deles para seleção de genes de referência em determinados tecidos e condições experimentais. Por fim, análises de expressão relativa de um gene-alvo previamente selecionado, TNF α , evidenciaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos apenas quando normalizado pelo gene mais estável, na região fúndica do abomaso. Tal diferença não foi observada quando a normalização foi feita pelos outros genes candidatos, demonstrando que a utilização de gene de referência inadequado impacta significativamente a interpretação dos dados de quantificação relativa da expressão gênica por RT-qPCR.

Palavras-chave: gene de referência; RT-qPCR; teste de estabilidade

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESPOSTA A *Haemonchus contortus* EM OVINOS EM SISTEMAS NUTRICIONAIS *ad libitum* e ALIMENTAÇÃO RESTRITA

MANGABEIRA E SILVA, I.S.; SILVA, C.G.; CANAVESSI, Á. M. O; CESAR, A. S.M.; MEDEIROS, H.R; COUTINHO, L.L.; ZAROS, L.G

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN; Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP.

E-mail do orientador: lgzaros@gmail.com

Dentre os principais problemas sanitários enfrentados pelos produtores de ovinos, a presença de nematoides gastrointestinais em sistemas de produção se destacam, gerando perdas econômicas significativas para os produtores. Muitas vezes, uma maior susceptibilidade desses animais aos parasitos se dá pela deficiência nutricional enfrentada pelos animais em sistemas de criação do Nordeste. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo verificar a influência da alimentação em ovinos infectados por *Haemonchus contortus*. Para isso, 48 borregas mestiças $\frac{1}{2}$ Santa Inês e $\frac{1}{2}$ Dorper com idade média de 4 meses e livres de infecção foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: *Ad libitum* infectado por *H. contortus* (AdI; $n=12$), *Ad libitum* não infectado (AdNI; $n=12$), alimentação restrita infectado por *H. contortus* (RI; $n=12$) e alimentação restrita não infectado (RNI; $n=12$). Todas as borregas receberam a mesma dieta, a qual consistia principalmente de 70% de milho moído e 10% de feno de coastcross (90% matéria seca e 13% de proteína bruta), com alteração somente na quantidade fornecida. A média de ingestão diária dos animais dos grupos AdI e AdNI era de 3,8% do peso vivo (PV), enquanto que nos grupos RI e RNI, a ingestão diária era de 2% PV. Desses animais, 17 cordeiros foram selecionados para análise do transcriptoma da mucosa abomasal usando a tecnologia RNA-Seq. A preparação de bibliotecas, sequenciamento do genoma e análises de sequências foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal - ESALQ. A média de leituras por amostra antes e depois da filtragem foi de 12,522.573 milhões e 9.626.457 milhões, respectivamente, e a média da taxa de mapeamento das leituras filtradas em relação à montagem do genoma de referência Oar_v4.0 foi de 79,66%. Treze genes foram classificados como diferencialmente expressos ($FDR < 0,05$), no qual 12 foram mais expressos nos animais que estavam contidos na alimentação *ad libitum* e apenas 1 gene foi mais expresso nos animais que estavam na alimentação restrita. Dentre eles, 5 genes estão relacionados positivamente com a resposta a *H. contortus*, sendo eles o *CD248* (*tumor endothelial marker 1/endothelialin*), *THY-1* (*Thy-1 cell surface antigen*), *PI16* (*peptidase Inhibitor 16*) e *TCN1* (*transcobalamin*). Assim, animais infectados que estavam no grupo de tratamento com dieta *ad libitum*, apresentaram maior número de genes diferencialmente expressos relacionado com o sistema imunológico contra *H. contortus* quando comparados com os animais infectados que estavam contidos na alimentação restrita. Dentre os genes diferencialmente expressos, apenas o *FGSBPI* foi mais expresso nos animais com dieta restrita, mostrando assim uma resposta mais eficiente em animais com alimentação *ad libitum*.

Palavras-chave: Endoparasitas; Resposta imune; RNA-Seq