



### Identificação de mecanismos envolvidos na resposta de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus*<sup>1</sup>

Poliana Fernanda Giachetto<sup>2</sup>, Vagner Katsumi Okura<sup>3</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>4</sup>, Ana Karina Dias Salman<sup>5</sup>, Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte de projeto financiado pela Embrapa e pelo CNPq (477705/2008-1)

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária – CNPTIA, Campinas, SP. E-mail: poliana@cnptia.embrapa.br

<sup>3</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – CBMEG/UNICAMP, Campinas, SP. Bolsista da Embrapa Informática Agropecuária. e-mail: vagnerko@cnptia.embrapa.br

<sup>4</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos, SP. e-mail: adriana.ibelli@gmail.com

<sup>5</sup>Pesquisadora da Embrapa Rondônia – CPAFRO, Porto Velho, RO. E-mail: aksalman@cpafro.embrapa.br

<sup>6</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE, São Carlos, SP. E-mail: luciana@cppse.embrapa.br

**Resumo:** O objetivo desse trabalho foi identificar grupos de genes envolvidos na resposta de bovinos à infestação artificial com o carrapato *Rhipicephalus microplus*, por meio da construção de redes gênicas. Dados de um experimento com microarranjos, provenientes da hibridização de amostras de pele de fêmeas cruzadas Senepol x Nelore, Angus x Nelore e Nelore, obtidas antes (A) e (D) após a infestação artificial com o carrapato, foram analisados por meio de uma metodologia de construção de redes baseada em co-expressão gênica (WGCNA). Os dados foram pré-processados usando os pacotes affy e gcrma do R/Bioconductor e as redes de co-expressão identificadas separadamente para cada grupo (A e D), pelo pacote R/WGCNA. As redes foram comparadas e os módulos não conservados entre os dois grupos foram identificados a partir de um teste de correlação dos valores de conectividade. Nossa análise identificou 8 módulos de genes co-expressos, sendo um deles (6) não conservado entre os grupos. O módulo 6 (n=85 genes) mostrou-se enriquecido para o processo biológico Proteólise, sugerindo o envolvimento desse processo e dos genes identificados (ADAMTS4, CASP4, C3, CFB, PRSS22 e SPCS3) na resposta dos animais à infestação.

**Palavras-chave:** expressão gênica, microarranjos, redes gênicas

### Identification of mechanisms involved in cattle response to *Rhipicephalus microplus* tick

**Abstract:** The aim of this study was to identify groups of genes involved in cattle response to *Rhipicephalus microplus* tick, through gene network building. Microarray gene expression data from the hybridization of skin samples from bovine females Senepol x Nelore, Angus x Nelore and Nelore, obtained before (A) and after (D) artificial tick infestation, were analyzed using a network building methodology based on gene co-expression (WGCNA). Data were preprocessed using affy and gcrma R/Bioconductor packages and gene co-expression networks identified separately for each group (A and D), by the R/WGCNA package. Gene networks were compared between the two groups and non-conserved modules were uncovered from a correlation test of the connectivity values. Our analysis identified 8 modules of co-expressed genes, one of them (6) non-conserved between the groups. The module 6 (n=85 genes) was enriched for the biological process Proteolysis, suggesting the involvement of this process and identified genes (ADAMTS4, CASP4, C3, CFB, and PRSS22 SPCS3) on animal response to cattle-tick infestation.

**Keywords:** gene expression, gene network, microarray

### Introdução

Nos países tropicais, as perdas causadas pela infestação de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* têm levado a um grande impacto nos sistemas de produção animal, em função da redução no ganho de peso e conversão alimentar, juntamente com as doenças transmitidas pelo parasita. De maneira geral, animais *Bos taurus indicus* são menos susceptíveis à infestação do que animais *Bos*



## 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

*O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios*

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



*taurus taurus*, mas as bases moleculares que caracterizam essa diferença, assim como todos os mecanismos que permeiam a resposta à infestação, independente do genótipo, ainda não são completamente entendidos. O estudo da expressão gênica é uma abordagem que permite relacionar as diferenças nos níveis de expressão dos genes às diferenças fenotípicas observadas entre as amostras comparadas. A tecnologia dos microarranjos, largamente utilizada nesses estudos, nos permite, além da tradicional identificação dos genes diferencialmente expressos entre amostras contrastantes, identificar grupos de genes altamente relacionados (co-expressos). Esse último enfoque pode contribuir de maneira mais efetiva para o entendimento de características fenotípicas complexas, as quais são poligênicas por natureza. A partir da identificação de genes co-expressos, redes gênicas são construídas e grupos de genes mais fortemente conectados, ou módulos, podem ser relacionados a vias específicas. Outra estratégia consiste em se descobrir diferenças na composição dos módulos e na conectividade dos genes entre diferentes conjuntos de dados, o que tem se mostrado bastante útil na descoberta de mecanismos moleculares alterados entre amostras fenotipicamente distintas (Fuller et al., 2007), e que poderá trazer informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares que permeiam a resistência de bovinos ao carrapato. Assim, comparando dados de microarranjos de bovinos antes e após a infestação artificial com o carrapato, nós utilizamos uma análise baseada em co-expressão diferencial na busca por mecanismos envolvidos na resposta do animal ao *R. microplus*.

### Material e Métodos

Os dados de microarranjos utilizados na identificação das redes de co-expressão gênica foram gerados a partir do experimento descrito em Ibelli et al. (2010). Resumidamente, fêmeas bovinas cruzadas Senepol x Nelore (n=7), Angus x Nelore (n=7) e Nelore (n=7), livres de carrapato, foram submetidas a 4 infestações artificiais consecutivas, cada uma com cerca de 20.000 larvas de *R. microplus*. Amostras de pele foram coletadas antes (grupo A) da primeira e 24 horas após (grupo D) a última infestação, e usadas para extração de RNA total. As amostras foram submetidas à análise de expressão gênica utilizando a plataforma de microarranjos GeneChip® Bovine Genome Array (Affymetrix). Os dados foram pré-processados usando os pacotes affy e gcrma do R/Bioconductor e um filtro foi aplicado, que resultou na utilização somente dos transcritos presentes em todas as amostras. As redes de co-expressão gênica foram identificadas separadamente para cada grupo (A e D), pelo pacote R/WGCNA (Zhang & Horvath, 2005). A metodologia WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) considera as redes de co-expressão como grafos ponderados, não direcionados. Dentro dos grafos os nós correspondem aos genes e as conexões entre os genes são determinadas pela correlação entre eles, obtida ao longo dos perfis de expressão das amostras. A comparação entre as redes identificadas em A e D foi feita com base na correlação da conectividade (força de conexão) dos genes e da estrutura (genes componentes) dos módulos, de acordo com Fuller et al. (2007). Uma vez construídas as redes, os módulos foram submetidos à análise de enriquecimento funcional por meio da ferramenta DAVID (Huang et al., 2009), que exhibe os termos mais freqüentes presentes em uma lista de genes, baseado em ontologia gênica, possibilitando a identificação dos processos biológicos em evidência.

### Resultados e Discussão

De um total de 23.000 transcritos bovinos presentes no microarranjo, 3.467 atenderam aos critérios adotados na filtragem dos dados e foram utilizados na identificação das redes gênicas. Nossa análise identificou 8 módulos de genes co-expressos ao longo das amostras A e D: 1 (n=66 genes), 2 (n=407 genes), 3 (n=163 genes), 4 (n=105 genes), 5 (n=42 genes), 6 (n=85 genes), 7 (n=1315 genes) e 8 (n=121 genes). A comparação da estrutura e conectividade dos módulos identificou o módulo 6 como não conservado entre A e D. Um fato interessante foi que 44% dos genes presentes nesse módulo foram diferencialmente expressos, segundo resultados de Ibelli et al. (2010), sendo o módulo com a maior porcentagem de genes diferencialmente expressos. A análise de enriquecimento funcional do módulo 6 (Tabela 1) identificou o processo biológico Proteólise como o mais representativo dos genes componentes do módulo, sugerindo que esse processo pode ter sido alterado por ocasião da infestação dos bovinos.



Tabela 1 - Análise de enriquecimento funcional do módulo 6 (n=85 genes), baseada em termos de ontologia gênica (GO)

Categoria	Termo	Genes (n <sup>o</sup> )	Genes (%) <sup>d</sup>	p value
GOTERM_BP_ALL <sup>a</sup>	Proteólise	6	14,29	1,3X10 <sup>-2</sup>
GOTERM_CC_ALL <sup>b</sup>	Região extracelular	8	19,05	2,2x10 <sup>-3</sup>
GOTERM_MF_ALL <sup>c</sup>	Atividade endopeptidase	4	9,52	4,1x10 <sup>-2</sup>

Categorias de ontologia gênica representadas: <sup>a</sup>Processo Biológico, <sup>b</sup>Componente celular, <sup>c</sup>Função molecular. <sup>d</sup> % de genes presentes em relação ao total de genes utilizados na análise de enriquecimento funcional (n=42)

O processo de proteólise ocorre em vias metabólicas envolvidas em várias funções, incluindo mecanismos de defesa, por estarem associadas ao reconhecimento e apresentação de antígenos, ativação de plasminogênio e regulação do sistema complemento. Nosso trabalho evidenciou genes envolvidos nesse processo biológico como alterados em bovinos após a infestação com o carrapato. Em Ibelli et al. (2010), os genes em questão (ADAMTS4, CASP4, C3, CFB, PRSS22 e SPCS3) mostraram-se ativados em bovinos, em resposta a infestação pelo *R. microplus*. C3 e CFB já foram relacionados à ativação do sistema complemento, um dos mecanismos de defesa primários a infecções e injúrias, ativando a cascata do complemento, que pode culminar na não fixação e expulsão do carrapato no hospedeiro. SPCS3 e PRSS22 atuam na regulação da coagulação sanguínea, impedindo a alimentação e manutenção dos carrapatos, mecanismo esse que parece ser bastante importante na defesa do hospedeiro, uma vez que elícita no parasita a produção de inibidores de serino proteases (SERPINAS) na saliva, quando estão parasitando o bovino (Mulenga et al. 2009). Por outro lado, recentemente, Papareddy et al. (2010) descreveram pela primeira vez, *in vitro*, que a proteólise na cascata de coagulação sanguínea leva ao surgimento de peptídeos de defesa, envolvidos na resposta à invasão microbiana e à injúria.

#### Conclusões

O processo de Proteólise e os genes ADAMTS4, CASP4, C3, CFB, PRSS22 e SPCS3 estão envolvidos na resposta de bovinos à infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Trabalhos futuros, buscando o papel desses genes ou processo biológico em bovinos de diferentes grupos genéticos poderão trazer informações importantes acerca dos mecanismos moleculares que permeiam a resistência de bovinos ao parasita.

#### Literatura citada

- FULLER, T.F.; GHAZALPOUR, A.; ATHEN, J.E. et al. Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight. **Mammalian Genome**, v.18, p.463-472, 2007.
- HUANG, D.W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature Protocols**, v.4, n.1, p.44-57, 2009.
- IBELLI, A.M.G.; CARDOSO, F.F.; GIACHETTO, P.F. et al. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, XVI, 2010, Campo Grande. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2010. (CD-ROM).
- MULENGA, A.; KHUMTHONG, R.; CHALAIRE, K.C. Ixodes scapularis tick serine protease inhibitor (serpin) gene family, annotation and transcriptional analysis. **BMC Genomics**, v.10, n.217, 2009. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689274>> Acesso em 20/04/2011.
- PAPAREDDY, P.; RYDENGARD, V.; PASUPULETI, M. et al. Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. **PLoS Pathogens**, v.6, n.4, 2010. Disponível em <<http://www.plospathogens.org>> Acesso em 19/04/2011.
- ZHANG, B.; HORVATH, S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v.4, n.1, p.1-37, 2005.