



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
ConsCiência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRAS DE RNA DE *Haemonchus contortus* DE CAPRINOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS.

Autor(es): Edilson Pereira de Freitas¹ ; Jomar Patrício Monteiro²

¹Estudante do Curso de Mestrado em Zootecnia - PPGZ – UEVA; E-mail: edilson.medvet@gmail.com, ²Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –SANIDADE ANIMAL – EMBRAPA. Email: jomar.monteiro@embrapa.br

Resumo: A produção de pequenos ruminantes é uma atividade de grande importância para o Brasil, porém estes animais podem ser acometidos por várias doenças, principalmente infecções por nematoides gastrintestinais como *Haemonchus contortus*, que causa grande impacto negativo na produtividade dos animais infectados. O controle das infecções é feito através de anti-helmínticos levando à seleção de parasitas resistentes tornando-o muitas vezes ineficaz. O mercado consumidor passou a exigir maior controle quanto à qualidade e aos impactos ambientais associados aos produtos que consome havendo a necessidade de encontrar medidas de controle mais sustentáveis. Foram sequenciadas amostras de RNA de *H. contortus* recuperados de hospedeiros em diferentes condições de parasitismo. O sequenciamento gerou dois arquivos de sequências pareadas para cada amostra, sendo cada sequência com 160 pares de bases (pb) de comprimento, com um total de 718.335.358 sequências e média de sequência por amostras de 39.907.519, o conteúdo médio de GC foi de 47,5%. Conclui-se que foi possível sequenciar com qualidade amostras de RNA de *H. contortus* provenientes de hospedeiros resistentes e suscetíveis para serem determinados os genes que estão relacionados a capacidade de estabelecimento da infecção nos diferentes hospedeiros podendo ser utilizados em futuros estudos visando o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle deste parasita.

Palavras-Chave: hospedeiro; parasita; sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes é uma atividade de grande importância para o Brasil, porém estes animais podem ser acometidos por várias doenças, merecendo destaque as infecções por nematoides gastrintestinais como *Haemonchus contortus*, parasita hematófago que pode causar grande impacto negativo na produtividade dos animais infectados (VIEIRA et al., 2014). Caprinos e ovinos apresentam capacidade de resistência variada ao parasitismo que, em geral, tem correlação negativa com características de produção (NUNES et al., 2007). O controle das infecções é feito através da aplicação de anti-helmínticos levando à seleção de parasitas resistentes. Atualmente, a resistência aos anti-helmínticos é reconhecida como um problema global gerando grande demanda por métodos alternativos de controle destas parasitoses. Além disso, o mercado consumidor passou a exigir maior controle quanto à qualidade, origem, manejo e impactos ambientais associados aos produtos que consome (KNOX et al 2006). O objetivo deste trabalho foi sequenciar amostras de RNA de *H. contortus* provenientes de infecções de pequenos ruminantes resistentes e susceptíveis para determinação de genes diferencialmente expressos que poderão ser utilizados em futuros estudos visando o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle deste parasita.



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

METODOLOGIA

Trinta e dois caprinos pertencentes a três diferentes raças, sendo 20 Moxotós, 5 Saanens e 7 Anglo-nubianos, machos com idade entre 4 a 6 meses foram vermifugados com três anti-helmínticos de grupos químicos distintos visando livrá-los de infecção. Uma vez realizado este procedimento os animais foram infectados experimentalmente a cada 15 dias com 1.000 larvas infectantes, visando estabelecer seguramente a infecção nos animais aumentou-se o número de larvas por animal para 3.000 nos últimos dois meses. A duração do período de infecção experimental foi de quatro meses e durante este intervalo de tempo os animais foram mantidos em baias para minimizar a variação ambiental, receberam concentrado à base de milho e soja, feno e água *ad libitum* e ainda foram monitorados semanalmente através da contagem de ovos por grama de fezes até que se estabelecesse a infecção. Ao atingir tal objetivo os animais foram abatidos e seus parasitas recuperados diretamente do abomaso para contagem visando discriminar os diferentes níveis de resistência dos animais frente à infecção parasitária (MCEWAN, 1994). Machos e fêmeas foram identificados, separados e quantificados utilizando microscópio óptico. O RNA total de pools de 20 machos de *H. contortus* recuperados dos animais abatidos foi extraído por maceração mecânica utilizando esferas de sílica e Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total extraídas foram quantificadas por espectrofotometria e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para checar a integridade das bandas de RNA ribossômico 28 S e 18 S. A integridade do RNA também foi determinada utilizando 2100 Bioanalyzer (Agilent). Finalmente as amostras foram submetidas para RNA-seq em plataforma HiScan SQ (Illumina) no Laboratório Roy J. Carver Biotechnology Center (University of Illinois at Urbana-Champaign) Estados Unidos. Os dados provenientes do sequenciamento foram armazenados e estão sendo analisados no Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa (LMB, Embrapa Informática Agropecuária). A análise de qualidade das leituras provenientes do sequenciamento foi realizada utilizando a ferramenta *FastQC* da plataforma Galaxy, sendo avaliadas pelo escore Phred, método de avaliação logarítmica que analisa a precisão do sequenciamento. (PATEL & JAIN, 2012). Toda a metodologia contida neste trabalho obedeceu às normas do comitê de ética da Embrapa Caprinos e Ovinos/UEVA (protocolo de aprovação 026.12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os animais selecionados e a quantidade de parasitas recuperados, podendo-se observar que os animais caracterizados como suscetíveis tiveram um número de parasitas quase dez vezes superior ao dos animais resistentes, assim como os animais da raça Saanen, que foram utilizados como referência para susceptibilidade. A extração de RNA de *Haemonchus contortus* recuperados foi possível gerando resultados satisfatórios tanto em qualidade como em quantidade de RNA por amostra extraída, como mostra a tabela 2. A relação 260/280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações das amostras de RNA extraídas. As figuras 1 e 2 mostram o resultado da eletroforese em gel de agarose, em que as bandas de RNA ribossômicas, em sua maioria, se apresentaram íntegras, únicas e com pouco rastro mostrando que o RNA não estava degradado e poderia ser utilizado para o sequenciamento. Dentre as amostras corridas no gel de agarose, apenas 9 foram selecionadas para envio e sequenciamento, sendo 3 para determinação de resistência (em verde, 13, 22 e 24), 3 para suscetibilidade (em vermelho, 11, 16 e 20) e 3 para referência de suscetibilidade (em azul, 2, 6 e 7). O sequenciamento gerou dois arquivos de sequências pareadas para cada amostra, sendo cada sequência com 160 pares de bases (pb) de comprimento. Foi obtido o sequenciamento de um total de 718.335.358 sequências com média de 39.907.519 sequência por amostras. Em relação a qualidade das sequências, as mesmas tiveram em grande parte um escore phred acima de 20, isto significa que sua precisão é maior que 99%. Sequências com escore inferior a 20 tem uma menor precisão e portanto maior probabilidade de



erro durante o sequenciamento, como demonstrado no gráfico 1, referente a uma das sequências obtidas.

GRÁFICOS

Tabela 1: Animais selecionados com base na contagem de parasitas adultos.

Resistentes		Suscetíveis		Controle (Saanen)	
Animal/Brinco	Total de parasitas	Animal/Brinco	Total de parasitas	Animal/Brinco	Total de parasitas
404	163	415	1653	160	3045
420	281	434	1803	161	2539
437	286	436	2487	162	1949

Tabela 2: Quantificação de RNA total extraído de pools de 20 parasitas por animal sacrificado.

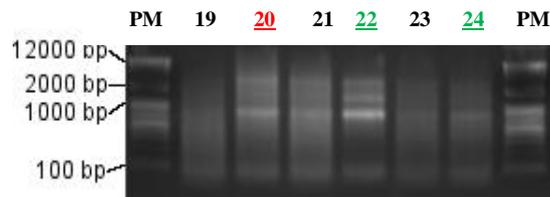
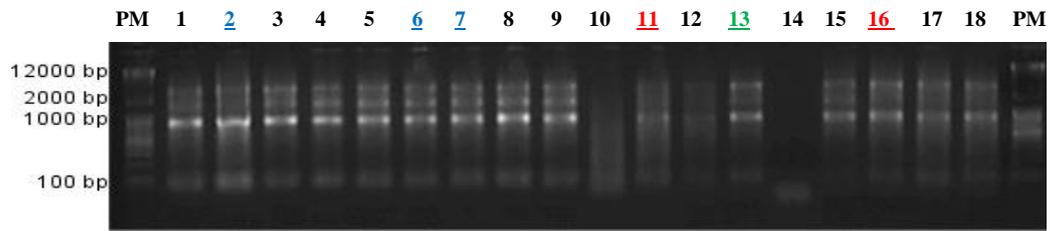
Resistentes			Suscetíveis			Controle (S)		
Animal /Brinco	RNA [ng/μl]	Razão 260/280	Animal /Brinco	RNA [ng/μl]	Razão 260/280	Animal / Brinco	RNA [ng/μl]	Razão 260/280
404	256	2,0	415	278	2,0	160	688	2,3
420	304	2,2	434	398	2,0	161	336	2,0
437	222	2,3	436	314	2,1	162	400	2,0



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior



Figuras 1 e 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em transiluminador ultra-violeta. Amostras denominadas PM correspondem ao Marcador de tamanho molecular de 100 bp (Invitrogen), 1 a 24. amostras de RNA total de *H. contortus*.

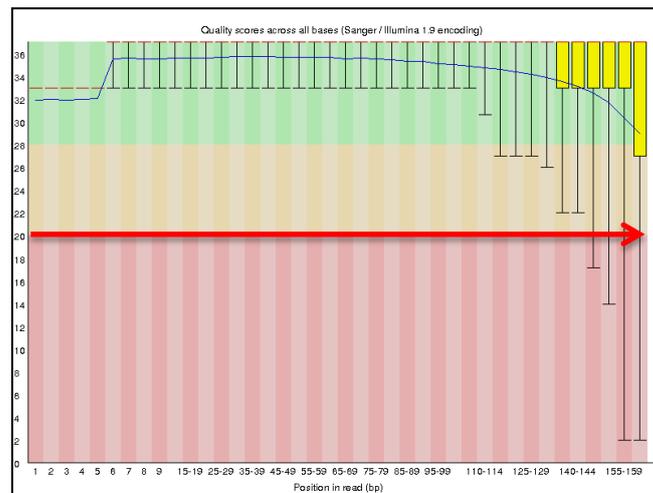


Gráfico 1: Análise de qualidade de uma amostra sequenciada, mostrando que grande parte das sequências tiveram um score phred superior a 20.



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível sequenciar com qualidade amostras de RNA de *H. contortus* provenientes de hospedeiros resistentes e suscetíveis para serem determinados os genes que estão relacionados a capacidade de estabelecimento da infecção nos diferentes hospedeiros, estes genes poderão ser utilizados em futuros estudos visando o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle deste parasita.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP pelo financiamento do projeto, à CAPES pela concessão de uma bolsa de mestrado e à EMBRAPA pela disponibilização de toda a estrutura de laboratórios e equipamentos disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol*, v. 139, n. 4, p. 385-93, Jul 31 2006.

MCEWAN, J. C. *Worm FEC - Breeding sheep resistant to roundworm infection: Breeders' Manual*. Mosgiel: *AgResearch*, 1994.

NUNES, A. P. et al. Estudo da variabilidade genética de resistência a nematódeos gastrintestinais em ovinos da raça Corriedale com marcadores RAPD. *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v.13, n.1, p.25-33, jan-mar, 2007.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLOS One*, v. 7, n. 2. 2012.

VIEIRA, V.D.; et al. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, p. 355–361, 2014.