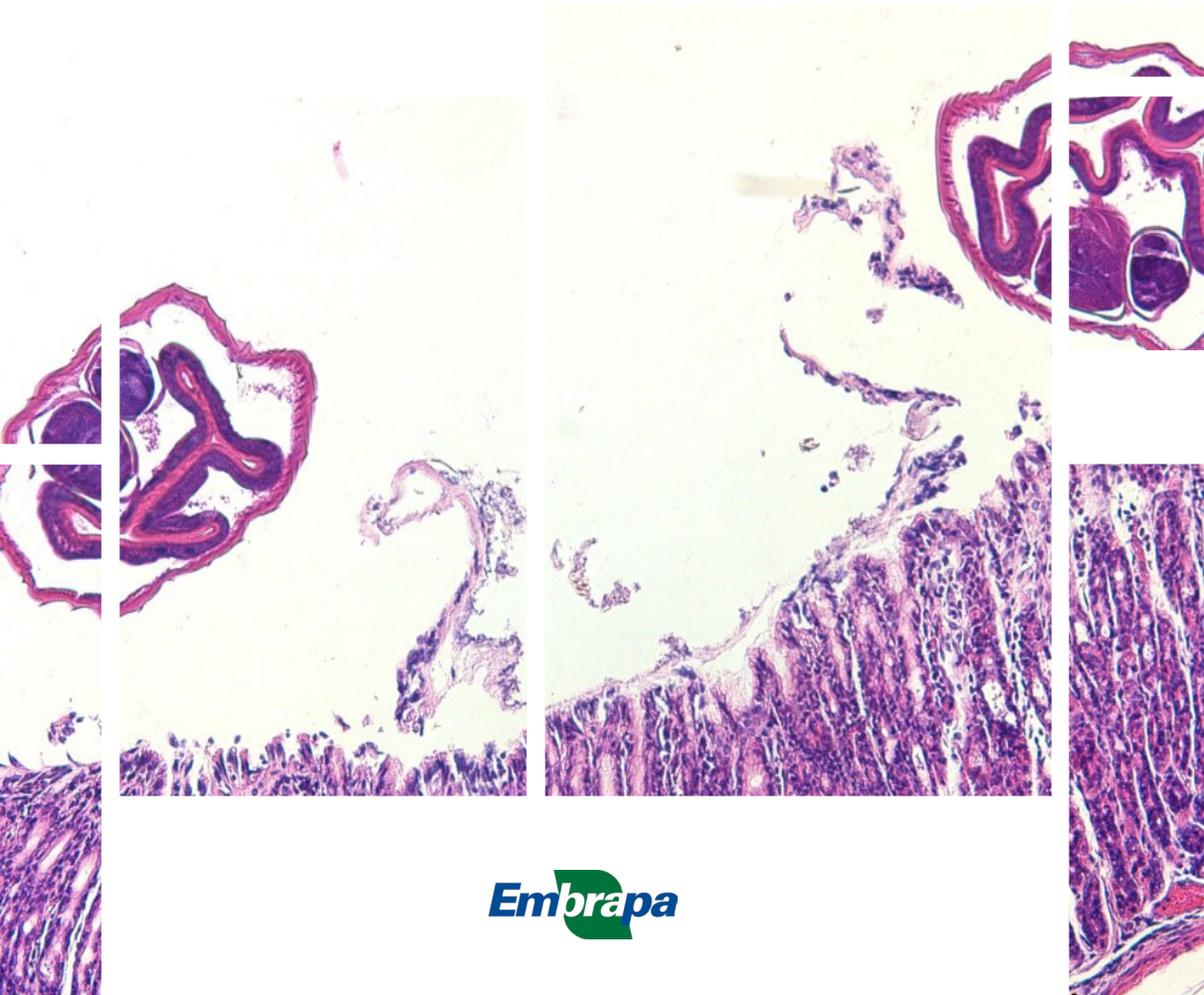


Transcriptoma abomasal comparativo de ovinos da raça Morada Nova com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
54**

Transcriptoma abomasal comparativo de ovinos
da raça Morada Nova com fenótipos divergentes
de resistência a *Haemonchus contortus*

*Cintia Hiromi Okino
Adriana Mércia Guaratini Ibelli
Simone Cristina Méo Niciura
Magda Vieira Benavides
Ana Carolina de Souza Chagas*

**Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2022**

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Wasghinton Luiz, km 234
13560-970, São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
<https://www.embrapa.br/pecuaria-sudeste>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Pecuária Sudeste**

Presidente

André Luiz Monteiro Novo

Secretário-Executivo

Luiz Francisco Zafalon

Membros

Gisele Rosso

Mara Angélica Pedrochi

Maria Cristina Campanelli Brito

Silvia Helena Picirillo Sanchez

Revisão de texto

Gisele Rosso

Normalização bibliográfica

Mara Angélica Pedrochi

Editoração eletrônica

Maria Cristina Campanelli Brito

Foto da capa

Paula Roberta Giaretta

1ª edição

Publicação digital (PDF): 2022

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Okino, Cintia Hiromi.

Transcriptoma abomasal comparativo de ovinos da raça Morada Nova
com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus* / Cintia
Hiromi Okino ... [et al]. -- São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2022.

PDF (34 p.) : il. color. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento
/ Embrapa Pecuária Sudeste, ISSN 1981-2078 ; 54).

1. Nematóide. 2. *Haemonchus Contortus*. 3. Ovino. I. Okino,
C. H. II. Ibelli, A. M. G. III. Niciura, S. C. M. IV. Benavides,
M. V. B. V. Chagas, A. C. de S. VI. Título. VII. Série.

CDD 616.07

Mara Angélica Pedrochi (CRB-8/6556)

© Embrapa, 2022

Sumário

Introdução.....	8
Material e métodos.....	11
Animais experimentais e manejo animal	11
Seleção dos extremos de resistência à infecção por <i>H. contortus</i>	11
Análise de Transcriptoma.....	13
Extração de RNA.....	13
Preparo de bibliotecas de cDNA, sequenciamento de RNA e análise de transcriptoma.....	13
Validação da expressão diferencial por RT-qPCR.....	14
Resultados e Discussão	17
Avaliação de qualidade e integridade de RNA.....	17
Sequenciamento de RNA e análise de transcriptoma	19
Validação dos resultados de RNAseq	27
Conclusões.....	31
Referências	32

Transcriptoma abomasal comparativo de ovinos da raça Morada Nova com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus*

Cintia Hiromi Okino¹

Adriana Mércia Guaratini Ibelli²

Simone Cristina Méo Niciura³

Magda Vieira Benavides⁴

Ana Carolina de Souza Chagas⁵

Resumo - O presente estudo teve como objetivo comparar o transcriptoma abomasal de ovinos da raça Morada Nova com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus*. Para tanto, 287 cordeiros foram submetidos a dois desafios parasitários experimentais e monitorados quanto ao ganho de peso, ao volume globular e à contagem de ovos por grama de fezes. Após análise de dados, foram selecionados 10 animais de cada extremo de fenótipo de resistência parasitária, sendo que metade desses animais foi submetida ao sequenciamento de RNA (RNAseq) da mucosa abomasal. Genes diferencialmente expressos (DE) relacionados às respostas imunes e outros processos biológicos foram observados entre os grupos extremos de resistência parasitária por RNAseq baseando-se nos três genomas ovinos disponíveis nas bases de dados públicas (NCBI Oar 2.0 – 21 genes DE, Ensembl Oar 1.0 – 11 genes DE e Ensembl Texel 3.1 – 14 genes DE). No entanto apenas cinco genes DE (*B3GNT3*, *CLCA1*, *TFF3*, *PKLR* e *SELP*) foram comuns aos três genomas. Para a validação dos resultados de RNAseq por RT-qPCR foram desenhados primers para 14 genes DE, para, no mínimo, duas regiões gênicas em éxons distintos por gene. Entretanto, só houve amplificação específica para oito genes, e

1 Cintia Hiromi Okino, Médica Veterinária, Doutora em Patologia Animal, analista da Embrapa Pecuária Sudeste. cintia.okino@embrapa.br;

2 Adriana Mércia Guaratini Ibelli, Bióloga, Doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, analista da Embrapa Suínos e Aves;

3 Simone Cristina Méo Niciura, Médica Veterinária, Doutora em Reprodução Animal, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste;

4 Magda Vieira Benavides, Zootecnista, Doutora em "Wool Science", pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul;

5 Ana Carolina de Souza Chagas, Bióloga, Doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste.

apenas um gene apresentou concordância com os resultados de RNAseq. Concluiu-se que a validação por RT-qPCR não foi possível, provavelmente por dois motivos principais: 1) baixa quantidade de sequências atribuídas à maioria dos genes DE e 2) baixa qualidade de anotação do genoma ovino. Foram utilizadas três versões de referência atualizadas do genoma ovino que apresentam discordâncias quanto à montagem, localização e anotação dos genes. Isso impacta diretamente e negativamente nos resultados de validação por RT-qPCR, dado que, se as regiões gênicas (principalmente relacionadas à junção éxon-éxon) não estão bem anotadas, há dificuldades e falhas no desenho dos primers e na amplificação adequada.

Termos para indexação: Nematódeos gastrintestinais, transcriptômica, resiliência, cordeiros, RT-qPCR.

Comparative abomasal transcriptome in Morada Nova sheep breed with divergent phenotypes of resistance to *Haemonchus contortus*

Abstract - The present study aimed to compare the abomasal transcriptome of Morada Nova sheep with divergent phenotypes of resistance to *H. contortus*. Therefore, 287 lambs were submitted to two experimental parasitic challenges and monitored for weight gain, packed cell volume and eggs per gram of feces count. After data analysis, 10 animals were selected from each extreme of parasitic resistance, and half of these animals was submitted to RNA sequencing (RNAseq) of the abomasal mucosa. Differently expressed (DE) genes related to immune responses and other biological processes were observed between the extreme groups of parasitic resistance by RNAseq based on the three available sheep genomes (NCBI Oar 2.0 - 21 DE genes, Ensembl Oar 1.0 - 11 DE genes and Ensembl Texel 3.1 - 14 DE genes). However, only five DE genes (*B3GNT3*, *CLCA1*, *TFF3*, *PKLR* and *SELP*) were common to the three genomes. Designs of primers for RT-qPCR were carried out to validate the RNAseq results for 14 DE genes, targeting at least two gene regions in different exons per gene. Only eight genes resulted in specific amplification, and only one gene showed agreement with RNAseq results. It was concluded that validation by RT-qPCR was not possible, probably for two main reasons: 1) the low amount of sequences attributed to most DE genes and 2) the discordant quality of annotation of the sheep genome. Three updated reference versions of the genome were used, which present divergence regarding the assembly, location and annotation of the genes which may directly impact the results of validation by RT-qPCR, given that if the gene regions (mainly related to the exon-exon junctions) are not accurately annotated, there are difficulties in designing specific primers and achieving adequate amplification.

Index terms: Gastrointestinal nematodes, transcriptome, resilience, lamb, RT-qPCR.

Introdução

As infecções por nematódeos gastrintestinais (NGI) são consideradas o principal gargalo na ovinocultura, em especial nos países tropicais. As perdas econômicas são elevadas em decorrência da queda de produtividade (leite, carne ou lã), baixa fertilidade, mortalidade dos animais altamente infectados e elevados gastos com os antiparasitários (O'Connor; Kahn; Walkden-Brown, 2007), uma vez que os parasitos já desenvolveram resistência à maioria dos anti-helmínticos disponíveis no mercado e medicamentos mais avançados e mais onerosos são necessários para o controle. Dentre as espécies de NGI, *Haemonchus contortus* é a de maior importância clínica e econômica em nível mundial (Cavalcante et al., 2009; Chagas et al., 2013). Esse parasita é altamente prevalente nos rebanhos ovinos criados no Brasil, sendo a espécie patogênica predominante no Estado de São Paulo (Amarante, 2004; Toscano et al., 2019b).

A infecção por *H. contortus*, devido aos hábitos hematófagos do parasita, acarreta variados graus de anemia em ovinos, a depender do estado fisiológico do hospedeiro e da carga parasitária. Em infecções severas, especialmente em animais jovens e com nutrição inadequada, altas taxas de mortalidade podem ser observadas. Além dos efeitos diretos da infecção parasitária, outro grande obstáculo ao crescimento da ovinocultura é a resistência dos parasitas aos medicamentos, decorrente do uso inadequado, em tratamentos supressivos, com curtos intervalos, utilizando uma mesma classe de anti-helmíntico por longos períodos ou alternando rapidamente entre classes, tratamentos em sub-dosagem, dentre outros (Silvestre et al., 2002; Besier, 2006). Além do impacto da verminose e do aumento da resistência múltipla aos anti-helmínticos, existe uma crescente preocupação com os potenciais riscos de resíduos desses medicamentos no ambiente e em produtos de origem animal (Waller, 1999), evidenciando a importância da adoção de medidas alternativas para o controle da verminose. Nesse cenário, os anti-helmínticos são considerados recursos limitados e valiosos, utilizados apenas em situação de real necessidade e sempre em conjunto às medidas auxiliares (Howell et al., 2008).

Dessa forma, a seleção de ovinos resistentes e o desenvolvimento de medidas imunoproláticas constituem medidas muito interessantes, reduzindo a necessidade de vermifugações, mantendo a eficácia dos princípios ativos, facilitando o manejo dos rebanhos e reduzindo os custos do sistema de produção.

Morada Nova é uma raça de ovinos deslanados naturalizada e tradicionalmente criada do Nordeste brasileiro. De maneira geral, as raças deslanadas adaptadas às condições tropicais são bastante resistentes aos NGI, em comparação a raças exóticas, sendo uma característica de suma importância devido ao impacto desses parasitas na ovinocultura (Haehling et al., 2020; Haehling et al., 2021). Nesse contexto, a raça Morada Nova destaca-se frente às outras raças deslanadas. Tal fato evidencia a importância de estudos com raças naturalmente resistentes à verminose, com intuito de melhor explorar esse recurso tão valioso, de modo a promover maior interesse dos produtores.

Em estudo anterior, um rebanho composto por 287 cordeiros foi submetido a dois desafios parasitários com 4 mil larvas de terceiro estágio (L3) de *H. contortus* e fenotipados por meio de contagens de ovos por grama de fezes (OPG) semanais, aferições de hematócrito ou volume globular (VG) quinzenais e pesagens mensais. Esse esquema permitiu a estratificação do rebanho em três fenótipos distintos quanto à resistência parasitária: 20% resistentes (57 animais), 60% intermediários (173 animais) e 20% susceptíveis (57 animais). Dentre os 287 cordeiros avaliados, os 20 extremos de infecção por *H. contortus* (10 mais resistentes e 10 mais susceptíveis) foram selecionados e abatidos para avaliação da resposta imune local, em amostras da mucosa do abomaso e de linfonodos abomasais, quantificando-se 22 genes-alvo, previamente selecionados, por RT-qPCR. Foi detectada expressão diferencial entre os fenótipos para genes relacionados à resposta inata, resposta pró-inflamatória, resposta adaptativa perfil Th2 e ativação do sistema complemento (Toscano et al., 2019a; Toscano et al., 2020). Contudo, essa metodologia baseada na seleção de genes candidatos é, de certa forma, incompleta, pois depende de levantamento de bibliografia, relativamente escassa no assunto em questão. Além disso, há dificuldade em extrapolar resultados oriundos de estudos envolvendo diferentes raças ovinas, infectadas por diferentes parasitas e avaliados em diferentes tempos de infecção.

Nesse cenário, análises mais abrangentes constituem uma alternativa muito interessante, como a avaliação de transcriptoma comparativo por meio do sequenciamento de nova geração, incluindo o sequenciamento de RNA (RNAseq). A técnica permite sequenciar milhões de sequências em curto período, obtendo-se informações completas de todos os transcritos em um dado tecido, inclusive de genes desconhecidos, com elevada sensibilidade, quantificando genes diferencialmente expressos nos mais variados níveis de expressão. É muito mais versátil que outras metodologias, como os microarranjos de RNA, possibilitando a pesquisa de isoformas variantes e associação com QTLs (Mortazavi et al., 2008; Klopfleisch; Gruber, 2012). Essa metodologia tem sido utilizada em estudos recentes acerca da resistência a parasitas gastrintestinais em ovinos e caprinos. Os resultados são promissores, tendo sido encontrados centenas de genes diferencialmente expressos diretamente associados à característica, incluindo genes envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico, sistema complemento, ciclo celular, reparação tecidual, dentre outros (Guo et al., 2016; Bhuiyan et al., 2017; El-Ashram et al., 2017; El-Ashram et al., 2018).

Sendo assim, a análise de transcriptoma comparativo entre extremos de resistência à infecção por *H. contortus* em ovinos na raça Morada Nova pode ser utilizada para melhor elucidar os diferentes mecanismos diretamente relacionados, com uma potencial vantagem de detectar novos mediadores, os quais poderão ser testados e validados, inclusive, no melhoramento e desenvolvimento de medidas imunoproláticas para outras raças ovinas.

O presente estudo objetivou realizar análise de transcriptoma, por RNAseq, em abomaso de cordeiros Morada Nova fenotipicamente caracterizados como extremos de infecção por *H. contortus*, selecionar os genes avaliados por transcriptoma que possuam maior diferencial de expressão entre os extremos de infecção por *H. contortus* e desenvolver ensaios de RT-qPCR para a quantificação relativa da expressão dos genes selecionados por análise de transcriptoma.

Material e métodos

Animais experimentais e manejo animal

Os animais utilizados no presente estudo foram avaliados em projetos de pesquisa anteriores, financiados pela FAPESP (processos n. 2017/01626-1 e n. 2017/00373-2). As atividades realizadas atenderam ao projeto FAPESP processo n°. 2019/02929-3. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPPSE (protocolo nº 04/2017). Foram utilizados 287 cordeiros da raça Morada Nova (146 machos e 142 fêmeas), oriundos do cruzamento de 150 matrizes e sete reprodutores, obtidos em duas estações de monta. Os produtos da primeira estação de monta foram desmamados entre julho e agosto de 2017 e os da segunda estação, entre agosto e setembro de 2018. Na fase de aleitamento, os cordeiros foram mantidos junto das mães e submetidos ao manejo alimentar em sistema de ‘creep feeding’ a partir da primeira semana de vida até os 90 dias de idade, quando ocorreu o desmame. Os cordeiros desmamados foram mantidos em pastagem de capim Aruanã, grama estrela e braquiárinha, previamente roçada e submetida a 30 dias de descanso, para redução da contaminação ambiental com larvas infectantes. No período seco, os animais receberam suplementação alimentar de silagem de milho. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade.

Seleção dos extremos de resistência à infecção por *H. contortus*

Essa etapa foi desenvolvida entre os anos de 2017 e 2018, durante a execução dos projetos supracitados. Logo após o desmame, os 287 cordeiros foram tratados com monepantel 2,5% (Zolvix, Novartis), na dose de 2,5 mg/kg, para zerar a infecção natural por GIN (confirmada após duas contagens de OPG negativas). Após 15 dias, eles foram experimentalmente infectados com 4 mil L3 de *H. contortus* (isolado Echevarría 1991). Contagens de OPG semanais foram realizadas no 21º, 28º, 35º e 42º dia pós-infecção (dpi). Coproculturas (Roberts; O’Sullivan, 1950) foram realizadas no 42º dpi de ambos os desafios, confirmando infecção monoespecífica por *H. contortus*. Avaliações de volume globular (VG) quinzenais foram realizadas, no 14º, 28º

e 42º dpi (Figura 1). Os animais foram novamente tratados e, 15 dias após, submetidos a um segundo desafio parasitário, seguindo o esquema anterior. De acordo com as contagens de OPG, ganho de peso e valores de VG, os 20 cordeiros classificados como extremos de infecção por *H. contortus* (10 mais resistentes e 10 mais susceptíveis) foram submetidos a um terceiro desafio parasitário com 4 mil L3 de *H. contortus* e abatidos sete dias após para colheita de amostras da mucosa do abomaso, as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-180 °C) e armazenadas a -80 °C (Figura 1). Dentre esses extremos de infecção abatidos, amostras da região fúndica de cinco animais de cada um dos grupos fenotípicos foram selecionadas para a análise de transcriptoma por sequenciamento de RNA (RNAseq).

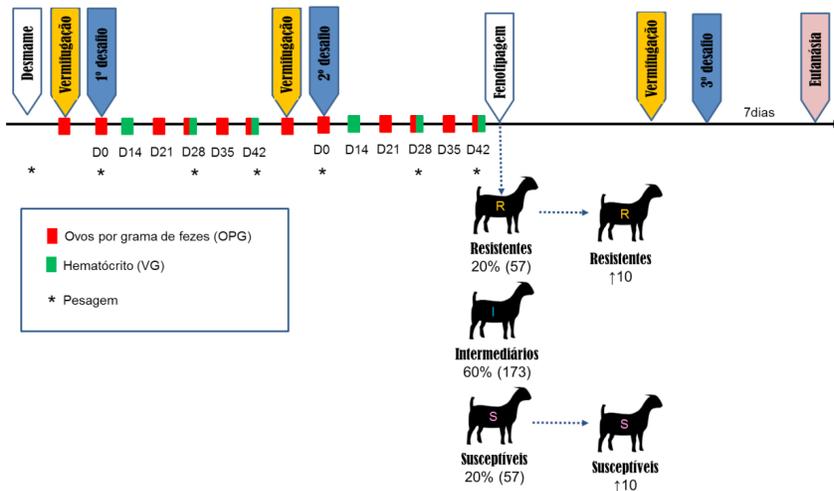


Figura 1. Delineamento experimental com animais experimentais utilizados, período de monitoramento, vermifugações e desafios parasitários.

Análise de Transcriptoma

Extração de RNA

O RNA total foi extraído com uso do QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, cat. 79306), com auxílio do homogeneizador de tecidos TissueRupter (Qiagen, cat. 9002710), seguida de purificação em coluna de sílica, utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, cat. 74106). A concentração (ng/ μ L) e pureza (razão A_{260}/A_{280}) do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). A integridade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose e com uso do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Preparo de bibliotecas de cDNA, sequenciamento de RNA e análise de transcriptoma

O protocolo de sequenciamento paired-end (2x 100 bp) foi usado e sequenciado em Illumina HiSeq 2500 (Illumina) pela NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP). A ferramenta Trimmomatic v 0.39 foi usada para controle de qualidade, removendo sequências de baixa qualidade (QPhred <20) ou curtas (<70bp) (Bolger; Lohse; Usadel, 2014). As sequências foram primeiramente alinhadas contra o genoma de referência de ovinos (GCF_016772045.1_ARC-UI_Ramb_v2.0, NCBI 104) usando o programa STAR aligner v. 2.9 (Dobin et al., 2013) e contadas com HTseq-count no STAR. Como as versões do genoma ovino apresentaram muitas diferenças de montagem, os alinhamentos foram re-analisados com o genoma de referência Oar_rambouillet_v1.0 (GCA_002742125.1) e com o genoma do Texel (Oar_v3.1 (GCA_000298735.1) disponível no Ensembl. Essas ferramentas foram implementadas e analisadas em pipeline baqcom (<https://github.com/hanielcedraz/baqcom>). Para análise da expressão gênica foi utilizado o pacote EdgeR (Robinson; McCarthy; Smyth, 2010) do R (R Foundation, 2021) para identificação de genes diferencialmente expressos (DE) entre os grupos resistente e susceptível. Os valores de p foram ajustados para testes múltiplos False Discovery Rate (FDR), e foram considerados DE quando $FDR \leq 0,05$. Aumento e diminuição da expressão foram indicados em escala logarítmica positiva e negativa, respectivamente, do grupo resistente

comparado com grupo susceptível. A lista de genes DE foi submetida à anotação funcional gênica usando o banco de dados DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Huang; Sherman; Lempicki, 2009) e a ferramenta ShinyGO v. 0.75 (Ge; Jung; Yao, 2020) utilizando dados de *Ovis aries* para verificar os processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC). Uma rede gênica foi construída usando o banco STRING para os genes DE anotados para até 10 interações de proteínas (Szkarczyk et al., 2021). Adicionalmente, uma pesquisa no QTLdb ovino foi realizada para verificar se os genes DE estavam em regiões de QTLs para infecção helmíntica.

Validação da expressão diferencial por RT-qPCR

Após análise dos resultados de RNAseq baseando-se no genoma Oar 2.0, foram selecionados os genes *PROTSET*, *GAL-14*, *TFF3*, *RFLNA*, *FCER2* e *SELP* para validação dos resultados por RT-qPCR. Esses genes foram avaliados tanto para os 10 animais extremos submetidos à RNAseq, quanto para os 20 animais extremos da população. No entanto, para três dos seis genes selecionados não houve amplificação específica e/ou de qualidade, e foi realizada nova seleção de genes para RT-qPCR para duas regiões diferentes do mRNA (em éxons diferentes) por gene, para quatro genes DE nos três genomas (*CLCA1*, *SELP*, *B3GNT3* e *PKLR*), mais quatro genes DE em pelo menos dois genomas (*ASGR1*, *FMNL3*, ribonuclease K6-like e *HES6*) e para outra região alvo de *GAL-14*. Para cada gene selecionado foram desenhados primers utilizando o programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com base em sequências depositadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) (Tabela 1). Para confirmação de especificidade dos ensaios de RT-qPCR desenvolvidos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1800 ng de RNA total (previamente tratado com DNase I (Promega)) com utilização do High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™, Cat. 4368814) e OligodT primers (Sigma), de acordo com o fabricante, em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). As reações foram conduzidas em termociclador CFX96 (Biorad), utilizando-se 20 ng de RNA transcrito, 0,3 µM de cada primer (forward e reverse) e kit Quantinova SYBR

Green PCR (Qiagen), para volume final de 10 μ L, em microplacas ópticas seladas com adesivos. O perfil térmico utilizado foi de: 95 °C – 2min, 40 ciclos de 95 °C- 5 s / 60 °C -10 s/leitura canal FAM/SYBR (para GAL-14 e TFF3 foi utilizada temperatura de 65 °C), seguido de melting de 65 °C a 95 °C com aquisições a cada 0,5 °C por 5 s. Para cada gene, foram incluídos os seguintes controles: controle negativo do qPCR (NTC – no template control), controle negativo de reagentes para tratamento com DNase e síntese de cDNA (NTC-RT) e RTminus (controle sem adição de enzima transcriptase reversa). A expressão de cada gene foi normalizada com base na média geométrica dos genes *GAPDH* e *YWHAZ*, de acordo com teste de estabilidade para gene de referência previamente realizado (Toscano et al., 2018). O nível de expressão gênica foi calculado de acordo com Livak; Schmittgen (2001), utilizando a amostra com menor expressão (maior valor de Cq) como calibrador.

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos dos primers delineados e testados por RT-qPCR durante a validação dos resultados de RNAseq, incluindo número de acesso no Genbank, tamanho do produto amplificado e localização (nucleotídeos e éxons).

Gene	Nome do primer	Nº de acesso	Primer Forward	Primer Reverse	Produto amplificado (bp)	exon boundary	Localização
Protein Set	PROTSET	XM_027971028.2	TGGTGATGCATCTTCAAAGTCC	TCTCTTCCTGCTGGCTTTATTC	100	intronless	810-909
Galectin-14	GAL-14	NM_001009251.1	CAGCCTCCCTACATAAAACCTTCTCT	CGAGGGTTGAAGTGGAAAGGCCAA	179	1/2-3	55-233
TFF3	TFF3	XM_004003361.4	CCATGGAGGCCGACAAACATT	CACTGGTTCCGCCGACAA	100	1/2	44-127
RFLNA	RFLNA	XM_004017315.5	CCGCTGCAATTCTGAGGTCAAG	GAAGATGATGGTGGTCTGCG	199	2/3	658-866
FCER2	FCER2	XM_012177964.4	AGCCCTGGAATATAGCAACTG	ATCATTCACATCCCCAGAGCCC	98	9/10	792-869
		XM_012177962.4					1047-1144
		XM_042250015.1					1213-1310
		XM_042250016.1					958-1055
SELP	SELP	NM_001009295.1	TGCGAAGGGGATCAACATTAG	ACTCACAGCAATGGCTTTTA	103	8/9	877-979
CLCA1	CLCA1	XM_004002156.5	AATTACTGGACAACGGAGCAGGT	TACCCTCTGAGAGCGCTGTGTG	142	11/12	1970-2111
CLCA1	CLCA1.b	XM_004002156.5	GACGGTATCAGCCCGCAGAAAT	ACACGGTGGAAAGAGATCAGGT	199	[12]H[13]	2105-2303
SELP	SELP.b	NM_001009295.1	GCTGGTTCACATGTCATGAGGG	GGCGAGATAGTCCGGACACTT	126	[11]H[12]	1424-1549
SELP	SELP.c	NM_001009295.1	AGCAAAGSAGAGTGCATTGAG	CGCCACACTCTGACATATT	96	6/7	512-607
B3GNT3	B3GNT3	XM_027969438.2	AACCCCTGACCCAGCACCTCTTTG	CGGGTAGTGTCCCTCCCTCCATG	114	[2]	927-1040
B3GNT3	B3GNT3.d	XM_027969438.2	TTTGACCCCTGCTTCTACCGAG	AGTAGACCTGACTCTGGCTGCC	124	[2]	954-1117
PKLR	PKLR	XM_027978116.2	GCAAATTCGCGCTCAGCTACC	ACTATCCACTTCGACGCCG	110	[5]H[6]	552-661
PKLR	PKLR.c	XM_027978116.2	GAAAGCCCGTTGCTGTGCTAC	TTGGCCACATCACTCGTCTCTG	88	[8]H[9]	1219-1306
ASGR1	ASGR1.d	XM_042255643.1	TGTTACTGGTCTCTCGCTCGG	CATTTCCAGGCCCATTTTGA	177	[7]H[8]	687-863
ASGR1	ASGR1.b	XM_042255643.1	CGAGACGCTTCAAGAACTGG	TCAGTGTCAATCCCTCTGTCCG	177	[6]H[8]	881-1067
FMNL3	FMNL3.b	XM_004006376.5	GGAGGATGCCGAGACCAAGAAAT	TGGTGGCTCGTGTCTCATAGG	195	[12]H[14]	1234-1428
FMNL3	FMNL3.d	XM_004006376.5	TGCAGCATACATGACAACAGCG	ACAGAAAGGAGGTGTGGTCTTGG	155	[22]H[23]	2663-2817
RNASE6	RNASE6.b	ENSOARG00020011071	GCTCCTTCCAAGATGTGACTGC	GGTTGACACGGTTTGAACCTCTGG	99	[1]	218-316
RNASE6	RNASE6.d	ENSOARG00020011071	ATGGGGCCACATCTCTGGG	AGCGAGCCTTTGTGAGACCTC	109	[1]	1-109
HES6	HES6	XM_027964212.2	AAGCTGGAGAACCCCGAGGT	TGCATGCATGGATATAGCCG	137	[3]H[4]	285-401
HES6	HES6.b	XM_027964212.2	CGCCGGCTATATCCAGTGCAT	GACTCGAGCAGTGGTTCAGGA	105	[4]	398-481
Galectin-14	GAL-14.d	NM_001009251.1	GTTTGAAGAAAGCGGGTGTGTG	TGACTTGTTCGAAGGCCAAACG	200	[3]H[4]	234-433
GAPDH*	GAPDH	NM_001190390.1	CAAGCTCATTTCTGGTAGCAC	TCTCTCTCTCTGGTCTCTCT	131	10/11	957-1087
YWHAZ*	YWHAZ	NM_001267887.1	CTGAGAAAGCCTGCTCTCTTGG	GGTATCCGATGTCCCAAAATGC	143	5/6	554-696
IL13*	IL13	NM_001082594	AAACCCCTGTGCTCTTCTCTTC	CACAGTACATGCTGCTCGTCAG	134	2/3	114-247

Fonte: Toscano et al. (2020).

Resultados e Discussão

Avaliação de qualidade e integridade de RNA

As 20 amostras foram submetidas ao processo de extração de RNA total utilizando kit Qiazol Lysis Reagent seguido de purificação em coluna de sílica com Rneasy Mini kit. A concentração e pureza (razão 260/280 nm) do RNA extraído foram estimadas por espectrofotometria (Tabela 2) e variaram de 553,99 a 3750,7 ng/μL e de 1,93 a 2,15, respectivamente. A integridade foi confirmada em gel de agarose 1,5% (Figura 2) e com uso do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Tabela 2. Resultados de concentração de RNA (ng/μL) e razões 260/280 nm e 260/230 nm das amostras de RNA obtidas a partir de fragmentos de abomaso da região fúndica de ovinos da raça Morada Nova com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus*.

Amostra	Concentração (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
836	2761,34	2,06	2,18
897	2729,13	2,07	2,19
732	2304,6	2,1	1,84
883	1661,7	2,12	2,25
818	1501,05	2,13	1,67
852	3281,05	2,03	2,14
1053	3515,88	1,99	2,04
923	1593,74	2,12	2,23
1013	3616,09	1,94	2,07
781	980,4	2,15	2,21
1013R	2400,96	2,1	2,16
836R	1876,33	2,12	2,19
800	1152,84	2,14	2,02
907	2626,91	2,09	2,15
969	1195,6	2,13	1,94
795	2317,8	2,11	2,08
777	3283,11	2,01	2,08
886	3750,74	1,93	1,99
964	1574,18	2,04	2,17
739	553,99	2,14	2,27
742	1172,98	2,15	1,87
927	1669,42	2,11	2,14
1052	1180,34	2,13	2,26

A amostra de RNA do animal 1013 apresentou RIN (*RNA integrity number*) igual a 7,5, considerado limite de integridade mínima requerida. Portanto, foi realizado novo procedimento de extração de RNA, e por isso incluiu-se uma amostra do outro grupo experimental para minimização de variação inter-ensaio. As amostras que foram reprocessadas possuem R no final da identificação (1013R e 836R).

O valor de RIN encontrado foi de 8,5 a 9,8. Para o sequenciamento de RNA foram testados cinco animais de cada extremo, enquanto para etapa de validação dos resultados por RT-qPCR foram testados 10 animais de cada extremo.

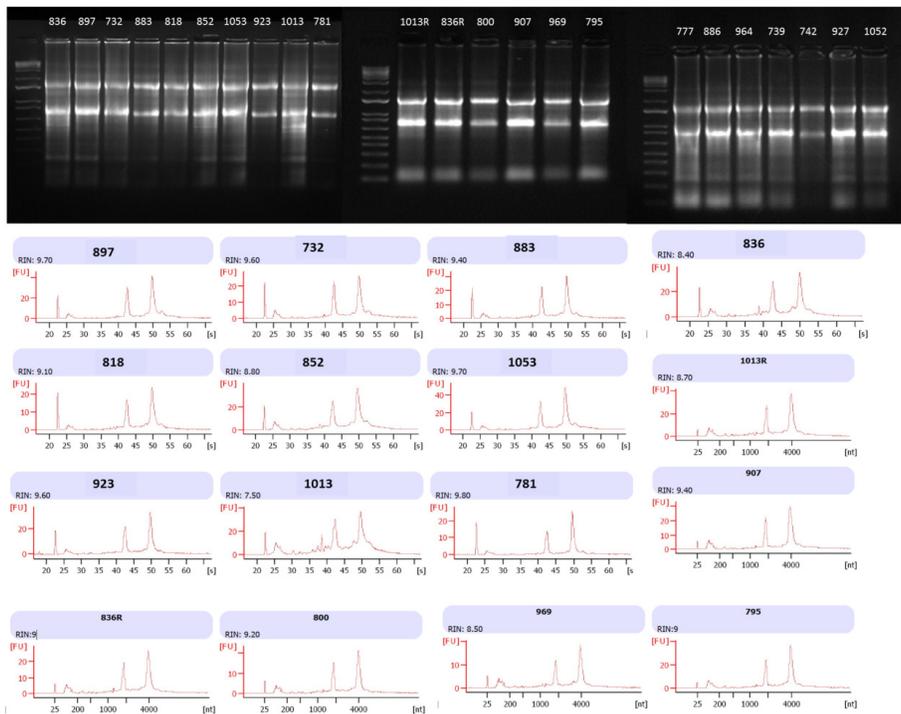


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (esquerda) e eletroforese de capilar utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer (direita) das amostras de RNA extraídas a partir de tecido abomasal da região fúndica de ovinos da raça Morada Nova com fenótipos divergentes de resistência a *Haemonchus contortus*.

Sequenciamento de RNA e análise de transcriptoma

O sequenciamento do tecido abomasal gerou cerca de 19 milhões de reads ‘paired-end’ por amostra (Tabela 3). Após o controle de qualidade, cerca de 45 mil reads paired-end foram removidos, permanecendo em média 18,6 milhões de reads ‘paired-end’ por amostra (Tabela 3).

Tabela 3. Média de *reads paired-end* sequenciados e mantidos após controle de qualidade.

Animal	Controle de qualidade		
	<i>Read Pairs</i>	<i>Pairs Reads after QC</i>	<i>Pairs Read Percent (%)</i>
1013	16.626.614	16.209.147	97,49
1053	19.336.609	18.887.479	97,68
732	17.571.721	17.245.747	98,14
781	19.473.347	19.023.707	97,69
818	21.541.661	20.926.161	97,14
836	17.296.508	16.831.042	97,31
852	19.955.299	19.604.987	98,24
883	21.384.767	20.868.718	97,59
897	17.355.859	16.954.976	97,69
923	19.555.431	19.108.742	97,72

Os resultados de número de sequências, porcentagem de genes unicamente mapeados em cada amostra, análise multidimensional e entre outros, estão apresentados na Tabela 4 e Figura 3.

Tabela 4. Número de *reads* e porcentagem unicamente mapeados em cada amostra de acordo com os três genomas ovinos.

Sample	NCBI (Oar 2.0)		Ensembl (Oar 1.0)		Ensembl (Texel 3.1)	
	Reads Uniquely Mapped	Percent Uniquely Mapped	Reads Uniquely Mapped	Percent Uniquely Mapped	Reads Uniquely Mapped	Percent Uniquely Mapped
1013	13.992.240	86,32%	13.493.114	83,24%	13.230.108	81,62%
1053	17.157.228	90,84%	16.387.983	86,77%	16.112.587	85,31%
732	15.621.373	90,58%	14.926.456	86,55%	14.734.246	85,44%
781	16.497.701	86,72%	15.770.277	82,9%	15.570.379	81,85%
818	18.963.984	90,62%	18.132.798	86,65%	17.909.855	85,59%
836	14.718.651	87,45%	14.071.398	83,6%	13.745.718	81,67%
852	17.457.057	89,04%	16.664.813	85,00%	16.471.675	84,02%
883	18.835.123	90,26%	18.181.215	87,12%	17.920.043	85,87%
897	15.256.659	89,98%	14.668.028	86,51%	14.390.021	84,87%
923	16.773.058	87,78%	16.100.772	84,26%	15.810.073	82,74%

Foram realizadas análises de escala multidimensional (MDS) que fornece a representação espacial das amostras dos diferentes grupos em clusters para os 10 animais submetidos ao sequenciamento de RNA. Observou-se que o animal 836, do grupo resistente, apresentou um perfil muito diferente comparado aos demais (Figura 3A). Dessa forma, não foi possível diferenciar os grupos resistente e susceptível. Portanto, com intuito de avaliar amostras mais homogêneas em cada grupo, duas amostras (836 e 781 – sublinhados em roxo na Figura 3A) foram removidas da análise e, então, a separação entre os grupos foi observada (Figura 3B).

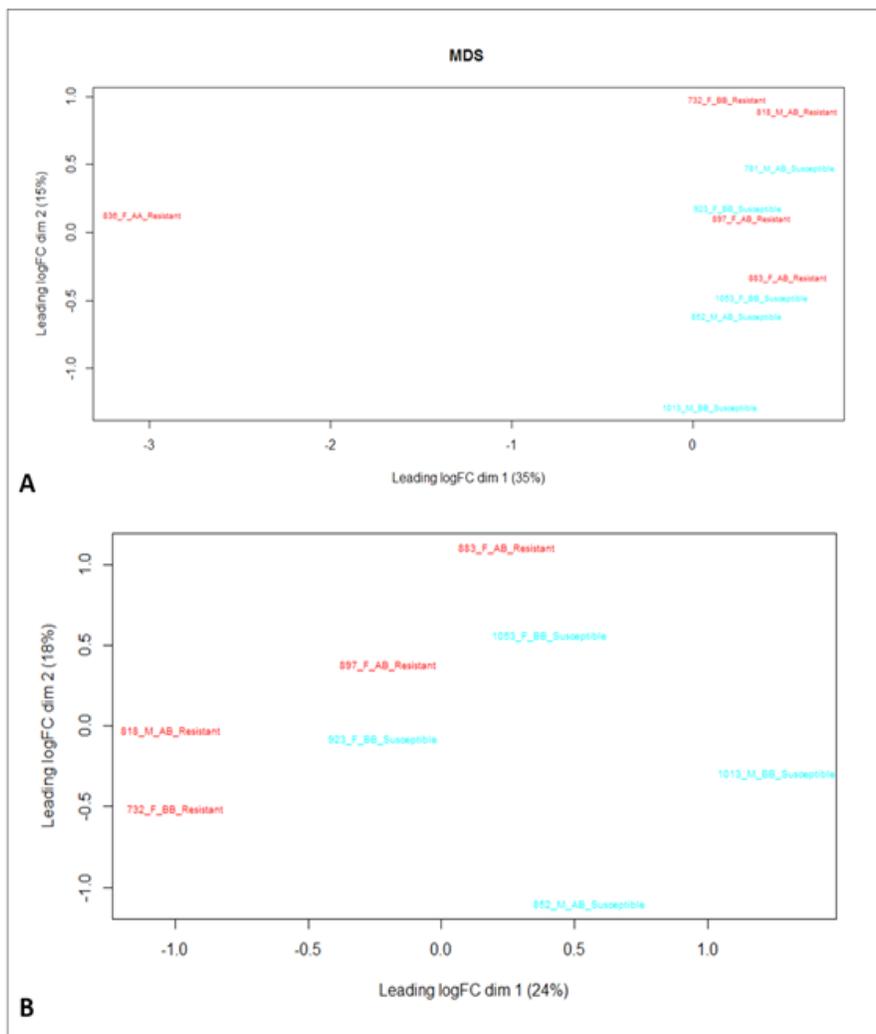


Figura 3. Plot de escala multidimensional (MDS-plot) medindo a similaridade das amostras em duas dimensões, onde azul representa os animais susceptíveis e vermelho os resistentes. MDS contendo 10 amostras (A). MDS contendo oito amostras (B).

Totais de 15.173, 13.436 e 13.661 genes foram expressos no transcriptoma de abomaso baseado nos genomas NCBI Oar 2.0, Ensembl Oar 1.0 e Ensembl Texel 3.1, respectivamente, sendo que apenas 7.714 (50%) foram comuns aos três genomas, enquanto 70% foram comuns entre Oar 2.0 e Texel 3.1, 58% entre Oar 1.0 e Oar 2.0 e 51% entre Oar 1.0 e Texel 3.1 (Figura 4).

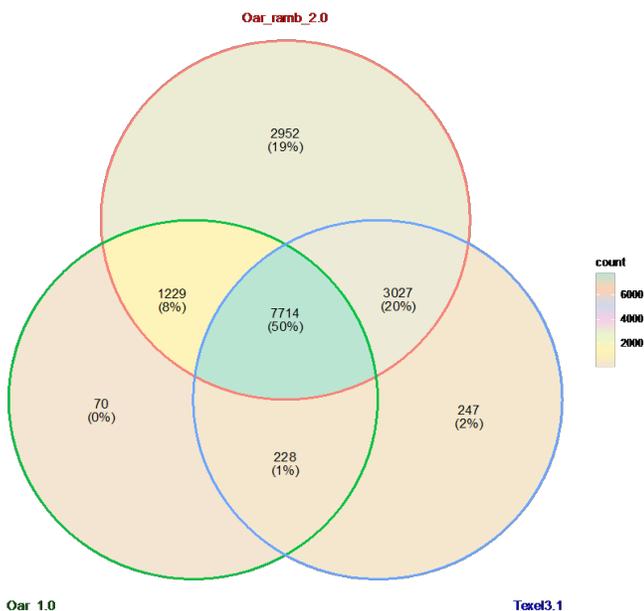


Figura 4. Genes expressos no transcriptoma abomasal de animais resistentes e susceptíveis a *H. contortus* de acordo com cada genoma avaliado.

Os genes DE em cada genoma estão apresentados na Tabela 5, sendo que somente cinco genes foram DE nos três genomas (destacados em verde), enquanto outros cinco genes foram DE em pelo menos dois genomas (destacados em alaranjado). O número de *reads* brutas para cada gene DE encontra-se na Tabela 6.

Tabela 5. Genes *down* e *upregulated* no abomaso de ovinos do grupo resistente à infecção por *H. contortus* comparados com grupo susceptível nos três genomas avaliados (genes destacados em verde foram encontrados nos três genomas ovinos enquanto os destacados em alaranjado foram encontrados em dois genomas ovinos).

NCBI Oar 2.0					
Símbolo	Descrição	Chr	logFC	PValue	FDR
LOC101116157	asialoglycoprotein receptor 1	11	-2,690	7,12E-11	1,08E-06
LOC121816881	immunoglobulin lambda variable 1-40-like	17	-1,205	2,16E-08	1,64E-04
B3GNT3	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	5	1,554	6,91E-08	3,49E-04
CLCA1	chloride channel accessory 1	1	-2,477	2,28E-07	8,66E-04
LOC121818163	uncharacterized LOC121818163	X	-2,314	8,32E-07	2,36E-03
LOC101121646	T-lymphocyte surface antigen Ly-9	1	1,764	9,34E-07	2,36E-03
LOC105616741	lipopolysaccharide-binding protein-like	13	-3,416	1,30E-06	2,81E-03
LOC121818812	uncharacterized LOC121818812	1	-2,519	2,28E-06	4,09E-03
LOC443162	galectin-14	11	-2,388	2,43E-06	4,09E-03
TFF3	trefoil factor 3	1	-2,212	1,23E-05	1,80E-02
LOC101115905	refilin-A	17	0,560	1,30E-05	1,80E-02
IL13	interleukin 13	5	-2,188	1,48E-05	1,87E-02
LOC101116991	ribonuclease K6-like	7	-2,164	1,73E-05	2,02E-02
RGS6	regulator of G protein signaling 6	7	1,153	2,68E-05	2,83E-02
LOC101119456	protein SET	3	-1,621	2,96E-05	2,83E-02
PKLR	pyruvate kinase L/R	1	1,932	3,13E-05	2,83E-02
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II	5	-1,348	3,31E-05	2,83E-02
HES6	hes family bHLH transcription factor 6	1	-2,010	3,36E-05	2,83E-02
SELP	selectin P	12	-1,098	4,38E-05	3,50E-02
DEPTOR	DEP domain containing MTOR interacting protein	9	-0,609	5,67E-05	4,30E-02
DCDC2	doublecortin domain containing 2	20	-1,451	6,56E-05	4,74E-02
Ensembl Gene ID	Símbolo	Chr	logFC	PValue	FDR
Oar 1.0					
ENSOARG00020021001		11	-2,86	2,13E-12	2,87E-08
ENSOARG00020006386	B3GNT3	5	1,71	1,05E-09	7,03E-06
ENSOARG00020002201	CLCA1	1	-2,46	1,17E-07	0,001
ENSOARG00020024647		11	-2,39	1,43E-06	0,005
ENSOARG00020003218	TFF3	1	-2,18	7,62E-06	0,020
ENSOARG00020000182	IL13	5	-2,17	1,20E-05	0,027
ENSOARG00020001631	HES6	1	-2,35	1,78E-05	0,034
ENSOARG00020011831	PKLR	1	1,94	2,51E-05	0,040
ENSOARG00020000387	FMNL3	3	0,62	2,65E-05	0,040
ENSOARG00020008417	SELP	12	-1,06	2,99E-05	0,040
ENSOARG00020011071	LOC101116991/ribonuclease K6 like	5	-2,19	4,01E-05	0,049
Texel 3.1					
ENSOARG000000002469	JH923980.1		-8,04	2,05E-17	2,80E-13
ENSOARG00000010137	ASGR1	11	-2,69	1,01E-12	6,87E-09
ENSOARG00000015019	B3GNT3	5	1,47	4,96E-08	0,0002
ENSOARG00000018868		13	-3,77	9,13E-08	0,0003
ENSOARG00000014659	CLCA1	1	-2,47	1,15E-07	0,0003
ENSOARG00000008993		1	1,55	1,27E-06	0,0029
ENSOARG00000010726	SELP	12	-1,13	4,92E-06	0,0096
ENSOARG00000020549	SFTP8	3	-2,45	7,24E-06	0,0121
ENSOARG00000010659	TFF3	1	-2,19	7,96E-06	0,0121
ENSOARG00000004229	PKLR	1	1,94	1,26E-05	0,0172
ENSOARG00000000663	FUOM	22	1,29	2,16E-05	0,0268
ENSOARG00000009885	IGSF5	1	0,62	2,42E-05	0,0271
ENSOARG00000018401	FMNL3	3	0,63	2,58E-05	0,0271
ENSOARG00000014253	SLC7A11	17	-1,39	2,80E-05	0,0274

Na anotação funcional no banco de dados DAVID, os genes selectina P (SELP) e interleucina 13 (IL13) foram enriquecidos para resposta inflamatória (GO:0006954, $p < 0,1$). Para melhorar a informação dos genes DE, foi utilizada a ferramenta ShinyGO tool para enriquecimento da análise, na qual os genes Fc fragment of IgE receptor II (FCER2), IL13, pyruvate kinase L/R (PKRL/LOC780515), SELP, chloride channel accessory 1 (CLCA1), refilin-A (RFLNA/FAM101A), trefoil factor 3 (TFF3), regulator of G protein signaling 6 (RGS6), protein SET (SET/ LOC101119456), acetylglucosaminyltransferase 3 (B3GNT3) e asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1/ LOC101116157) foram enriquecidos em alguns bancos de dados avaliados (Figura 5). Os genes FCER2, ASGR1 e SELP foram caracterizados em domínios proteicos de lectina, IL13 com sítios conservados de interleucina 4/13, PKRL como piruvato kinase, SET em uma família nucleossomo e CLCA1 como canal de cloro ativado por cálcio e SELP foi enriquecido em várias respostas imunes e processos biológicos.

Além disso, de acordo com o banco de dados STRING na ferramenta ShinyGo, TFF3 e B3GNT3 foram classificados no envolvimento de biossíntese de mucina tipo o-glycan e biossíntese de glicoesfingolípido e IL13 como JAK-STAT e receptor de citocina. Ressalta-se que, mesmo tendo pequena quantidade de genes DE, foi possível encontrar informações biológicas interessantes sobre esses genes.

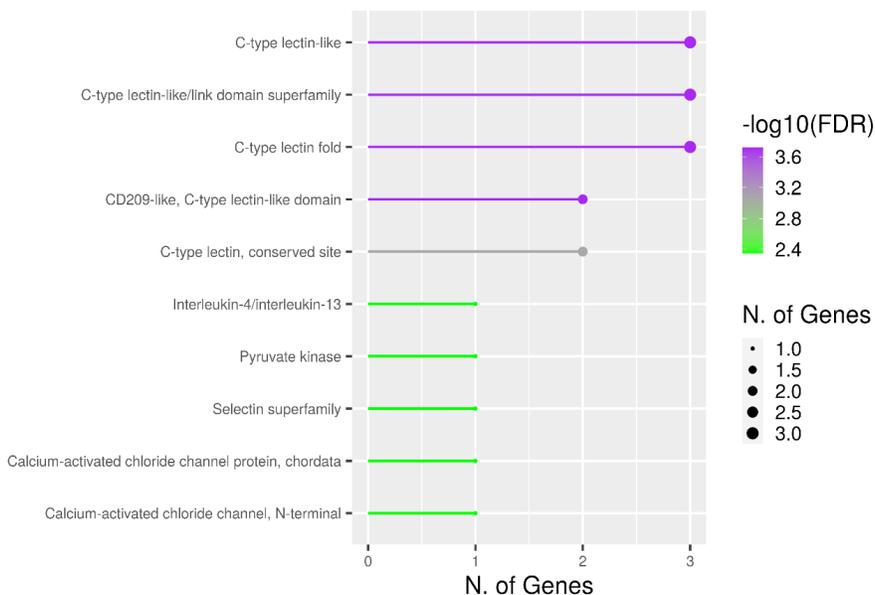


Figura 5. Os 10 domínios proteicos enriquecidos de acordo com banco de dados InterproTop usando a ferramenta ShinyGo e dados analisados com genoma Oar 2.0.

Nas interações gênicas, foi possível observar que alguns deles (*LY9*, *LOC101116991*, *FCER2*, *IL13*, *CLCA1*, *PKRL* e *ASGR1*) já possuíam interações descritas. Além disso, para melhor entendimento das funções gênicas, foi gerado um banco de interações com informações humanas, que também mostram associação entre genes DE (Figura 6).

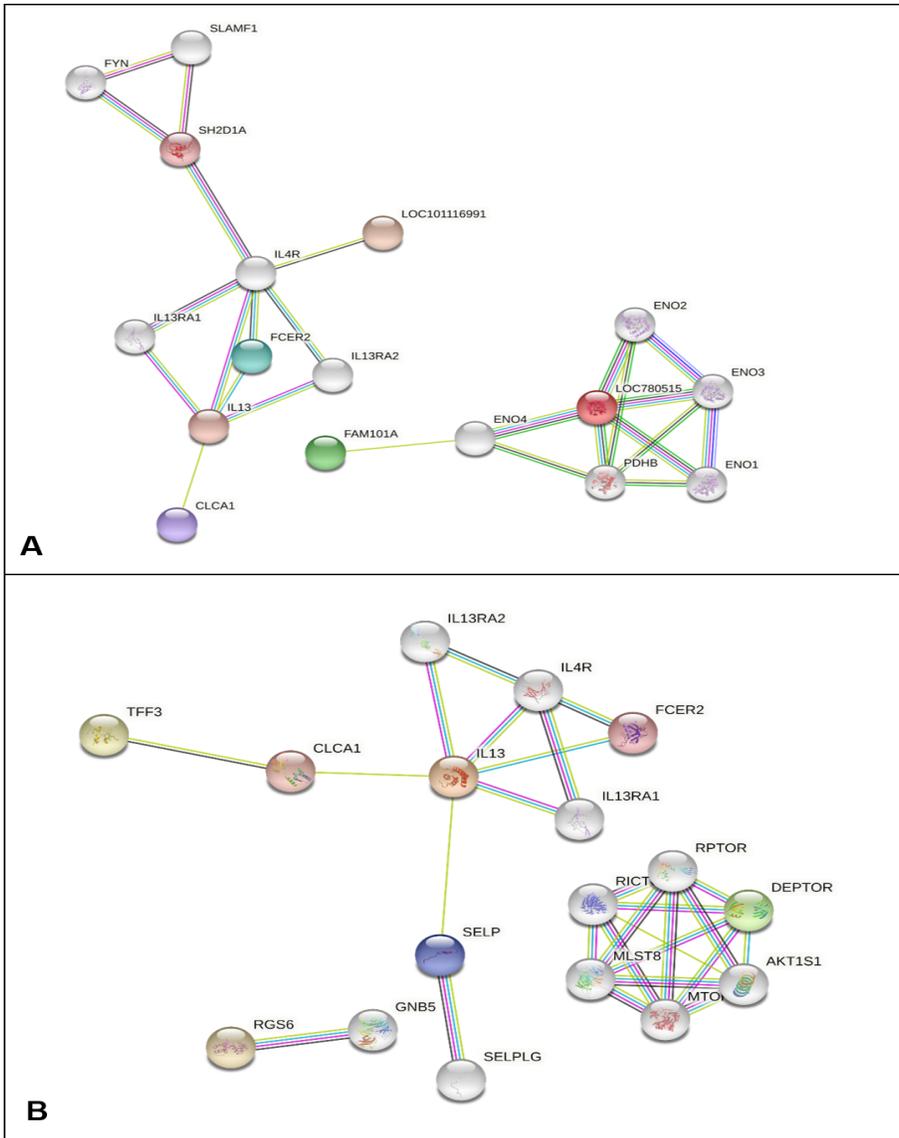


Figura 6. Interação entre genes DE entre animais resistentes e susceptíveis. Os círculos representam genes e as linhas conectoras representam interações entre os genes, de acordo com os métodos de predição de Stringdb: homologia (roxo), bases curadas (azul claro), mineração de texto (amarelo), experimentalmente confirmado (rosa), coexpressão (preto), co-ocorrência (azul escuro), fusão gênica (vermelho) ou vizinhança. Interações gênicas construídas com informações de *Ovis aries* (A). Interações gênicas construídas com informações de *Homo sapiens* (B). Círculos coloridos são genes DE enquanto círculos cinza são genes de interação. *LY9 = SH2D1A.

Quanto à busca por genes DE em regiões QTL para resistência parasitária previamente descritas considerando localizações gênicas NCBI 103 (Oar_ ramb_1.0) e 104 (Oar_ ramb_2.0), os genes *CLCA1*, *PKLR*, *LOC101119456* e *RGS6* foram localizados em regiões próximas a QTLs para contagem de *OPG*. *RGS6* e *LOC105616741* foram próximos a regiões QTL para resistência a *H. contortus* (*OPG*) e *LOC443162* para resistência a *H. contortus*.

Validação dos resultados de RNAseq

A proposta inicial previa a seleção de cinco genes DE entre os grupos para validação dos resultados por quantificação relativa usando-se o método de RT-qPCR. Nesse contexto, baseando-se nos genes DE encontrados utilizando-se o genoma de referência Oar 2.0, selecionamos os genes: *PROTSET*, *GAL-14*, *TFF3*, *RFLNA*, *FCER2* e *SELP*. Mesmo após várias tentativas de otimização, não foi possível obter amplificação específica e de boa qualidade para os genes *RFLNA*, *SELP* e *FCER2*. Para *FCER2* e *SELP* o insucesso foi provavelmente devido à baixa expressão desses genes, tendo em vista que apresentaram aproximadamente 104 e 58 sequências brutas médias, respectivamente (Tabela 6).

Tendo em vista que três dos sete genes selecionados não apresentaram amplificação específica e de qualidade no RT-qPCR e da grande variação dos resultados de genes DE no RNAseq quando comparados os três genomas ovinos, foi realizada nova seleção de genes para RT-qPCR com novo desenho de *primers* (conforme descrito na metodologia) para duas regiões diferentes do mRNA (em éxons diferentes) por gene, para quatro genes DE (*CLCA1*, *SELP*, *B3GNT3* e *PKLR*) nos três genomas, mais quatro genes DE (*ASGR1*, *FMNL3*, ribonuclease K6-like e *HES6*) em pelo menos dois genomas e para outra região alvo de *GAL-14* (*GAL-14d*). Para os genes *SELP*, *PKLR*, *FMNL3* e *HES6* não foi possível obter amplificação específica e de qualidade por RT-qPCR para as duas regiões-alvo de cada um desses genes, sendo que a provável causa do insucesso foi devido à baixa expressão gênica, com sequências brutas médias de aproximadamente 58, 61, 260, 104, respectivamente (Tabela 6). Nota-se ainda que para metade dos genes utilizados na validação dos resultados de RNAseq (*B3GNT3*, *IL13*, *ASGR1* e *GAL-14*), o Cq médio ficou acima de 35, o que também corrobora com a baixa quantidade de sequências brutas médias para esses genes (62, 23, 29, e 106, respectivamente – Tabela 6) (Figura 7).

Tabela 6. Número de seqüências brutas para cada gene DE resultante da análise de transcriptoma para cada genoma ovino avaliado.

Ensembl Oar 1.0 - v 105	Gene	1013	923	1053	852	818	883	732	897	Reads (média)
ENSOARG00020021001		50	38	28	42	5	8	7	2	22,5
ENSOARG00020006386	B3GNT3	37	36	19	22	113	97	91	84	62,375
ENSOARG00020002201	CLCA1	38355	18404	14867	41302	3055	8811	2970	6138	16737,75
ENSOARG00020024647		74	176	100	384	23	53	19	40	108,625
ENSOARG00020003218	TFF3	24575	10821	8178	22317	1294	5455	4283	3986	10113,625
ENSOARG00020000182	IL13	31	28	16	82	8	9	9	8	23,875
ENSOARG00020001631	HES6	108	128	22	106	25	9	27	12	54,625
ENSOARG00020011831	PKLR	14	22	32	17	72	120	122	25	53
ENSOARG00020000387	FMNL3	166	200	162	181	302	245	295	261	226,5
ENSOARG00020008417	SELP	61	77	61	118	30	45	39	38	58,625
ENSOARG00020011071	LOC101116991/ribonuclease K6 like	105	41	58	200	11	21	19	36	61,375
Ensembl Texel 3.1 - v 105										
ENSOARG00000000663	FUOM	26	39	23	49	82	56	121	78	59,25
ENSOARG00000002469	JH923980.1	29	19	58	22	0	0	0	0	16
ENSOARG00000004229	PKLR	14	20	30	16	70	110	115	25	50
ENSOARG000000008993		83	51	66	101	196	130	288	281	149,5
ENSOARG00000009885	IGSF5	402	537	514	426	728	668	773	760	601
ENSOARG00000010137	ASGR1	59	49	36	59	5	14	9	4	29,375
ENSOARG00000010659	TFF3	26518	11565	8755	23738	1383	5830	4600	4288	10834,625
ENSOARG00000010726	SELP	55	64	56	102	26	37	34	30	50,5
ENSOARG00000014253	SLC7A11	26	25	34	38	9	8	12	18	21,25
ENSOARG00000014659	CLCA1	38340	18388	14856	41262	3051	8807	2967	6135	16725,75
ENSOARG00000015019	B3GNT3	66	82	42	46	224	167	153	132	114
ENSOARG00000018401	FMNL3	191	231	178	207	354	281	341	297	260
ENSOARG00000018868		55	13	48	20	3	1	1	5	18,25
ENSOARG00000020549	SFTP B	20	24	41	59	2	16	4	4	21,25
NCBI Oar 2.0 - v 104										
LOC101116157	asialoglycoprotein receptor 1	60	50	36	61	5	15	9	4	30
LOC121816881	immunoglobulin lambda variable 1-40-like	1027	955	1618	1582	717	455	695	438	935,875
B3GNT3	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	68	83	43	43	238	181	164	147	120,875
CLCA1	chloride channel accessory 1	38403	18442	14883	41435	3058	8838	2974	6151	16773
LOC121818163	uncharacterized LOC121818163	37	74	43	146	12	23	9	15	44,875
LOC101121646	T-lymphocyte surface antigen Ly-9	81	44	55	92	185	142	327	292	152,25
LOC105616741	lipopolysaccharide-binding protein-like	117	35	125	42	9	1	7	14	43,75
LOC121818812	uncharacterized LOC121818812	33	26	18	17	2	7	7	1	13,875
LOC443162	galectin-14	73	173	97	377	24	52	18	39	106,625
TFF3	trefoil factor 3	29776	12827	9713	26222	1539	6360	5071	4773	12035,125
LOC101115905	refilin-A	657	878	925	845	1327	1099	1378	1180	1036,125
IL13	interleukin 13	31	28	16	82	8	9	9	8	23,875
LOC101116991	ribonuclease K6-like	177	75	136	391	30	44	28	69	118,75
LOC101119456	protein SET	19	71	56	54	17	21	12	15	33,125
PKLR	pyruvate kinase L/R	16	28	35	20	83	142	140	30	61,75
FCER2	Fc fragment of IgE receptor II	162	139	77	214	54	67	78	41	104
HES6	hes family bHLH transcription factor 6	175	244	45	203	51	29	63	28	104,75
RGS6	regulator of G protein signaling 6	17	22	22	33	66	44	50	53	38,375
SELP	selectin P	61	76	61	118	30	44	38	37	58,125
DEPTOR	DEP domain containing MTOR interacting protein	560	559	516	658	444	360	454	297	481
DCDC2	doublecortin domain containing 2	19	20	16	23	10	6	8	5	13,375

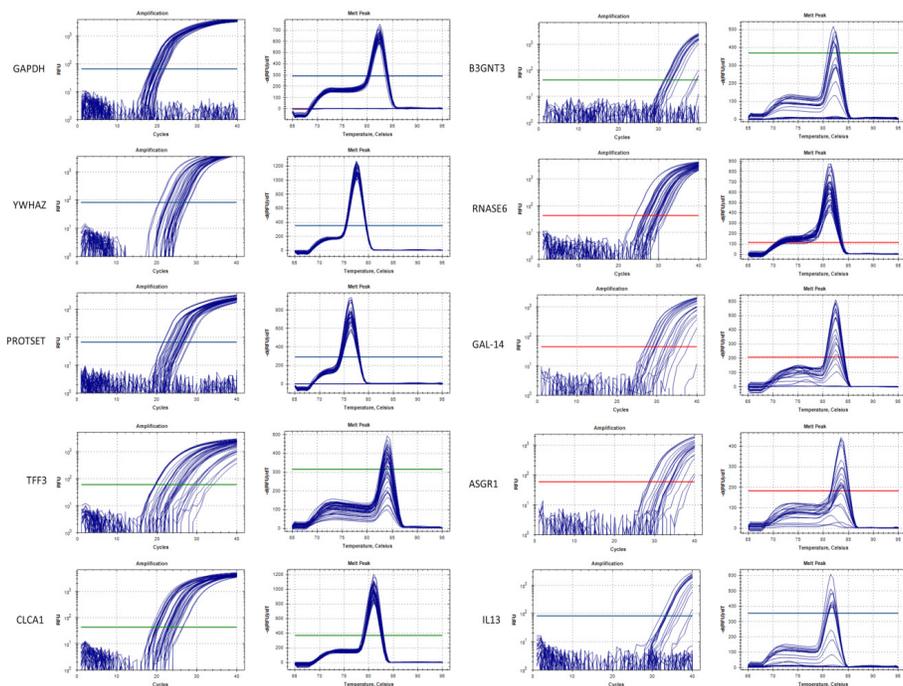


Figura 7. Curvas de amplificação e de dissociação dos ensaios de RT-qPCR utilizados para validação dos resultados de RNAseq.

Foram realizados cálculos de média (\pm desvio padrão) e correlação entre resultados do RNAseq (número de reads e de lcpm (log₂ cópia por milhão) e valores de *fold change* resultantes dos ensaios de RT-qPCR (Tabelas 7 e 8), sendo que somente o gene TFF3 apresentou correlação acima de 0,70 entre RNAseq e RT-qPCR, que foi observada para os três genomas ovinos.

O insucesso da validação de resultados de RNAseq por RT-qPCR já foi recentemente discutido por Coney (2021), onde aborda uma análise publicada por Everaert et al. (2017), no qual cinco pipelines de análises de RNAseq foram comparadas com ensaios de RT-qPCR para mais de 18 mil genes codificadores de proteínas. As conclusões obtidas nesse estudo foram que, dependendo do fluxo da análise, cerca de 15-20 % dos genes foram considerados ‘não-concordantes’ (entre RNAseq e RT-qPCR). Dentre esses genes ‘não concordantes’, 93% apresentaram *fold change* de até 2x, sendo que a maioria desses genes apresentou níveis muito baixos de expressão.

O que corrobora com a ausência de concordância entre os resultados de RNAseq e de RT-qPCR obtidos no presente estudo, em que a grande maioria dos genes DE apresentou expressão baixa (Tabela 6), além do *fold change* observado, que também ficou próximo ou abaixo de 2x para todos os genes DE encontrados, exceto para *lipopolysaccharide-binding protein-like*, que apresentou diferença de 3,416 (Tabela 5).

Tabela 7. Média e desvio-padrão de *fold change* por grupo (resistente e susceptível) para cada um dos genes testados por RT-qPCR, para os 20 animais experimentais, ou para apenas oito animais (analisados no RNAseq).

	PROTSET		IL13		TFF3	
Grupo	20 animais	8 animais	20 animais	8 animais	20 animais	8 animais
Resistente	1,96 ± 0,73	1,94 ± 0,90	44,56 ± 60,2	17,99 ± 24,2	508,16 ± 876,4	225,63 ± 243,1
Susceptível	2,22 ± 0,99	1,74 ± 0,42	5,07 ± 7,74	6,52 ± 10,21	4248 ± 7770,3	8095,7 ± 11326,8
	CLCA1		B3GNT3		RNASE6	
	20 animais	8 animais	20 animais	8 animais	20 animais	8 animais
Resistente	4,75 ± 3,86	4,50 ± 4,56	80,52 ± 141,76	28,57 ± 50,07	8,96 ± 8,48	6,33 ± 7,31
Susceptível	3,10 ± 1,58	3,69 ± 1,05	85,29 ± 124,65	60,07 ± 66,76	5,02 ± 6,09	9,82 ± 7,66
	GAL-14d		ASGR1d			
	20 animais	8 animais	20 animais	8 animais		
Resistente	2,68 ± 3,12	1,98 ± 2,42	52,51 ± 65,94	30,13 ± 56,0		
Susceptível	2,16 ± 2,63	4,42 ± 3,03	94,58 ± 121,42	60,81 ± 68,55		

* Encontram-se destacados em azul os resultados que apresentaram concordância com RNAseq.

Tabela 8. Coeficientes de correlação entre resultados de RNAseq (lcpm e reads) e de RT-qPCR (FC) por gene.

		Oar 1.0 - v 105	Texel 3.1 - v 105	Oar 2.0 - v 104
Gene	RNAseq	R ² (x RT-qPCR)	R ² (x RT-qPCR)	R ² (x RT-qPCR)
B3GNT3	Reads	-0,33	-0,29	
	lcpm	-0,33	-0,30	
CLCA1	Reads	-0,14	-0,14	-0,14
	lcpm	-0,37	-0,37	-0,38
TFF3	Reads	0,73	0,73	0,74
	lcpm	0,63	0,63	0,64
IL13	Reads	-0,38		-0,38
	lcpm	-0,46		-0,48
RNASE6	Reads	0,11		0,07
	lcpm	0,15		0,16
ASGR1	Reads		0,14	0,14
	lcpm		0,11	0,09
GAL-14	Reads			0,28
	lcpm			0,31
PROTSET	Reads			-0,42
	lcpm			-0,47

Conclusões

Foram obtidos genes diferencialmente expressos no abomaso associados com hemoncose em ovinos utilizando análise de transcriptomas, principalmente relacionados à biossíntese de mucina, em domínios proteicos de lectina e outras moléculas envolvidas em respostas imunes. No entanto, a validação por RT-qPCR de vários genes não foi possível. Isso ocorreu provavelmente por dois motivos principais: 1) baixa quantidade de sequências atribuídas à maioria dos genes DE e 2) qualidade de anotação do genoma do ovino. Foram utilizadas três versões referência atualizadas do genoma que apresentam discordâncias quanto à montagem, localização e anotação dos genes. Isto impacta diretamente os resultados de validação por RT-qPCR, dada à ocorrência de regiões gênicas (principalmente relacionadas à junção éxon-éxon) não bem anotadas, e as dificuldades de conseguir amplificação adequada.

Referências

- AMARANTE, A. F. T. DO. Resistência genética a helmintos gastrointestinais. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004. p. 1-5
- BESIER, B. New anthelmintics for livestock: the time is right. **Trends Parasitol.** v. 23, n. 1, p. 21-24, jan. 2006.
- BHUIYAN, A. A.; LI, J.; WU, Z.; NI, P.; ADETULA, A. A.; WANG, H.; ZHANG, C.; TANG, X.; BHUYAN, A. A.; ZHAO, S.; DU, X. Exploring the genetic resistance to gastrointestinal nematodes infection in goat using RNA-sequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 751-767, apr. 2017.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, aug. 2014.
- CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. DA S.; CHAGAS, A. C. DE S.; MOLENTO, M. B. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009.
- CHAGAS, A. C. DE S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I. C.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S. N.; OLIVEIRA, M. C. DE S.; BARIONI JÚNIOR, W. *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2013.
- COENYE, T. Do results obtained with RNA-sequencing require independent verification? **Biofilm**, v. 3, 100043, dec. 2021.
- DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; DRENKOW, J.; ZALESKI, C.; JHA, S.; BATUT, P.; CHAISSON, M.; GINGERAS, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**. v. 29, n. 1, p. 15-21, jan. 2013.
- EL-ASHRAM, S.; AL NASR, I.; EL-KEMARY, M.; MEHMOOD, R.; HU, M.; SUO, X. Early and late gene expression profiles of the ovine mucosa in response to *Haemonchus contortus* infection employing Illumina RNA-seq technology. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 681-692, oct. 2017.
- EL-ASHRAM, S.; LI, C.; ABOUHAJER, F.; MEHMOOD, R.; AL NASR, I.; ZHANG, Y.; LU, T.; YILI, D.; SUO, Z.; HAOJI, Z.; LI, Z.; HUANG, S. An ex vivo abomasal ovine model to study the immediate immune response in the context of *Haemonchus contortus* larval-stage. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 105-113, apr. 2018.
- EVERAERT, C.; LUYPAERT, M.; MAAG, J. L. V.; CHENG, Q. X.; DINGER, M. E.; HELLEMANS, J.; MESTDAGH, P. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. **Scientific Reports**, v. 7, article 1559, may 2017.
- GE, S. X.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, v. 36, n. 8, p. 2628-2629, apr. 2020.
- GUO, Z.; FRANCISCO GONZÁLEZ, J.; HERNANDEZ, J. N.; MCNEILLY, T. N.; CORRIPIO-MIYAR, Y.; FREW, D.; MORRISON, T.; YU, P.; LI, R. W. Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. **Scientific Reports**, v. 6, article 226200, 2016.

HAEHLING, M. B. V.; CRUVINEL, G. G.; TOSCANO, J. H. B.; GIRALDELO, L. A.; SANTOS, I. B. dos; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; BARIONI JUNIOR, W.; NICIURA, S. C. M.; CHAGAS, A. C. de S. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with resistance and resilience to *Haemonchus contortus* in Brazilian Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 279, 2020, 109053.

HAEHLING, M. B.; TOSCANO, J. H. B.; GIRALDELO, L. A.; SANTOS, I. B.; ESTEVES, S. N.; BENAVIDES, M. V.; THOLON, P.; CHAGAS, A. C. de S. Is selection for resistance and resilience to *Haemonchus contortus* possible in Morada Nova sheep? **Small Ruminant Research**, v. 201, aug. 2021, 106447.

HOWELL, S. B.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 12, p.1913-1919, dec. 2008.

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, p. 44-57, 2009.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Transcriptome and proteome research in veterinary science: What is possible and what questions can be asked? **The Scientific World Journal**. v. 2012, p. 1-14, article 254962, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621-628, may 2008.

O'CONNOR, L. J.; KAHN, L. P.; WALKDEN-BROWN, S.W. The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 1-2, p. 90-101, may 2007.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R**: a language and environment for statistical computing. Version 4.0.0. Vienna, Austria: RSFC, 2021.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1950.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, jan. 2010.

SILVESTRE, A.; LEIGNEL, V.; BERRAG, B.; GASNIER, N.; HUMBERT, J. F.; CHARTIER, C.; CABARET, J. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. **Veterinary Research**, v. 33, n. 5, p. 465-480, sep./oct. 2002.

SZKLARCZYK, D.; GABLE, A. L.; NASTOU, K. C.; LYON, D.; KIRSCH, R.; PYYSALO, S.; DONCHEVA, N. T.; LEGEAY, M.; FANG, T.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; MERING, C. Von. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605-D612, jan. 2021.

TOSCANO, J. H. B.; LOPES, L. G.; GIRALDELO, L. A.; SILVA, M. H. da; OKINO, C. H.; CHAGAS, A. C. de S. Identification of appropriate reference genes for local immune-related studies in Morada Nova sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1253-1262, out. 2018.

TOSCANO, J. H. B.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. B. dos; GIRALDELO, L. A.; HAEHLING, M. B. VON; ESTEVES, S. N.; BASSETTO, C. C.; AMARANTE, A. F. T. do; CHAGAS, A. C. de S. Local and systemic immune mediators of Morada Nova lambs with divergent *Haemonchus contortus* resistance phenotypes. **Parasite Immunology**, v. 42, e12790, 2020.

TOSCANO, J. H. B.; OKINO, C. H.; SANTOS, I. B. dos; GIRALDELO, L. A.; HAEHLING, M. B. VON; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Innate immune responses associated with resistance against *Haemonchus Contortus* in Morada Nova sheep. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, n. 3562672, p. 1-10, 2019a.

TOSCANO, J. H. B.; SANTOS, B. dos; HAEHLING, M. B. VON; GIRALDELO, L. A.; LOPES, L. G.; SILVA, M. H. da; FIGUEIREDO, A.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. de S. Morada Nova sheep breed: resistant or resilient to *Haemonchus contortus* infection? **Veterinary Parasitology**, v. 276, supplement, 2019b, 100019.

WALLER, P. J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 155- 164, jan. 1999.

Embrapa

Pecuária Sudeste



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE: 017698