

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *TLR2*, *TLR4* e *WC1* ASSOCIADA AOS NÍVEIS DE
INFECÇÃO EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS PELOS
AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA**

Hayala Caroline Silva Ferreira Gomes

Médica Veterinária

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *TLR2*, *TLR4* e *WC1* ASSOCIADA AOS NÍVEIS DE
INFECÇÃO EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS PELOS
AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA**

Hayala Caroline Silva Ferreira Gomes

Orientador: Dr. Henrique Nunes de Oliveira

Coorientadora: Dra. Marcia Cristina de Sena Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a defesa do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

G633e

Gomes, Hayala Caroline Silva Ferreira

Expressão gênica de TLR2, TLR4 e WC1 associada aos níveis de infecção em bovinos naturalmente infectados pelos agentes da tristeza parasitária /

Hayala Caroline Silva Ferreira Gomes. -- Jaboticabal, 2021

74 f. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Henrique Nunes de Oliveira

Coorientadora: Marcia Cristina de Sena Oliveira

1. Babesiose. 2. Anaplasmosse. 3. Expressão Gênica. 4. Resposta Imune. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES TOLL-LIKE 2 E 4 E RECEPTORES DE CÉLULAS T WC1 ASSOCIADA AOS NÍVEIS DE INFECÇÃO EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS PELOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA

AUTORA: HAYALA CAROLINE SILVA FERREIRA GOMES


ORIENTADOR: HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA

COORIENTADORA: MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / Unesp - Jaboticabal


Prof. Dr. GREGÓRIO MIGUEL FERREIRA DE CAMARGO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) - Salvador/BA


Pós-doutoranda LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de agosto de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Hayala Caroline Silva Ferreira Gomes nascida no dia 20 de julho de 1992, na cidade de Salvador, Bahia, filha de Lucineide Silva Ferreira Gomes e Francisco Antonio Ferreira Gomes. Iniciou o curso de Medicina Veterinária em março de 2013 na Universidade Federal da Bahia, UFBA. Participou do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica com fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (Pibic - Fapesb) entre 2014 e 2016 sob orientação da Doutora Cristiane de Jesus Barbosa, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Pibic - CNPq) entre 2016 e 2018 sob orientação da professora Doutora Luciana Veiga Barbosa. Obteve o título de bacharel em Medicina Veterinária em janeiro de 2019. Em março de 2019, ingressou no curso de mestrado pelo programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV - UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação do professor Doutor Henrique Nunes de Oliveira e coorientação da Doutora Marcia Cristina de Sena Oliveira. Foi bolsista da CAPES pelo período de 11 de março de 2019 até 11 de agosto de 2021.

EPÍGRAFE

O correr da vida embrulha tudo;

a vida é assim:

esquenta e esfria,

aperta e daí afrouxa,

sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem.

Guimarães Rosa

DEDICATÓRIA

*Dedico àqueles que me encorajam, me inspiram e me fortalecem diariamente:
meus amores, Jonatas e Júlia, meus pais, Ferreira e Lucy e minha irmã, Anny.*

Sem vocês, eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora e Santa Dulce, por guiarem os meus passos e me protegerem em todos os momentos.

Aos meus pais, Ferreira e Lucy Gomes, por acreditarem que a educação é a melhor escolha e por lutarem todos os dias por isso; a minha irmã, Anny Gomes, pelo carinho e pelo incentivo diário. Agradeço por acreditarem em mim e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos. É uma dádiva conviver com exemplos de dignidade, coragem, amor e fé.

Ao meu companheiro, Jonatas Rocha, por me motivar e me fortalecer todos os dias. O seu olhar cuidadoso e seu exemplo incansável em busca pelo melhor é admirável e inspirador.

À família Rocha Santos, pelo apoio e pelo incentivo. Sempre dispostos a me ajudar a alcançar meus objetivos, ofereço minha sincera gratidão.

Aos amigos de toda a vida e, principalmente, a Gustavo Schettini, agradeço a amizade e a permanência ao meu lado, dividindo momentos de alegria e dificuldade. A companhia de vocês com certeza tornou o caminho mais fácil.

Aos amigos, colegas e funcionários da UNESP – Campus Jaboticabal, em especial a Bianca Olivieri, André Mauric, Letícia Joaquim, Gabriela David, Ivan Carvalho, Bruna Salatta, Gabriela Bonfá, Caio Teixeira, que me ajudaram a percorrer esse caminho longe de casa, ofereço meu sincero agradecimento e a certeza de que podem contar comigo sempre.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, pela excelência no ensino, na pesquisa e na extensão, que prevaleceram nas diversas áreas de atuação e foram determinantes na minha trajetória.

Ao Professor Doutor Henrique Nunes, pela oportunidade, pela presteza em todos os momentos e pelo cuidado comigo. Agradeço a orientação no Mestrado e, sobretudo, por acreditar em mim e no meu trabalho. Ademais, sua integridade, ética e dedicação são exemplos que permearão meu exercício na profissão.

À Doutora Marcia Cristina, pela coorientação, e, mais do que isso, por confiar no meu trabalho e por me ensinar diariamente sobre amor e cuidado com o outro. Minha admiração pela profissional e pessoa que tive oportunidade de trabalhar ultrapassa barreiras.

Ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste e demais componentes, em especial, à Cintia Hiromi, Yngrid Veltroni, Maria Fernanda Tonelli, Pamella Cristini, Marília Dal Ri. Agradeço por me orientarem a obter o melhor da vivência na Embrapa por meio das técnicas laboratoriais e do estudo de suas aplicações, de modo a entender que os resultados obtidos são o reflexo da integração entre teoria e prática, e suas interpretações dependem de execução impecável.

Em especial, à Embrapa Pecuária Sudeste, por ser espaço para realização da pesquisa em genética e melhoramento animal, fomentando a realização deste trabalho e os pilares da ciência neste país.

À Capes, pelo fomento e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Unesp – Campus Jaboticabal, pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente, muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Babesiose e Anaplasmoses Bovinas: o Complexo TPB....	3
3.2 Aspectos de resistência.....	5
3.3 Imunidade inata e adaptativa de bovinos.....	6
3.4 Receptores Toll-like 2 e 4.....	9
3.5 Células T $\gamma\delta$ WC1.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Animais experimentais e colheita do material biológico....	14
4.2 Quantificação absoluta do número de cópias (NC) do DNA de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i>	14
4.2.1 Extração de DNA.....	14
4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR).....	15
4.3 Quantificação relativa da expressão gênica.....	18
4.3.1 Extração e quantificação do RNA.....	18
4.3.2 Síntese do cDNA.....	19
4.3.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	19
4.3.4 Genes de referência.....	20
4.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR).....	21
4.4 Análise de dados.....	22
4.4.1 Modelo de classes de precedência.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

EXPRESSÃO GÊNICA DE DE *TLR2*, *TLR4* e *WC1* ASSOCIADA AOS NÍVEIS DE INFECÇÃO EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS PELOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA

A babesiose bovina é uma doença infecciosa causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, parasitas intraeritrocitários que induzem à anemia hemolítica intravascular. A anaplasmose, por sua vez, é causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*, e envolve, principalmente, a manifestação de anemia seguida de hemólise massiva. A ocorrência dessas infecções segue a dispersão do carrapato *Rhipicephalus microplus* e, quando em ação concomitante, forma o complexo de doenças intitulado Tristeza Parasitária Bovina (TPB), reconhecido por acarretar perdas econômicas na pecuária devido, por exemplo, à redução na produção de leite e carne, e à infertilidade temporária. Neste cenário, estudos de expressão gênica focados na avaliação da resposta imune se mostram uma alternativa na determinação de bases genéticas voltadas para a seleção de bovinos resistentes a essas enfermidades e, por consequência, implicam na melhoria do fenótipo quanto à qualidade e à produtividade do rebanho. Neste trabalho objetivou-se avaliar as flutuações de expressão gênica de receptores toll-like 2 e 4, receptores de células T $\gamma\delta$ WC1 e nível de infecção pelos hemoparasitas em amostras de sangue de 46 bezerros da raça Canchim, desde o nascimento até os quatro meses e meio de idade, totalizando dez colheitas, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qRT-PCR). Os dados obtidos mostraram variações na expressão gênica ao longo do tempo e associações entre estas variações e os níveis de infecção pelos agentes da tristeza parasitária bovina apresentaram efeitos de colheita e de classe de precedência significativos. Este estudo apresenta flutuação dos níveis de expressão desses genes frente às infecções estudadas e sugere que, apesar das oscilações de expressão ao longo do estudo, há participação desses receptores durante o desenvolvimento da imunidade contra as infecções pelos hemoparasitas. Conclui-se que este trabalho pode ser o ponto de partida para os estudos dos genes *TLR2*, *TLR4* e *WC1* como marcadores genéticos de resistência/suscetibilidade em bovinos infectados com os agentes da tristeza parasitária.

Palavras-chave: anaplasmose, babesiose, expressão gênica, resposta imune.

GENE EXPRESSION OF *TLR2*, *TLR4* AND *WC1* RELATED TO THE LEVELS OF INFECTION IN CATTLES NATURALLY INFECTED BY AGENTS OF TICK-BORNE DISEASES

Bovine babesiosis is an infectious disease caused by protozoa *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, intra-erythrocyte parasites that induce intravascular hemolytic anemia. On the other hand, anaplasmosis is caused by *Anaplasma marginale* bacterium and mainly involves the manifestation of anemia followed by massive hemolysis. These infections occur with the *Rhipicephalus microplus* tick dispersion and when in concomitant action, form the disease complex called tick-borne diseases, recognized for causing economic losses in livestock due, for example, to the reduction in the production of milk and meat and temporary infertility. In this scenario, studies of gene expression focused on the immune response evaluation are shown as an alternative in determining genetic bases aimed at selecting cattle resistant to these diseases and, consequently, imply improving the phenotype regarding the quality and productivity of the herd. This study aimed to evaluate the variation in gene expression of toll-like receptors 4 and T cells $\gamma\delta$ WC1, and infection level by hemoparasites in blood samples from 46 Canchim calves, from birth to four and a half months of age, totaling ten collections, using Real-Time Quantitative Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). The data obtained showed variations in gene expression over time, and associations between these results and the infection level by the tick-borne diseases agents showed significant effects of collections and class of precedence. This study presents fluctuations in the expression levels of these genes against infections studied and suggests that, despite the oscillations of expression throughout the study, there is participation of these receptors during the development of immunity against infections by hemoparasites. We conclude that this work can be the starting point for studies of TLR2, TLR4, and WC1 genes as genetic markers of resistance/susceptibility in cattle infected with the agents of tick-borne diseases.

Key words: anaplasmosis, babesiosis, gene expression, immune response.

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E QUADROS

	Página
Figura 1. Média dos valores de número de cópias (NC) expressa em Log10 para <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> com diagnóstico realizado pela técnica de qPCR, distribuída por colheita de amostras.....	26
Figura 2. Diferenças da expressão do gene TLR2 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.....	28
Figura 3. Diferenças da expressão do gene TLR2 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.....	30
Figura 4. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$) para o gene TLR2.....	32
Figura 5. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$) para cada colheita (C1 a C10) do gene TLR2.....	33
Figura 6. Diferenças da expressão do gene TLR4 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.....	34
Figura 7. Diferenças da expressão do gene TLR4 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.....	36
Figura 8. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$) para o gene TLR4.....	37
Figura 9. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$) para cada colheita (C1 a C10) do gene TLR4.....	38
Figura 10. Diferenças da expressão do gene WC1 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de – DeltaDeltaCq ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.....	40

Figura 11. Diferenças da expressão do gene WC1 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), de acordo com o modelo proposto.....	42
Figura 12. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$) para o gene WC1.....	45
Figura 13. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$) para cada colheita (C1 a C10) do gene WC1.....	46
Quadro 1. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência, segundo o esquema p222 para o gene TLR2.....	29
Quadro 2. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência, segundo o esquema p222 para o gene TLR4.....	35
Quadro 3. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência, segundo o esquema p222 para o gene WC1.....	43
Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para os ensaios de qPCR.....	16
Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores para os ensaios de expressão gênica por qPCR.....	20
Tabela 3. Médias de número de cópias de DNA expressas em Log10 obtidas pela técnica de qPCR bem como o número de animais positivos [+ (n)] para <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> obtidos com o uso dessa ferramenta diagnóstica.....	25

1. INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é uma enfermidade causada pelos protozoários *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) - parasitas intraeritrocitários indutores de anemia hemolítica intravascular, principal sinal clínico da doença (Bock et al., 2004). A anaplasmoze, por sua vez, é causada pela rickettsia *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910, 1911), e envolve, principalmente, a manifestação de anemia seguida de hemólise massiva (Kocan et al., 2010, Tucker et al., 2016). Ambas apresentam alta morbidade e alta mortalidade, o que ocorre, principalmente, em zonas de instabilidade enzoótica (McCosker, 1981).

A ocorrência dessas infecções segue a dispersão do carrapato *Rhipicephalus microplus*, considerado único vetor responsável pela transmissão da babesiose e um dos principais vetores da anaplasmoze (Kessler, 2001). São enfermidades que, em ação concomitante, formam o complexo de doenças intitulado Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (Kessler e Schenk, 1998), reconhecido por acarretar perdas econômicas no Brasil que podem ultrapassar US\$ 500 milhões anuais devido, por exemplo, à redução na produção de leite e carne e à infertilidade temporária (Grisi et al., 2014).

A resistência de bovinos frente ao carrapato e às doenças por ele transmitidas pode variar e alguns estudos têm sido realizados no sentido de encontrar respostas biológicas que resultem nesse aspecto. Assim, sabe-se que o gado zebuino é mais resistente (*Bos taurus indicus*) às infecções de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* do que o europeu (*B. t. taurus*) (Parker et al., 1985; Bock et al., 1997); e estudos de expressão gênica indicam que mecanismos imunológicos estão associados à resistência ao carrapato em bovinos (Wang et al., 2007; Piper et al., 2008; Neto et al., 2011).

O estudo da expressão de genes relacionados com a imunidade contribui para o entendimento das respostas imunes frente às infecções e possibilita, por exemplo, o direcionamento em programas de seleção genética. De acordo com a especificidade de atuação, pode estar relacionada à resposta imune inata -

inicial – que corresponde a fatores gerais e não específicos (Bock et al., 2004); e/ou à adaptativa - mais tardia, referente ao contato com agentes específicos (Mahoney et al., 1979). Desse modo, neste trabalho elencamos para avaliarmos três genes da cascata imunológica, que não têm seu perfil descrito frente às infecções de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: os genes TLR2 e TLR4, e o gene WC1.

Genes que expressam receptores do tipo toll-like (TLRs) são uma alternativa para avaliar a resposta imune inata do hospedeiro (Takeda et al., 2003) e genes que expressam receptores de células T $\gamma\delta$ WC1 são indicadores da avaliação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (Rogers et al., 2005). Os genes TLR2 e TLR4 em *Bos taurus* foram mapeados nos cromossomos 17 e 8, respectivamente (White et al., 2003; McGuire et al., 2006). O gene WC1, por sua vez, é codificado por uma família multigênica e expressa três isoformas altamente conservadas entre bovinos e raças - WC1.1, WC1.2 e WC1.3 (Herzig e Baldwin, 2009).

TLRs são encontrados em todas as formas de vida (Akira et al., 2006) e traduzem moléculas de sinalização da superfície celular que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e estimulam a resposta imune apropriada (Takeda et al., 2003). Polimorfismos encontrados em receptores TLR de bovinos sugeriram SNPs candidatos a características imunológicas (Jann et al., 2008). Por outro lado, genes de T $\gamma\delta$ WC1 são encontrados exclusivamente em células T $\gamma\delta$ de ruminantes e traduzem em glicoproteínas transmembrana (Rogers et al., 2005). Perfis de expressão gênica de populações clonais de células T $\gamma\delta$ WC1+ sugerem o envolvimento dessas células na secreção de citocinas em resposta à infecção por *A. marginale* (Lahmers et al., 2006).

Portanto, a avaliação do comportamento desses genes em estudos de expressão se mostra uma alternativa na determinação de bases genéticas voltadas para a seleção de bovinos resistentes à babesiose e à anaplasiose. Desta forma, viabilizada pela associação com características imunológicas e com posterior implicação desses resultados na melhoria do fenótipo quanto à qualidade e à produtividade do rebanho.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Auxiliar na construção de base genética para seleção de bovinos resistentes às babesioses e à anaplasmose por meio de resultados obtidos na avaliação quantitativa do nível de expressão de genes que codificam receptores do tipo toll-like 2 e 4 e receptores de células T $\gamma\delta$ WC1 associada aos níveis de infecção de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* determinadas por qPCR.

2.2 Específicos

a) Estimar quantitativamente o nível de infecção por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* por meio da técnica de qPCR em amostras de sangue de bovinos da raça Canchim naturalmente infectados;

b) Determinar o nível de expressão de genes que codificam receptores do tipo toll-like 2 e 4 e receptores de células T $\gamma\delta$ WC1;

c) Agrupar os animais em classes de precedência de acordo com o nível de infecção estipulado como limiar para qualquer um dos patógenos e relacionar estes resultados aos níveis de expressão de genes que codificam receptores do tipo toll-like 2 e 4 e receptores de células T $\gamma\delta$ WC1 em cada colheita.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Babesiose e Anaplasmose Bovinas: o complexo TPB

A babesiose e a anaplasmose podem ocorrer de forma assíncrona num mesmo animal ou de forma simultânea. O complexo de doenças conhecido por Tristeza Parasitária Bovina (TPB) compreende a infecção ocasionada pelos protozoários *Babesia bovis* e/ou *B. bigemina* concomitante com a rickettsia

Anaplasma marginale (Kessler e Schenk, 1998). É considerada uma das principais enfermidades parasitárias que acometem bovinos, pois acarretam perdas financeiras para a pecuária nacional que podem chegar a cerca de 500 milhões de dólares anuais (Grisi et al., 2014).

O gênero *Babesia* spp. é composto por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, parasitas obrigatórios de eritrócitos, onde ocorre sua multiplicação. Apesar deste gênero abrigar 11 espécies, no Brasil, somente duas espécies parasitam bovinos: *B. bovis* e *B. bigemina* (Guglielmone, 1995), sendo a primeira considerada mais patogênica (Bock et al., 2004). O vetor biológico de *B. bovis* e *B. bigemina* é o carrapato *Rhipicephalus microplus* (Monteiro, 2012) e a ocorrência da doença segue a sua dispersão (Araya-Anchetta et al., 2015).

A babesiose provoca altas taxas de morbidade e mortalidade em rebanhos bovinos de todo o mundo (McCosker, 1981), embora ocorra com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos vetores (Estrada-Peña et al., 2006; Wang et al., 2007). Assim, o controle dos carrapatos nestas regiões tem sido um dos principais mecanismos para controlar as babesioses (Estrada-Peña et al., 2006; Wang et al., 2007), além de estratégias de manejo dos fatores de risco como o uso da imunoprofilaxia (Gonçalves, 2000).

Os sinais clínicos são decorrentes da multiplicação dos protozoários dentro dos eritrócitos do hospedeiro, com consequente hemólise, resultando em febre, anemia e redução do volume globular (VG), icterícia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e, no caso da babesiose cerebral causada por *B. bovis*, sinais neurológicos como ataxia, agressividade, opistótono, movimentos de pedalagem, andar em círculos e morte (Antoniassi et al., 2009; Santarosa et al., 2013).

A anaplasmoze bovina, por sua vez, é uma enfermidade infecciosa causada pela bactéria Gram negativa do gênero *Anaplasma*. Duas espécies deste gênero podem acometer os bovinos: *A. centrale* e *A. marginale* (Theiler, 1910, 1911). Esta infecção ocorre com frequência em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, e é endêmica na maioria dos países da América Latina (Guglielmone, 1995). No Brasil, o único vetor biológico e principal

transmissor desta rickettsia é o carrapato *R. microplus*. Entretanto, a transmissão também pode ocorrer por via iatrogênica, por transmissão transplacentária e por transmissão mecânica pelas picadas de várias espécies de moscas hematófagas (Kessler, 2001). Da mesma forma que a babesiose bovina, a infecção por *A. marginale* implica em perdas econômicas relevantes na pecuária e causa altas taxas de mortalidade (Zhao et al., 2017). A ocorrência da doença em animais adultos pode provocar infecção grave, chegando a ser letal em 49% dos casos (Tucker et al., 2016).

Os sinais clínicos das anaplasmoses em bovinos envolvem a rápida multiplicação intra-eritrocítica deste agente, que desencadeia anemia e varia em intensidade de acordo com o grau de eritrócitos parasitados, causando febre, perda de peso, debilidade, icterícia devido à hemólise massiva e abortos em animais gestantes. O desenvolvimento desses sinais depende da idade e raça do animal, virulência da cepa e abundância de vetores (Zhao et al., 2017).

3.2 Aspectos de resistência

A resistência de bovinos frente a um desafio infeccioso pode variar de acordo com o grupo genético, a idade, o manejo adotado, a abundância de vetores e doenças concomitantes. Alguns estudos têm sido empregados no sentido de encontrar respostas biológicas que resultem na resistência ao carrapato e às doenças transmitidas por ele. Assim, Bock et al. (1997) identificaram que o gado zebuino é mais resistente (*Bos taurus indicus*) às infecções de *B. bovis* do que o europeu (*B. t. taurus*), já frente à infecção por *B. bigemina* e *A. marginale*, Parker et al. (1985) identificaram reações menos graves em bovinos *B. t. indicus* de raça pura do que em *B. t. taurus*.

A idade é determinante para revelar resistência ou susceptibilidade às infecções por *Babesia* spp. Bezerros jovens infectados por *B. bovis* apresentam forte resistência inata diferente do observado no gado adulto (Trueman e Blight, 1978; Goff et al., 2001). Quando infectados durante os primeiros meses de vida esses animais são protegidos pela administração do colostro, que contém imunoglobulinas maternas, garantindo imunidade ativa sem exteriorizar manifestações clínicas (Folly et al., 2009). Entretanto, a transferência passiva de

colostro não é a única forma de promover resistência às babesias. Bezerros com até 9 meses de idade quando infectados por *Babesia* spp. não desenvolvem o curso grave da doença, e sim o oposto, pois exibem uma resistência inata com baixa parasitemia que persiste por longo período. Este fenômeno acontece de forma incomum em outras doenças e é intitulado de resistência inversa à idade, que apesar de beneficiar o hospedeiro, favorece a transmissão do parasita (Zintl et al., 2005).

Desse modo, principalmente, em regiões endêmicas estáveis, ou seja, aquelas em que as condições climáticas possibilitam a presença constante do carrapato, há exposição precoce dos animais ao agente e a infecção primária ocorre quando estes apresentam resistência inata e estão protegidos pela imunidade passiva (Guglielmone, 1995). Sendo assim, a transmissão de babesias é contínua e após reinfecção constante, a parasitemia se mantém em níveis subclínicos, garantindo certa imunidade e corroborando para que animais que se recuperem da enfermidade se tornem resistentes. Quanto à anaplasmoze bovina por *A. marginale*, todas as faixas etárias são suscetíveis e a prevalência aumenta com a idade (Atif, 2015).

Bovinos que sobrevivem à infecção aguda de *A. marginale* desenvolvem infecções persistentes caracterizadas por ciclos rickettsêmicos repetitivos com a emergência de variantes antigênicas da proteína de superfície principal 2 (MSP-2), como forma de contornar as respostas imunes do hospedeiro. Esses animais exibem imunidade e se tornam resistentes à forma clínica da doença. Entretanto, servem como reservatório da bactéria, favorecendo a sua transmissão. Ainda não se sabe se alguma das regiões conservadas de MSP2 pode direcionar alguma resposta específica do sistema imunológico do hospedeiro, entretanto, é notório que o controle imunológico de cada ciclo exige respostas a uma população antigenicamente diferente de *A. marginale* (French et al, 1998, 1999).

3.3 Imunidade inata e adaptativa de bovinos

A resposta imunológica de bovinos frente à infecção por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* envolve os mecanismos da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata é mediada por reações iniciais contra a infecção e

está relacionada a fatores gerais e não específicos da resposta imune do hospedeiro, como características genéticas, idade, especificidade com o parasita e resposta das células imunes (Bock et al., 2004); já a imunidade adaptativa possui diversidade de reconhecimento e memória, e ocorre de forma mais tardia, após a apresentação de antígenos específicos dos parasitas pelo sistema imune do hospedeiro (Mahoney et al., 1979).

A primeira linha de defesa da imunidade inata estimula o desenvolvimento da resposta imune adquirida. O desenvolvimento desta imunidade específica - humoral, mediada por linfócitos B e/ou imunoglobulinas que sintetizam anticorpos; e celular, dependente de linfócitos T e células efectoras - caracteriza a defesa duradoura e apropriada do hospedeiro contra os agentes infecciosos (Bock et al., 2004). As células efectoras, por sua vez, sintetizam citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas, que atuam na multiplicação dos parasitas (Chaplin, 2003; Abbas et al., 2018).

A resolução da infecção aguda em animais infectados pela primeira vez inclui uma resposta inata forte, que leva à ativação de macrófagos esplênicos via IFN- γ e posterior fagocitose com produção de metabólitos tóxicos, como o óxido nítrico (NO), culminando na morte dos parasitas (Brown et al., 2006). Assim, a resposta imune dos bovinos à doença é dependente, principalmente, da imunidade celular oriunda do baço, que promove ativação específica de células imunes. Ademais, a defesa inicial frente à *Babesia* spp. é composta por células com atividade fagocítica – monócitos ativados, macrófagos e neutrófilos, que sintetizam e liberam intermediários reativos de nitrogênio (RNI), intermediários reativos de oxigênio (ROI) e citocinas, que regulam a resposta inflamatória. O NO, por exemplo, é um RNI produzido pela ação da enzima iNOS (óxido nítrico sintetase) via IFN- γ durante infecções agudas, que inibe a replicação de *B. bovis* e leva à degeneração de maneira dose-dependente (Shoda et al., 2000; Goff et al., 2002).

Além do NO, macrófagos estimulados por *B. bovis* produzem interleucina 12 (IL-12), IL-10, IL-18 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Brown et al., 1996; Shoda et al. 2000), induzindo mecanismos da resposta adquirida humoral, que age como facilitadora no processo de fagocitose dos parasitos (Bock et al., 2004). Transcritos de IL-12 são expressos precocemente no baço de bezerros

jovens da mesma forma que a produção de IFN- γ e NO, ao passo que no gado adulto a expressão de IL-12 ocorre de forma atrasada e deprimida assim como IFN- γ e NO, porém, com influência da expressão de IL-10. A IL-18 atua em ação sinérgica com a IL-12, que ativa células exterminadoras naturais (NK) para potencializar a produção de IFN- γ (Brown et al., 1996; Shoda et al., 2000), que em ação concomitante com o TNF- α , ativa a produção de NO por macrófagos (Goff et al., 1998, 2001).

A resposta imune adquirida aos patógenos *B. bovis* e *B. bigemina* se concentra no papel da célula de memória T CD4⁺ (Brown et al., 2001), que em atividade clonal *in vitro* geraram resposta celular Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) ou resposta celular Th0 (IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α) (Brown et al., 1993). Este tipo de imunidade, também chamada de adaptativa, requer rápida ativação das células efetoras T CD4⁺ específicas do antígeno para resolução da manifestação clínica de bovinos com infecções persistentes ou já vacinados. No geral, essas células têm o papel de secretar citocinas, como IFN- γ , favorecer células de memória e ativar células B. Os linfócitos B então se diferenciam em plasmócitos, que proliferam e produzem anticorpos (Brown et al., 2006): Estes anticorpos, por sua vez, agem como opsoninas e potencializam a fagocitose na imunidade humoral (Mahoney et al., 1979).

Além disso, Mahoney et al. (1979) constataram que a administração de imunoglobulina (IgG) 2 bovina em mistura com IgG1 bovina preparada a partir de soro hiperimune (de gados infectados persistentemente com *B. bovis*) provoca imunidade passiva contra a infecção por *B. bovis*, reduzindo significativamente os níveis de parasitemia em animais esplenectomizados. Esses dois tipos de imunoglobulinas são anticorpos fixadores de complemento e a IgG1 foi detectada na formação de imunocomplexos em infecções por *B. bovis* (Goff et al., 1982). Quanto à possível proteção cruzada entre espécies, a infecção por *B. bovis* não protege o animal de ser infectado por *B. bigemina*, mas o contrário propicia alguma proteção ao animal suscetível (Wright et al., 1987).

Os aspectos de imunidade contra a bactéria *A. marginale* são pouco conhecidos. Evidências demonstram que bezerros infectados podem se recuperar da infecção aguda, mas desenvolvem infecções persistentes que resultam em oscilação de variantes antigênicas a cada manifestação, o que

dificulta estratégias de defesa por parte do sistema imune (French et al, 1998, 1999). Assim como nas infecções por *B. bovis* e *B. bigemina*, Brown et al. (1998a, 1998b) sugerem que a primeira linha de defesa da resposta inata se concentra em macrófagos e, a resposta adaptativa, em células T CD4+ de memória específica para proteína de superfície principal 1 (MSP-1), MSP-2 e MSP-3. Os resultados desse estudo com clones demonstraram a conservação de certos epítomos de células T entre MSP-2 e MSP-3 e a expressão de IFN- γ e TNF- α .

Quanto ao compartilhamento de antígenos em comum entre as espécies agentes da anaplasmoze bovina e a possível proteção cruzada, *A. centrale* é menos patogênica que a *A. marginale*, sendo que a primeira provoca uma manifestação clínica leve, mas que confere algum nível de proteção contra a segunda. Outro tipo de proteção cruzada tem sido estudado por meio da análise das sequências da proteína MSP-1, considerada um marcador genético para identificar diferentes cepas de *A. marginale*, que mostrou epítomos conservados e comuns. Essas particularidades entre espécies e entre epítomos viabilizaram estudos de transferência de imunidade passiva e a confecção de vacinas (Wright et al., 1990; Cabezas-Cruz et al., 2013).

Sendo assim, o papel central das respostas imunes nos hemoparasitas estudados neste trabalho se concentra na imunidade inata por aspectos de resistência, transferência passiva de colostro e atuação de células fagocíticas, e na imunidade adaptativa por meio dos mecanismos celular e humoral de especificidade das imunoglobulinas e citocinas na resolução das infecções.

3.4 Receptores Toll-like 2 e 4

Receptores do tipo toll-like (TLRs) são uma alternativa para avaliar a resposta imune inata do hospedeiro. Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana do tipo I, que contêm repetições ricas em leucina flanqueadas por sítios característicos ricos em cisteína em suas regiões extracelulares. Sendo assim, são moléculas de sinalização da superfície celular que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e estimulam a resposta imune apropriada (Takeda et al., 2003).

Esses receptores são encontrados em todas as formas de vida, desde insetos até mamíferos. Dez membros desta família de receptores são expressos no genoma de mamíferos (Akira et al., 2006). TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem lipídios bacterianos, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem ácidos nucléicos. O TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS), constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas, já o TLR2 reconhece peptidoglicano, componente da parede celular de bactérias gram-positivas (Hirata et al., 2007).

A ligação entre PAMPs e TLRs ativa fatores de transcrição que estimulam a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (ROI e RNI), citocinas pró-inflamatórias como o IL-12, e reguladores de expressão de moléculas coestimuladoras, que potencializam a ativação de linfócitos T e a resposta imune adaptativa. Os TLRs também se ligam a diversas combinações de moléculas acessórias, que os tornam responsáveis por aumentar a variedade de reconhecimento de produtos microbianos, que podem induzir respostas imunes inatas (Abbas et al., 2018).

A ligação entre TLR4 e um PAMP, como o LPS, constitui um potente estímulo para mediar reações imunológicas inatas. Isto porque o LPS se liga a uma proteína circulante expressa por fagócitos mononucleares, a CD14, que não possui sinal de transdução, mas é essencial para sinalização deste complexo, que passa a agir como um receptor de transdução de sinal. Este conjunto então se liga ao receptor toll-like 4 (TLR4) que, conseqüentemente, transmite sinais que promovem a ativação celular e respostas inflamatórias (Abbas et al., 2018).

A expressão de genes inflamatórios por meio de TLRs compreende a ação de intermediários adaptadores e sinalizadores, como a proteína MyD88, no caso do TLR2 e do TLR4, que ativa os fatores de transcrição NF-Kb (fator nuclear Kb) e AP-1 (proteína ativadora 1), codificando citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial (Taraktsoglou et al., 2011). Além disso, o TLR4 também conta com a proteína chamada TRIF, que leva à ativação de IRFs (fator de resposta aos interferon), e desencadeia a expressão de interferon (Abbas et al., 2018).

A presença de TLRs 1-10 nos tecidos epiteliais bovinos foi identificada por meio de ensaios de qPCR para cada um dos TLRs (Menzies e Ingham, 2006). Davies et al. (2008) relataram a expressão de TLR em células epiteliais do

endométrie bovino e moléculas efetoras não específicas para defesa contra bactérias. Polimorfismos foram identificados em receptores toll-like de bovinos e sugeriram SNPs candidatos a características imunológicas por Jann et al. (2008), indicando que estes genes são possíveis marcadores a serem estudados por ferramentas de bioinformática a fim de conhecer o caráter estrutural das proteínas sintetizadas. Análises por bioinformática identificaram domínios de hélices transmembrana na proteína expressa pelo gene TLR4, sendo eles 3 tipos de domínios de repetição ricos em leucina (LRR, LRR-TYP e LRRCT) relacionados aos PAMPs, e um de resistência a toll-interleucina 1 (TIR).

O gene TLR2 em *Bos taurus* foi mapeado na extremidade proximal do cromossomo 17 (McGuire et al., 2005) e sua expressão foi encontrada em abundância na pele de bovinos (Menzies et al., 2006). Quanto ao seu papel, estudos levantam a hipótese de que esse gene atua na imunidade inata de ovários bovinos (Price et al., 2013) e que apresenta um perfil de expressão que responde a LPS bacteriano (Taraktsoglou et al., 2011). Yang et al. (2015) demonstram que no combate à infecção causada por *Cryptosporidium parvum* há expressão de TLR2 em células epiteliais intestinais bovinas, resultando na ativação de NF- κ B e, por consequência, na produção de TNF α e IL-8, o que representa um achado para trabalhos de caracterização da resposta imune.

O gene TLR4 em *Bos taurus*, por sua vez, foi mapeado na extremidade distal do cromossomo 8 (McGuire et al., 2005) e sua sequência parcial de cDNA foi relatada em 2003 por White et al. Alguns estudos revelaram SNPs associados a características de resistência neste gene em doenças como tuberculose bovina, doença de Johne (White et al., 2003) e mastite (Wang et al., 2007). A associação entre o gene TLR4, infestações de carrapatos e concentração de histamina no sangue de zebuínos inferiram que o alelo B deste gene é candidato para resistência a carrapatos e pode ser empregado em programas de melhoramento genético (Zhao et al., 2013).

3.5 Células T $\gamma\delta$ WC1

Outros receptores celulares de interesse particular, indicadores da avaliação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, são os receptores de

células T (TCR) $\gamma\delta$ oriundos de timócitos – células T em desenvolvimento no timo. Este órgão se constitui como principal local de maturação das células T e fornece estímulos necessários para a maturação dos timócitos e formação de receptores $\gamma\delta$, mas involui com a idade e compromete as respostas via células T (Abbas et al., 2018). Em bovinos, células T $\gamma\delta$ foram localizadas em superfícies epiteliais, principalmente, pele e intestino (Mackay e Hein, 1989).

As células T $\gamma\delta$ expressas circulam no sangue periférico e, em bovinos neonatos e jovens, abrangem 60% da população de células mononucleares, o que os tornam bons modelos para estudos sobre o papel dessas células na resposta imune frente aos desafios infecciosos. Em adultos, a porcentagem de circulação dessas células no sangue periférico varia de 5 a 30% (Parker et al., 1990). As células T $\gamma\delta$ atuam como receptores de reconhecimento padrão por se ligar a patógenos e possuem diversos subconjuntos com atividades regulatórias e inflamatórias que contribuem para imunidade contra desafios infecciosos (Lahmers et al., 2005).

O rearranjo dos genes dos TCR $\gamma\delta$ culmina na expressão de subconjuntos de correceptores (Abbas et al., 2018). Dentre eles, as moléculas do correceptor WC1 (Workshop Cluster 1) destacam-se, pois são encontradas exclusivamente em células T $\gamma\delta$ de ruminantes e não possuem homólogos em células T $\gamma\delta$ humanas. Descobertos na década de 1980 (Clevers et al., 1990), esses correceptores são glicoproteínas transmembrana pertencentes à família do receptor “*scavenger*” rica em cisteína (SRCR) (Rogers et al., 2005).

Estudos de expressão gênica e de micro arranjos como os de Meissner et al. (2003) sugerem que células T $\gamma\delta$ WC1+ representam fenótipos imunorregulatórios distintos das células T $\gamma\delta$ WC1- e identificam o possível papel de resistência intracelular às infecções deste correceptor. Lahmers e colaboradores (2006) compararam perfis de expressão gênica de populações clonais de células T $\gamma\delta$ WC1+ e T CD4 $\alpha\beta$ + derivadas do mesmo animal em resposta à proteína MSP2 da bactéria *A. marginale* e encontraram maior envolvimento das células T $\gamma\delta$ WC1+.

Quanto à caracterização molecular desse subconjunto, sabe-se que são codificados por uma família multigênica composta por treze genes transcritos por

células T e com pouco polimorfismo entre os animais estudados. Além disso, esses genes expressam três isoformas altamente conservadas entre bovinos - WC1.1, WC1.2 e WC1.3 – com sequências de domínios extracelular, transmembrana e cauda intracitoplasmática específicas que divergem com base em reatividade no anticorpo monoclonal (Herzig e Baldwin, 2009).

A diferença nas isoformas encontradas se dá devido à reatividade com anticorpos monoclonais. A expressão dos genes WC1 quando em reação com um painel de anticorpos monoclonais anti-WC1 culmina em diminuição da produção não específica de IFN- γ (Kennedy et al., 2002), sugerindo que a resposta de células T $\gamma\delta$ contra antígenos está intimamente ligada à produção e proliferação de IFN- γ . Quando em desafio contra *Leptospira* spp., a resposta pode ser encontrada dentro da isoforma WC1.1 (Rogers et al., 2005), enquanto frente à infecção por *Anaplasma* spp., em WC1.2 (Lahmers et al., 2005).

A diferença fenotípica na produção de IFN- γ entre subpopulações WC1.1 e WC1.2 foram estudadas no trabalho de Blumerman et al. (2006), que detectou o compartilhamento de um conjunto de genes TRG expressos, sugerindo que o mecanismo que diverge os isótipos vai além da ligação do antígeno ao TCR. Rogers et al. (2005) por meio de clonagem e sequenciamento das caudas citoplasmáticas das isoformas WC1 sugerem que as células T WC1 + $\gamma\delta$ diferenciadas desempenham papéis diferentes nas respostas imunes. Células WC1.1+ produzem IFN- γ e/ou proliferam citocina IL-12, enquanto as células WC1.2+ respondem à peptídeos de *A. marginale* (Lahmers et al., 2005).

Sendo assim, o conhecimento dos perfis de expressão dos genes TLR2, TLR4 e WC1 frente às infecções naturais por *Babesia* spp. e por *Anaplasma* spp. é desconhecido em bezerros da raça Canchim. Isto suscita a possibilidade de inferir características de resistência em bovinos a partir da avaliação de bezerros naturalmente infectados e mapeados desde o nascimento, tornando estes genes possíveis marcadores genéticos em programas de melhoramento animal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais e colheita do material biológico

Os animais experimentais totalizaram 46 bezerros da raça Canchim (5/8 Charolês/Zebu) nascidos e criados na fazenda experimental da EMBRAPA Pecuária Sudeste, localizada em região considerada endêmica estável para Tristeza Parasitária Bovina, uma vez que são expostos às infestações por *R. microplus* durante todos os meses do ano. Os bovinos foram avaliados a cada 15 dias desde o nascimento até os 4 meses e meio de idade.

As amostras de sangue usadas nos experimentos de quantificações absoluta e relativa foram colhidas de cada animal por meio de punção da veia jugular usando sistema a vácuo em tubos contendo EDTA. Até 3 horas após o nascimento foram colhidas as amostras de sangue dos bezerros e, posteriormente, a cada quinze dias, totalizando 10 colheitas.

Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA CPPSE - EMBRAPA, cujo protocolo corresponde a 02/2017.

4.2 Quantificação absoluta do número de cópias (NC) do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*

4.2.1 Extração de DNA das amostras de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando o *kit Easy DNA* (Invitrogen, Cat. K180001) com uma alíquota de 60 μ L de sangue total de cada animal distribuídos em microtubos de 1,5 mL identificados. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de Solução A, vortexado até completa homogeneização da amostra e incubado a 65°C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 40 μ L de Solução B e realizada mais uma homogeneização por vórtex. Após essa etapa, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em novos microtubos identificados de 1,5 mL, foram distribuídos 445 μ L de TE e 5 μ L de Glicogênio, onde foi colocada a fase aquosa (superior-transparente) da mistura centrifugada anteriormente, que foi homogeneizada 10 vezes por inversão. Em seguida, foram adicionados 1 mL de Etanol 100% (-20°C) e homogeneizado 10 vezes por inversão e incubados no freezer por uma noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14000

rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi descartado cuidadosamente por inversão. Em seguida, 500 µl de Etanol 80% (-20°C), foram adicionados e homogeneizados 10 vezes por inversão. Os microtubos foram novamente centrifugados por cinco minutos a 14000 rpm a 4°C, e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Depois foram novamente centrifugados a 14000 rpm por três minutos a 4°C. Passado o tempo de centrifugação, o Etanol residual foi removido utilizando ponteiras de 10 e às vezes de 20 µl, assim como o recomendado no protocolo. Por fim, os microtubos foram deixados abertos por uma hora em fluxo laminar até que secassem. Os pellets foram eluídos em 60 µl de TE e, por meio de espectrofotometria, foram estimados os graus de pureza e a quantidade de DNA em cada amostra, usando o Nanodrop ND-1000 (Thermofisher®). Todas as amostras de DNA foram mantidas em freezer a -80°C até o momento da execução dos ensaios de qPCR para quantificação do número de cópias de DNA (NC) de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Para a quantificação das amostras foi usado o sistema de qPCR com sondas de hidrólise (Taqman) contendo o *reporter* FAM e *quencher* BQ1 (*Black Hole Quencher 1*, IDT Integrated and Technologies) e o reagente *HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix* (Solis BioDyne, Estônia). Para amplificação dos fragmentos gênicos de *B. bovis* e *B. bigemina* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam parte do fragmento do gene do citocromo b mitocondrial e produzem fragmentos com 98pb (Okino et al., 2018); para *A. marginale* foram usados oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam parte do gene da Proteína de Superfície Principal 1b (*mSP1b*) e produzem *amplicons* com 119 pb (Giglioti et al., 2019) (Tabela 1).

As condições de termociclagem para cada ensaio foram: *B. bovis*, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, seguido de 56°C por 60 segundos; *B. bigemina*, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 60 segundos; *A. marginale*, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Todas as amostras foram testadas em duplicata e incubadas no equipamento CFX™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad®).

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores e sondas para os ensaios de qPCR.

Nome	Espécie – Sequência 5'-3'	Fragmento gerado (pb)
BOS	<i>Babesia Bovis</i>	
Primer Foward	TTCCTGGAAGCGTTGATTCT	
Sonda	FAM-ACGCATTGCCCAACCCATATTGAC-BHQ1	98
Primer Reverse	AAGAAACACATTGAGCGTGAAA	
BIS	<i>Babesia bigemina</i>	
Primer Foward	TGTTCCAGGAGATGTTGATTCT	
Sonda	FAM-ACTGAGGTTAATATGGGTTGGGCACT-BHQ1	98
Primer Reverse	GAAACACATTGAGCATGGAAATAAC	
MSP1	<i>Anaplasma marginale</i>	
Primer Foward	TGGATGAAAGCCTGGAGATG	
Sonda	FAM-AAGGCCAGGCACAGATATCACAGG-BHQ1	119
Primer Reverse	TGTTTCCAGACCTTCCCTAACT	

PB= pares de bases

Para estimar o quanto do DNA alvo foi produzido em cada ciclo da reação durante a fase exponencial, utilizamos uma curva de calibração por meio da diluição em base 10 de DNA sintético - gBlocks® *Gene Fragments* (IDT) contendo sequências alvos de *B. bovis* (nt 88-279 – número de acesso: GQ214235.1), *B. bigemina* (nt 135-356 – número de acesso: GQ214234.1) (Okino et al., 2018) e *A. marginale* (nt 701-1050 – número de acesso: M59845.1) (Giglioti et al., 2019). Para cada fragmento gBlocks® (cada espécie de hemoparasita) foram usadas 5 concentrações diluídas em série na base 10, que permitiram um intervalo de detecção e/ou quantificação dos diferentes hemoparasitas (Okino et al., 2018; Giglioti et al., 2019).

Cada reação de qPCR foi preparada usando 2,0 µl de *Master mix 5x Hot Fire Pol*, 0,50 de cada oligonucleotídeo iniciador (F e R), 1,00 µl da sonda e 4,00

µl de água ultrapura. Assim, por reação foram utilizados 8 µL deste mix por tubo (Biorad®, Cat. TLS0851), 2 µL de DNA das amostras, controles e padrões. A placa foi selada, centrifugada por 15 segundos e incubada no termociclador de acordo com o perfil térmico dos oligonucleotídeos iniciadores usados para cada parasita.

Para análise dos resultados, foi utilizado o programa Bio-Rad CFX Manager. Para a validação de cada corrida de qPCR, foram consideradas Eficiências da Reação (E) que se apresentaram dentro do intervalo considerado ideal, controle positivo da extração de DNA, controle negativo da extração de DNA sem amplificação, controle negativo da qPCR (NTC) sem amplificação e valores de ciclo de quantificação (Cq) aproximados das diluições da curva padrão (OIE, 2014).

Níveis de eficiência entre 90% e 110% são considerados aceitáveis (Livak e Schmittgen, 2001) e são obtidos com o emprego do cálculo da eficiência da reação (E), o qual foi obtido por meio do software do equipamento CFX96 da BioRad®. A eficiência de amplificação deve ser determinada a partir do coeficiente angular da curva padrão (Bustin et al., 2009) por meio da equação:

$$E = 10^{(-1/\text{Slope})},$$

em que, Slope é a inclinação da linha derivada da curva padrão. A conversão do valor de E para porcentagem será efetuado da seguinte maneira:

$$\% \text{ Eficiência} = (E - 1) * 100.$$

O software do equipamento CFX96 (BioRad®) utiliza os valores dos Cqs das diferentes concentrações usadas nas curvas de calibração para calcular as quantidades iniciais de DNA de cada hemoparasita em cada amostra, sendo que amostras apresentando número de cópias (Log10) de DNA > 0 foram consideradas positivas.

Todas as amostras foram testadas em duplicata, sendo que aquelas com desvio padrão > 0,5 entre os Cqs da duplicata foram testadas novamente. O *threshold* para *Babesia bovis* e *B. bigemina* foi estabelecido em 160 unidades de fluorescência relativa (RFU) e para *A. marginale*, 200 RFU. Os dados obtidos de quantificação foram registrados em planilhas para posterior análise.

4.3 Quantificação relativa da expressão gênica

4.3.1 Extração e quantificação do RNA

Para a extração do RNA total foi utilizado o *kit RNeasy Protect Animal Blood* (Qiagen®, Cat 73224), conforme descrito a seguir: o microtubo de 2 mL contendo sangue e solução estabilizadora para RNA foi centrifugado 8000 xg e, logo em seguida, seu conteúdo foi transferido para um novo microtubo de 2 mL e adicionado o mesmo volume de etanol 70%, aproximadamente, 600 uL. O conteúdo foi homogeneizado e cerca de 700 uL foi transferido para a coluna de sílica, onde foi centrifugado por 8.000 xg por 1 minuto. Esse passo foi novamente realizado utilizando todo o conteúdo restante no microtubo. A seguir, foram adicionados à membrana de sílica o mix contendo 10 uL de DNase I e 70 uL de tampão RDD fornecidos pelo *kit* supracitado, e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido o tempo de espera, foi adicionado 350 uL do tampão RW1 com posterior centrifugação por 1 minuto a 8.000 xg. Posteriormente, por duas vezes, foi adicionado 500 uL do tampão RPE seguido de centrifugação por 1 minuto a 8.000 xg a fim de eliminar o etanol e outros contaminantes. Por fim, o RNA foi eluído em 30 ul de água livre de RNase, por centrifugação, durante 1 minuto a 8.000 xg e armazenado imediatamente em freezer – 70 °C, conforme instrução do fabricante, até a realização da RT-qPCR (transcrição reversa seguida de PCR em tempo real).

A quantificação do RNA total extraído foi analisada no espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermofisher®) a partir de uma alíquota da amostra dissolvida em água deionizada. O grau de pureza do RNA extraído foi estimado no mesmo aparelho pela razão entre as absorbâncias medidas a 260 e 280 nm e, a integridade por eletroforese em gel de agarose, por visualização das bandas do RNA ribossomal (18S e 28S).

4.3.2 Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1000 ng do RNA total extraído, com utilização do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™, Cat. 4368814) e iniciadores OligodT (Sigma). Todas as reações foram conduzidas conforme instruções dos fabricantes e em volume final de 20 µL, sendo adicionados 2,0 µL do tampão RT 10X, 0,8 µL de dNTP Mix 25X, 1,0 µL de OligodT *primers* (diluído a 0,5µg/µL), 1,0 µL da transcriptase reversa Multiscribe™, 1,0 µL do inibidor de RNase, 0,2 µL de água (totalizando 6µL de mix) e 14,0 µL do RNA diluído. As amostras foram então incubadas em termociclador (modelo T100™, Bio-Rad®), a 25°C por 10 minutos, seguido de 37°C por 120 minutos e, logo após, a 85°C por 5 minutos, para inativação da enzima. O cDNA obtido foi então armazenado a -20°C até a realização da qRT-PCR.

4.3.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores localizados em junções exón-exón da sequência de RNA mensageiro do gene codificador de receptores toll-like 2 (TLR2, número de referência no NCBI: NM_174197) e 4 (TLR4, número de referência no NCBI: NM_174198.6), e das células T $\gamma\delta$ subpopulação WC1 (WC1, número de acesso no *Genbank*: FJ031220.1), evitando-se, dessa forma, a amplificação de DNA genômico. Para tal, foi utilizado o programa computacional *Primer3* (<http://primer3.ut.ee/>), e sequências de RNAm cadastradas no *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Para verificação da qualidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados, suas sequências foram submetidas à análise por meio dos programas computacionais *Netprimer* (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimerServlet>) e *Oligoanalyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), a fim de avaliar a possível formação de dímeros e de outras estruturas secundárias que prejudicam a eficiência das reações. Para verificar a especificidade, as sequências foram submetidas ao alinhamento com as sequências depositadas no Genbank por

meio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O par de oligonucleotídeos iniciadores desenhado foi testado em ensaios de qPCR, utilizando diluições seriadas de “pool” de cDNA proveniente de 5 animais de cada tratamento. A partir disso, a regressão linear foi calculada utilizando os valores das diluições e respectivos valores de Cq obtidos, para cálculo da equação linear, coeficiente de correlação (R^2), eficiência da reação, valor de intercepção em Y e coeficiente angular. Para avaliação da qualidade de cada reação, foram utilizados os seguintes parâmetros: verificação de linearidade, eficiência > 90%; $R^2 > 0,99$ e valor de intercepção em Y de 33 a 35 (OIE, 2014).

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores para os ensaios de expressão gênica por qPCR.

Gene/Identificação	Sequência 5'-3'	Fragmento gerado (pb)
TLR2		
<i>Primer Foward</i>	GCTGCGTTGGTTTGGATAGTG	
<i>Primer Reverse</i>	AGAGAAGAAGCCTGGTCAGAGG	167
TLR4		
<i>Primer Foward</i>	CTTGCGTACAGGTTGTTTCCTA	
<i>Primer Reverse</i>	GGTCCAGCATCTTGTTGATA	99
WC1		
<i>Primer Foward</i>	GACTACAGCAGGGACCAGAACA	
<i>Primer Reverse</i>	CATCTGAGCAGCTGAGTCATCA	132

4.3.4 Genes de referência

Quatro genes de referência (GAPDH, ACTB, B2M, PPIA) foram elencados para realizar teste de estabilidade e, após escolha, servir como parâmetro no estudo das expressões gênicas. Sendo assim, seguiu-se o seguinte protocolo: o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA total extraído do sangue dos animais, usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse*

Transcrição (Applied Biosystems™, Cat. 4368814) e iniciadores Oligo dT (Sigma). Os valores de C_q (Quantification Cycle ou Ciclo de quantificação) obtidos após amplificação por RT-qPCR foram analisados por dois programas computacionais - Bestkeeper e Normfinder – a fim de selecionar os genes de referência. No programa BestKeeper © - versão 1, os genes mais estáveis foram B2M e PPIA, apresentando maiores coeficientes de correlação (0,750 e 0,753, respectivamente), e menores valores do coeficiente de variação (2,44 e 2,29, respectivamente). Já os resultados do software Normfinder apontaram B2M como mais estável, com um valor de estabilidade de 0,131 e a melhor combinação de genes foi a associação de B2M e PPIA, com um valor de estabilidade de 0,098. Assim, o B2M e o PPIA foram usados como genes de referência neste estudo de expressão de genes relacionados ao sistema imunológico de bovinos.

4.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)

Para a otimização dos ensaios de qPCR na amplificação dos 5 genes avaliados (2 genes de referência e 3 genes-alvo), amostras de cDNA estocadas a -20°C e sintetizadas a partir de um *pool* de RNA extraído de sangue bovino foram utilizadas. As reações foram conduzidas no termociclador CFX™ *Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad®), com intercalante de DNA SYBR Green Tipo I, utilizando-se o *kit Quantinova SYBR Green PCR* (Qiagen, Cat. 208052), em microplacas ópticas (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Cat. N8010560), seladas com adesivos ópticos (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Cat. 4311971). Em volume final de 15,0 µL, foi preparada mistura de reação composta por 7,5 µL de 2X *Quantinova SYBR Green PCR, Master Mix*, 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores diluídos a 10 µM (3 pmol por reação) e 4,9 µL de água ultrapura, à qual foram adicionados 5,0 µL do cDNA diluído a 10 ng/µL (20ng por reação).

As condições de termociclagem testadas consistiram em 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 30 s na temperatura de anelamento específico para cada oligonucleotídeo iniciador. Para a validação de cada corrida de qPCR, foram consideradas eficiências da reação (E), que se apresentaram dentro do intervalo considerado ideal

(amplitude aceitável entre 90-110%) (Livak e Schmittgen, 2001), controle positivo da extração de DNA, controle negativo da extração de DNA sem amplificação, controle negativo da qPCR (NTC) sem amplificação e valores de Cq aproximados das diluições da curva padrão (OIE, 2014).

Os resultados foram expressos em valores de ciclo de quantificação (Cq). Para análise quantitativa, foi adotada a mesma quantidade de cDNA em todas as reações e foi utilizada a média dos valores de Cq obtidos da duplicata pelo programa Bio-Rad CFX Manager e compilados em planilhas para posterior análise quantitativa da expressão de cada gene alvo. Para o cálculo da expressão gênica relativa, foi utilizado o método descrito por Livak e Schmittgen (2001).

4.4 Análise de dados

Os dados de número de cópias dos DNA alvo de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* foram analisados por meio de um modelo misto após terem sido transformados em $\log_{10}(n+1)$ visando aproximação de uma distribuição normal. O modelo, considerando as medidas repetidas no mesmo animal, incluiu os efeitos de parasita, colheita e interação parasita x colheita e animal como efeito aleatório. O procedimento MIXED do pacote estatístico SAS® foi utilizado para as análises e a matriz de covariância escolhida foi o produto direto (“produto de Kronecker”) de uma matriz simétrica não estruturada para os parasitas e uma matriz de simetria composta para as colheitas. A comparação entre as colheitas para cada parasita e entre os parasitas para cada colheita foram realizadas por meio da aplicação de contrastes.

As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando um modelo misto descrito por Steibel et al (2009) para analisar conjuntamente a expressão de genes alvo e de referência:

$$y_{gijkl} = GPC_{gij} + A(P)_{ik} + AC(P)_{ijk} + GA(P)_{gik} + GAC(P)_{gijk} + e_{gijkl},$$

onde y_{gijkl} é o valor do Cq obtido conforme descrito anteriormente para os genes estudados (TLR4 e WC1), ou a média geométrica do Cq dos dois genes referência utilizados (B2M e PPIA), C representa a colheita, P representa a

classe de precedência do animal com relação à detecção de infecção pelos hemoparasitas, G é o gene e A representa o animal. GPC_{gij} é o efeito da classe de precedência i e da colheita j na expressão do gene g .

O modelo linear misto acima descrito permite computar p -valores válidos com várias hipóteses de interesse e de forma conjunta (Steibel et al., 2009). Para as análises estatísticas realizadas no presente estudo, assumimos o valor de $p < 0,05$ para indicar expressão gênica diferencial.

4.4.1 Modelo de classes de precedência

Neste trabalho propomos um modelo de análise baseado na precedência com que o animal ultrapassa determinado limiar do número de cópias do DNA alvo de qualquer um dos patógenos (estabelecido em 2,0 para o $\log(Nc+1)$) nas amostras de sangue coletadas. Sendo assim, avaliamos o nível de infecção da amostra e reunimos grupos de animais de acordo com as colheitas em que foi ultrapassado o limiar estabelecido, identificando assim grupos em que as infecções ocorreram logo nas primeiras colheitas ou mais tardiamente ao longo do tempo de estudo. Como houve ampla variação entre os animais quanto à colheita em que o limiar foi ultrapassado, os animais foram agrupados em três classes de precedência (3, 4 e 5) para a realização das análises. A classe 3 corresponde ao grupo de animais que ultrapassou o limiar estabelecido nas colheitas 1, 2 e 3; a classe 4 corresponde ao grupo de animais que ultrapassou o limiar estabelecido na colheita 4 e a classe 5 corresponde ao grupo de animais que ultrapassou o limiar estabelecido a partir da colheita 5 até a colheita 10.

Estas análises nos permitiram obter e comparar para cada gene alvo as médias do nível de expressão por colheita, por classe de precedência de infecção pelos hemoparasitas e pela ordem sequencial de colheita (1 a 10).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação absoluta do número de cópias (NC) do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*

A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase está cada vez mais consolidada em estudos genéticos devido à sua alta especificidade, sensibilidade e elevada reprodutibilidade. No entanto, a PCR convencional permite apenas a detecção qualitativa da infecção, sendo a amostra do animal submetida à análise positiva ou negativa para a presença do material genético do hemoparasita testado (Oliveira et al., 2005). Entretanto, a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) permite quantificar o número de cópias de fragmentos de DNA de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. em amostras extraídas de sangue bovino (Bilhassi et al., 2014; Okino et al., 2018; Gigliotti et al., 2016, 2018, 2019), além de permitir estudos de expressão de genes de interesse (Menzies et al., 2006; Price et al., 2013; Taraktsoglou et al., 2011).

Todos os resultados de qPCR deste trabalho foram medidos em médias do número de cópias de DNA expressas em Log10 para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* e estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 1.

Os resultados das análises por meio do modelo proposto indicam que a partir da terceira colheita as médias do número de cópias de DNA obtidas em cada colheita de amostras para *B. bigemina* foram sempre maiores que as de *B. bovis* ($p < 0,05$). Já havia sido relatado na literatura parasitemia mais intensa quando o animal foi acometido por *B. bigemina* em relação a *B. bovis* (Kessler et al., 1987; Gluglielmone et al., 1989). Esses resultados diferem dos observados por Gigliotti et al (2016), que obtiveram níveis de infecção por *B. bovis* superiores aos de *B. bigemina* em cinquenta e um bovinos Angus por análise de PCR quantitativa. Entretanto, Gigliotti et al. (2018) relataram constatações sobre a parasitemia semelhantes às do presente estudo para 36 novilhas Canchim. Naquele trabalho, as médias do número de cópias de DNA seguidas de erros padrão para *B. bigemina* ($2,85 \pm 0,41$) foram maiores que as de *B. bovis* ($2,58 \pm 0,45$) na avaliação quantitativa sob as condições de mesma região experimental e mesma raça de estudo do presente trabalho.

Maiores taxas de infecção por *B. bigemina* em relação a *B. bovis* observadas na maioria das colheitas também são relatadas em trabalhos com avaliação qualitativa por PCR convencional. Em região experimental diferente deste trabalho, Chaudhry et al (2010) avaliaram 100 bovinos mestiços e identificaram 29% de animais positivos para *Babesia* spp., sendo 18% positivos

para *B. bigemina* e 11% para *B. bovis*. Entretanto, taxas de infecção mais altas foram relatadas para ambas as espécies por Oliveira et al. (2008) que encontraram 100% de infecção por *B. bigemina* em 15 bezerros e 15 vacas utilizando nested-PCR enquanto Bilhassi et al. (2014), utilizando qPCR, diagnosticaram *B. bovis* em 98% (147/150) de bezerros e vacas das raças Angus e Nelore e cruzamentos entre ambos.

Tabela 3. Médias de número de cópias de DNA expressas em Log10 obtidas pela técnica de qPCR bem como o número de animais positivos [+ (n)] para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* obtidos com o uso dessa ferramenta diagnóstica.

		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
<i>Babesia bovis</i>	Log10	0	0,07	0,29	0,18	0,43	0,55	0,71	1,12	1,15	1,64
	+(n)	0/46	2/46	7/46	6/46	13/46	17/46	18/46	29/46	35/46	43/46
<i>Babesia bigemina</i>	Log10	0	0,085	0,75	1,89	1,88	2,15	2,21	2,00	2,58	3,00
	+(n)	0/46	1/46	13/46	28/46	30/46	36/46	38/46	36/46	41/46	45/46
<i>Anaplasma marginale</i>	Log10	0,46	0,19	0,61	1,84	3,39	4,54	4,75	4,73	4,81	4,83
	+(n)	14/46	12/46	12/46	31/46	41/46	42/46	44/46	43/46	42/46	44/46

Além disso, pode-se também observar que a parasitemia causada por *A. marginale* é ainda maior que a causada por *B. bovis* e *B. bigemina* a partir da quinta colheita, o que possivelmente está relacionado ao ciclo de vida da bactéria, sendo capaz de gerar altas cargas bacterianas em pequenos intervalos de tempo (Kessler et al., 2001). Quanto ao aumento gradual no número de animais positivos aos longos das colheitas, confirma-se a presença destes animais sob condições de estabilidade endêmica e, portanto, expostos aos agentes infecciosos de forma permanente.

Há de se ressaltar também que em nenhuma das hemoparasitoses houve transmissão transplacentária, como observado na Tabela 1, mesmo que o experimento tenha ocorrido numa região de estabilidade endêmica. Este resultado diverge do descrito por Barbosa et al. (1994), Bracarense et al. (2001), Santarosa et al. (2013) para *Babesia* spp., que apresenta manifestação de casos isolados, e dos trabalhos de Norton et al. (1983) e Brito et al. (2019) para *A.*

marginale. Também há relato da transmissão de ambos os agentes para o mesmo animal (Costa et al., 2016), o que não ocorre em nossos estudos. Para Brito et al. (2019), essa taxa de transmissão varia de nula a moderada para babesioses, sendo mais comum em anaplasmoses bovinas.

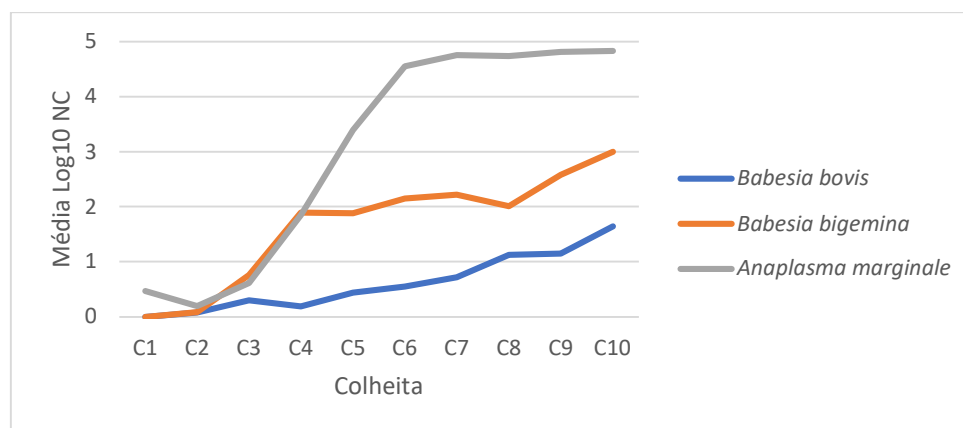


Figura 1. Média dos valores de número de cópias (NC) expressa em Log10 para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* com diagnóstico realizado pela técnica de qPCR, distribuída por colheita de amostras.

Nas três espécies de hemoparasitas estudados, houve uma tendência de aumento da bacteremia/parasitemia ao longo das colheitas. Devido à imunidade inata e à ingestão de colostro que lhes confere alta carga de imunoglobulinas, os bezerros apresentam certa resistência contra as infecções. Após o período de aproximadamente 30 dias, esses animais começam a apresentar menor quantidade dessas proteínas protetoras e ainda não são capazes de produzir uma resposta imunológica completa, o que os tornaram mais susceptíveis aos parasitas *B. bovis* e *B. bigemina* e a bactéria *A. marginale* (figura 1).

O nível e a taxa de infecção por *A. marginale* tiveram aumento crescente entre a segunda e sexta colheitas, com destaque para a colheita 5 com 33% a mais de animais infectados que a colheita 4 (Tabela 3, Figura 1). Essa persistência da enfermidade após as manifestações primárias é relatada (French et al, 1998), mas o comportamento crescente do nível de infecção diverge do descrito por Ericks et al (1993), que demonstram que ciclos de rickettsemia ocorrem em intervalos de, aproximadamente, 5 semanas.

O predomínio de infecção de *A. marginale* em relação às infecções por *Babesia* spp. observado na Tabela 3 também é descrita no estudo de Souza et

al. (2013), no qual 202 bovinos foram avaliados por PCR e 76,2% deles apresentaram diagnóstico de *A. marginale*, enquanto 52,0% apresentaram *B. bigemina* e, 33,2%, *B. bovis*. Entretanto, esses resultados não corroboram com os descritos por Vieira et al. (2019), que utilizaram uma PCR Multiplex para triar infecções em 257 animais e demonstraram que as prevalências de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* foram de 27%, 16% e 29%, respectivamente.

A interpretação dos resultados por meio da quantificação dos números de cópia de DNA alvo obtidos na qPCR facilita a compreensão dos níveis de infecção. Essa informação facilita também a caracterização da parasitemia e a associação com outras informações, como expressão de genes de interesse, culmina no melhor entendimento das vias metabólicas envolvidas na resposta imune.

5.2 Quantificação relativa da expressão gênica

As análises realizadas para os genes TLR2, TLR4 e WC1 de acordo com o modelo proposto revelaram efeito significativo da interação entre a colheita, a classe de precedência do nível de infecção e o gene sobre o Cq dos genes (alvo e referência). Além da variação nos valores de Cq entre os genes referência e o gene alvo observada em análises comuns de expressão gênica, o modelo proposto permite que o desdobramento dessa interação seja avaliado por meio de contrastes e dessa forma testar diversas hipóteses para o gene de interesse. No caso do presente estudo foram testadas as diferenças entre as colheitas; as diferenças entre os tratamentos (classes de precedência) e as interações entre colheita e tratamento. A montagem dos contrastes foi realizada de acordo com Steibel et al. (2009), o que permite que as hipóteses sejam testadas em valores equivalentes ao $-\Delta\Delta Cq$ (Livak et al., 2001).

No que se refere ao gene TLR2, para análises no desdobramento da interação colheita, classe de precedência e gene foram identificadas diferenças significativas entre as médias das colheitas e a interação entre as classes de precedência e as colheitas, mas não foram identificadas diferenças significativas entre as médias das classes de precedência. Na figura 2 é apresentado o valor

equivalente ao $-\Delta\Delta Cq$ (eixo da direita) em cada colheita (C1 a C10) em relação à décima colheita (C10), que é apresentada apenas como referência.

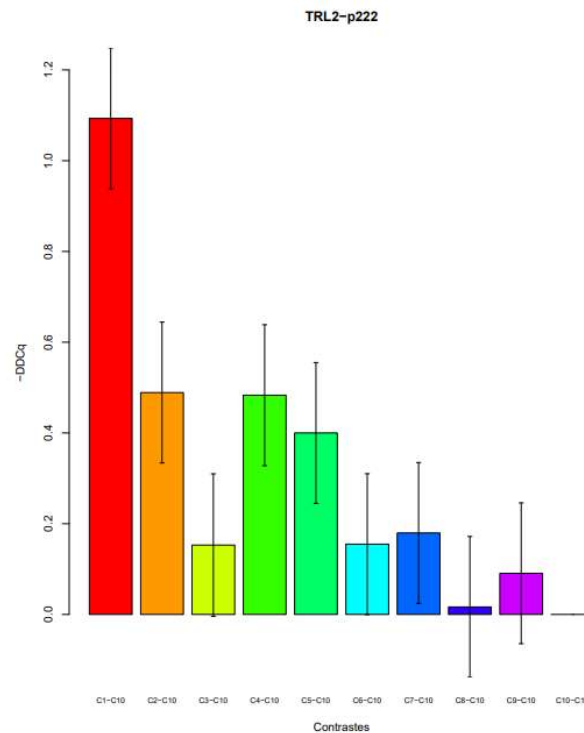
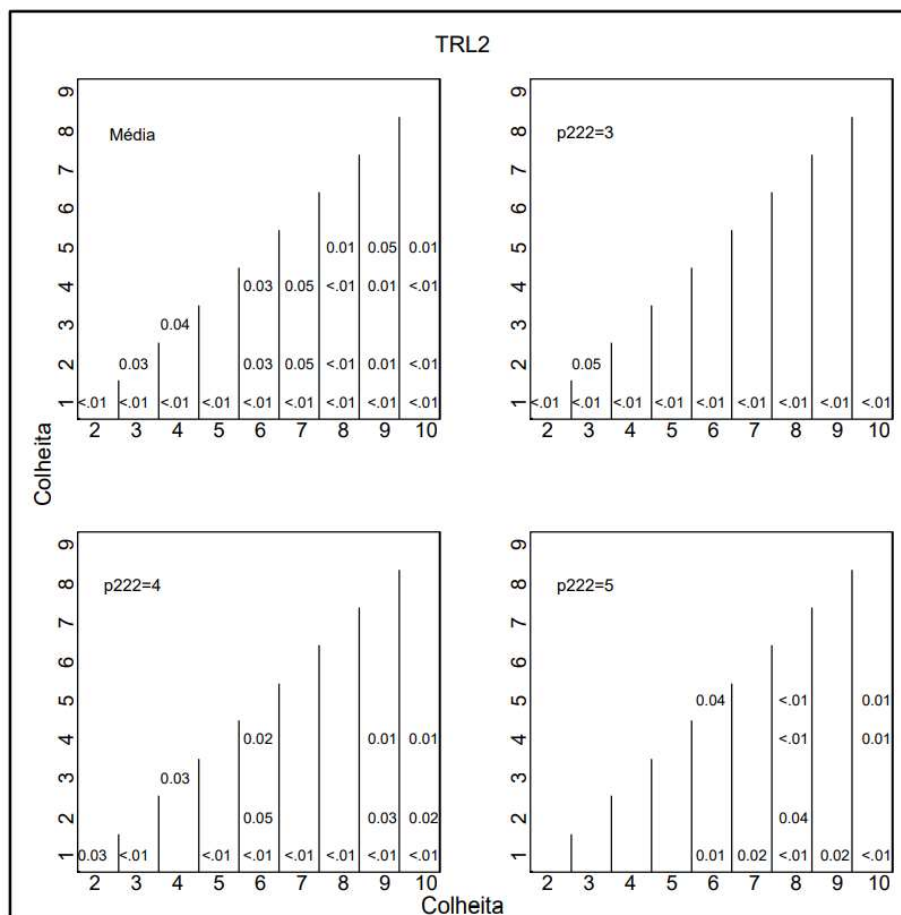


Figura 2. Diferenças da expressão do gene TLR2 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$, segundo o modelo proposto.

As diferenças entre as médias das colheitas evidenciam a C1 como a colheita de maior expressão do gene TLR2 (figura 2) e oscilações sucessivas até C10. As diferenças de C1 para todas as demais foram sempre significativas ($p < 0,05$). Com relação às demais anotações, entre C2 e C4, por exemplo, não houve diferença, entretanto, essas duas diferiram significativamente das cinco colheitas onde a expressão era mais baixa (C6 a C10). Também foram significativas as diferenças entre C5 e as três últimas (Quadro 1).



Quadro 1. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência, segundo o esquema p222 para o gene TLR2.

O resultado apresentado na Figura 2 indica que a atividade predominante desse gene ocorre na primeira colheita, ou seja, quando os animais são infectados logo após o nascimento. Essa demanda de TLR2 é descrita em trabalhos que revelam o perfil de expressão desse gene no desenvolvimento de mecanismo imune inato frente às infecções de *Staphylococcus aureus* (Karthikeyan et al., 2016) e *Cryptosporidium parvum* (Yang et al., 2015). Karthikeyan et al. (2016), por exemplo, demonstram a presença de TLR2 em vacas com mastite subclínica em comparação com vacas híginas, enquanto Yang et al. (2015) demonstram a ativação da via de sinalização NF- κ B e Taraktsoglou et al. (2011) elucidam o uso de uma proteína adaptadora nesta via, que, por consequência, leva à produção de TNF- α e IL-8 para efetivação da resposta imune inata. Além dessa resposta inicial em C1, há oscilações na

atividade desse gene da C2 até C10 apresentadas na Figura 2, o que revela sua expressão ao longo das colheitas analisadas.

Na figura 3 pode-se observar que as diferenças em relação a C10 divergem entre as classes de precedência e variam em termos de amplitude, sendo um pouco maior na classe de precedência 3, mas com C1 apresentando a máxima expressão gênica de TLR2 em todas as classes. Com relação à C1, as diferenças significativas na primeira classe de precedência ocorrem em todas as colheitas, entretanto, na classe 4, não ocorre em C4 e, na classe 5, não ocorre nas quatro primeiras (C2 a C5), evidenciando a divergência entre os tratamentos (Quadro 1).

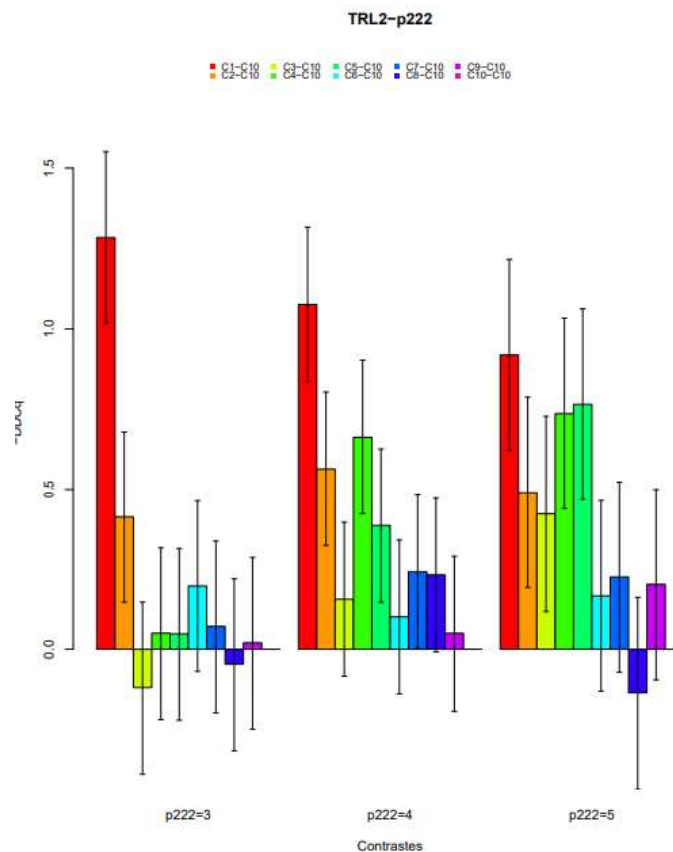


Figura 3. Diferenças da expressão do gene TLR2 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.

Esses resultados sugerem que o perfil de expressão gênica de TLR2 para este estudo segue um padrão de expressão somente em relação à C1, sendo diferente em todas as colheitas sob os diversos tratamentos. Sendo assim,

animais que se infectaram de forma precoce, ou seja, imediatamente após o nascimento, apresentaram níveis iniciais de maior expressão seguidos de posterior oscilação.

O comportamento de diminuição imediata de expressão após C1 (Figuras 2 e 3) na classe 3 sugere um menor recrutamento desse gene a partir dos 15 primeiros dias, o que nos leva a inferir que após possíveis reinfecções, a demanda por resposta via TLR2 diminua. Desta forma, temos que o primeiro contato com o patógeno seja o ponto de maior demanda de atividade gênica neste modelo, sendo a C1 responsável pelas diferenças significativas em relação a todas as colheitas no espectro de média na classe 3 e na maior parte da classe 4 (Quadro 1). Como a quantidade de animais positivos para cada patógeno possui distribuição parecida entre as classes, é possível que os animais das classes 3 e 4, portanto, àqueles que apresentaram a doença nas colheitas 1,2,3 e na colheita 4, possuam maior atividade gênica de TLR2 neste modelo.

Sendo assim, a comparação entre as colheitas para cada parasita e entre os parasitas para cada colheita permitiu a análise desses contrastes e associação de resultados de expressão que, neste caso, evidenciam maior expressão de TLR2 nos primeiros 60 dias de vida em animais infectados naturalmente com os hemoparasitas estudados. Wang et al. (2011), por exemplo, exibiram resultado diferente, sendo exibido um perfil de maior expressão de TLR2 em células saudáveis em relação às células expostas ao *M. bovis* em estudos com macrófagos bovinos. Entretanto, a imunidade via TLR2 se integra aos demais tipos de resposta imune com o decorrer das infecções, o que pode explicar essa variação de atividade.

A escolha do gene TLR2 para estudos de expressão em bovinos se deu devido ao seu reconhecimento de diversos ligantes como LPS, peptídeo glicano e lipoproteínas bacterianas, o que suscita a hipótese de que este gene atue na sinalização da imunidade inata diante de infecções. Alguns estudos evidenciam o papel deste gene, como apresentado por Yang et al. (2015) no contexto da infecção de *C. parvum*, parasita causador da diarreia em bezerros neonatos, em que células epiteliais do intestino promovem resposta imune via TLR2 e TLR4 e indução da via de sinalização NF- κ B (Yang et al, 2015). Outros reiteram a ligação de TLR2 com ligantes específicos, como o trabalho de Price et al. (2013), que

comprovam a funcionalidade de TLR2 e TLR4 em células da granulosa de folículos dominantes ovarianos estimuladas com LPS bacteriano. Neste contexto, os resultados de expressão de TLR2 no enfrentamento de infecções causadas pelos agentes da Tristeza Parasitária Bovina relatados neste trabalho levam ao entendimento de sua participação na resposta imunológica do hospedeiro nos primeiros meses de vida.

Com relação às comparações entre as classes de precedência, que podem ser observadas na figura 4, nenhuma diferença significativa foi observada. Nota-se comportamento diferente do observado para os demais genes deste estudo, visto que a classe 4 apresenta maior expressão em relação à classe 3 (barra vermelha); a classe 5 apresenta maior expressão em relação à classe 3 (barra verde) e, por último, a classe 5 com maior expressão em relação à classe 4 (barra azul). Portanto, temos que a classe 5 tem maior expressão que classe 4 e esta, por sua vez, maior expressão que a classe 3.

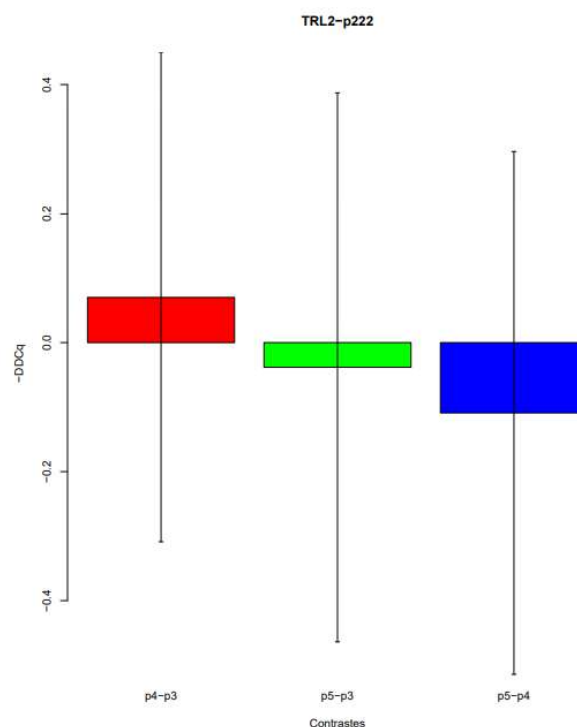


Figura 4. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para o gene TLR2.

Por outro lado, as diferenças entre as classes de precedência em cada colheita, variaram bastante como pode ser visto na figura 5, mas nenhuma foi significativa ($p < 0,05$).

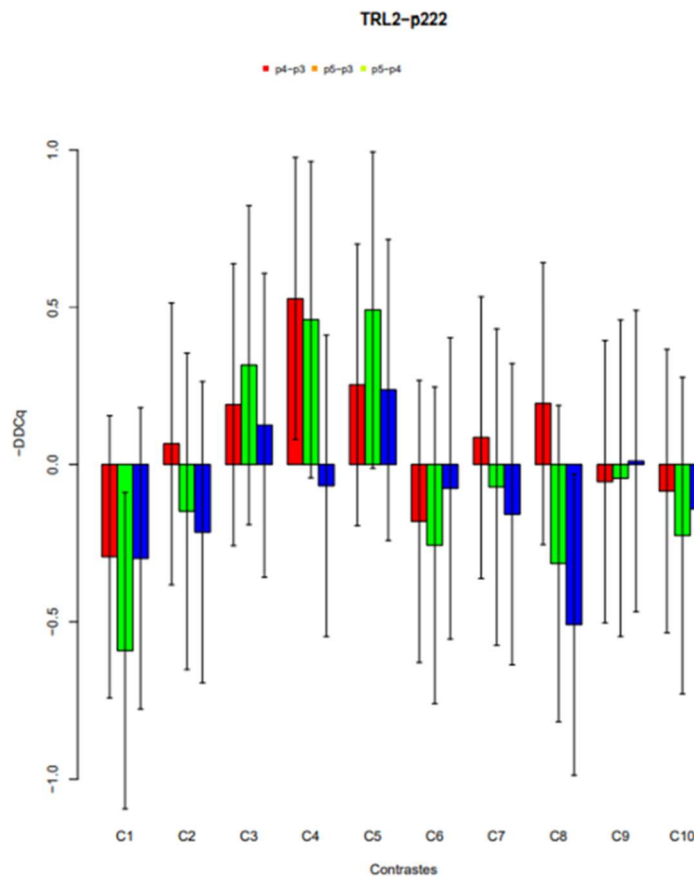


Figura 5. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para cada colheita (C1 a C10) do gene TLR2.

Os genes TLR2 e TLR4, apesar de diferirem em localização cromossômica atuam na ativação da mesma via de sinalização da resposta inflamatória (Abbas et al., 2018), o que implica em trabalhos que estudem a atividade de ambos diante de infecções como os de Ibeagha-Awemu et al. (2008), Price et al. (2013) e Yang (2015). Diante disso e do obtido em nossos resultados, podemos afirmar que o perfil de expressão de TLR2 difere da expressão de TLR4, a seguir apresentada, no entanto, ambos podem estar relacionados ao enfrentamento de infecções causadas por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Para as análises do gene TLR4 no desdobramento da interação colheita, classe de precedência e gene foram identificadas diferenças significativas entre as médias das colheitas e a interação entre as classes de precedência e as colheitas, mas não foram identificadas diferenças significativas entre as médias das classes de precedência. Entretanto, em comparativo com os genes TLR2 e WC1, obtivemos mais diferenças significativas entre os diversos tratamentos. As diferenças entre as médias das colheitas evidenciam a C3 como a de maior expressão do gene TLR4 (figura 6) e uma queda progressiva a partir daí até C10 (colheita referência). As diferenças entre as quatro primeiras e as seis demais menos expressas foram sempre significativas ($p < 0,05$). Também foram significativas as diferenças entre C2 e C3 e entre C1 e C4 e entre C3 e C4 (Quadro 2).

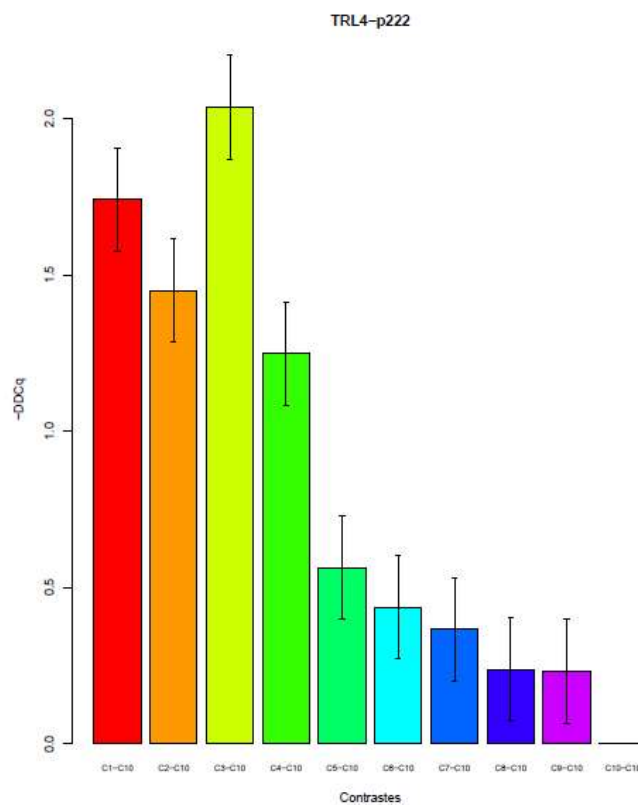
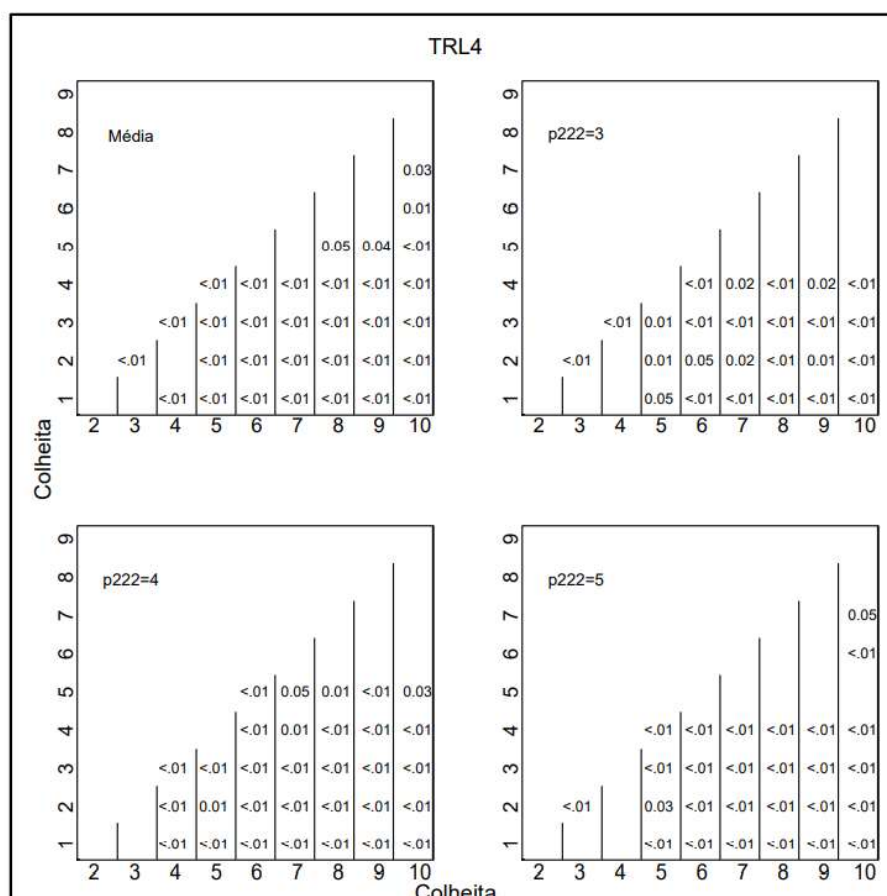


Figura 6. Diferenças da expressão do gene TLR4 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.

Este resultado revela a atividade desse gene desde o nascimento dos bezerros com declínio de expressão a partir da C3, mas se apresentando ao

longo das colheitas quando os animais entraram em contato com os patógenos quantificados por qPCR. Neste sentido, essas informações observadas de expressão imediata (desde o nascimento) e aumento de acordo com a demanda do sistema de defesa, sugerem um perfil de participação na imunidade inata por meio da análise de TLR4 expressos em amostras de sangue de animais infectados naturalmente pelos hemoparasitas estudados. Células epiteliais bovinas estimuladas com LPS de bactéria gram-negativa também revelaram expressão de TLR4, desencadeando resposta imune inata e confirmando seu papel de reconhecimento de PAMPs (Fu et al., 2013). Do mesmo modo, Ezz et al. (2019) encontraram a expressão desse gene nas células epiteliais do endométrio bovino em resposta à presença de espermatozoides, desencadeando a imunidade inata local uterina com indução de um pró-inflamatório.



Quadro 2. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência, segundo o esquema p222 para o gene TLR4.

Na figura 7 pode-se observar que o padrão das diferenças em relação a C10 é semelhante em todas as classes de precedência, variando um pouco a amplitude das diferenças que é maior na classe de precedência 5, mas com C3 sendo a máxima expressão gênica de TLR4 em todas as classes. Todas as diferenças entre as quatro primeiras e as cinco últimas colheitas nas três classes de precedência foram também significativas, evidenciando a semelhança entre os padrões (Quadro 2). Esses resultados sugerem que o perfil de expressão gênica desse gene segue um padrão, independentemente da idade com que é ultrapassado o limiar de nível de infecção estabelecido. Sendo assim, os animais estudados neste modelo para o gene TLR4 apresentaram níveis iniciais de maior expressão com posterior declínio em todas as classes, no entanto, aqueles reunidos na classe 5, ou seja, infectados a partir da quinta colheita apresentaram maior amplitude de expressão em relação às demais classes.

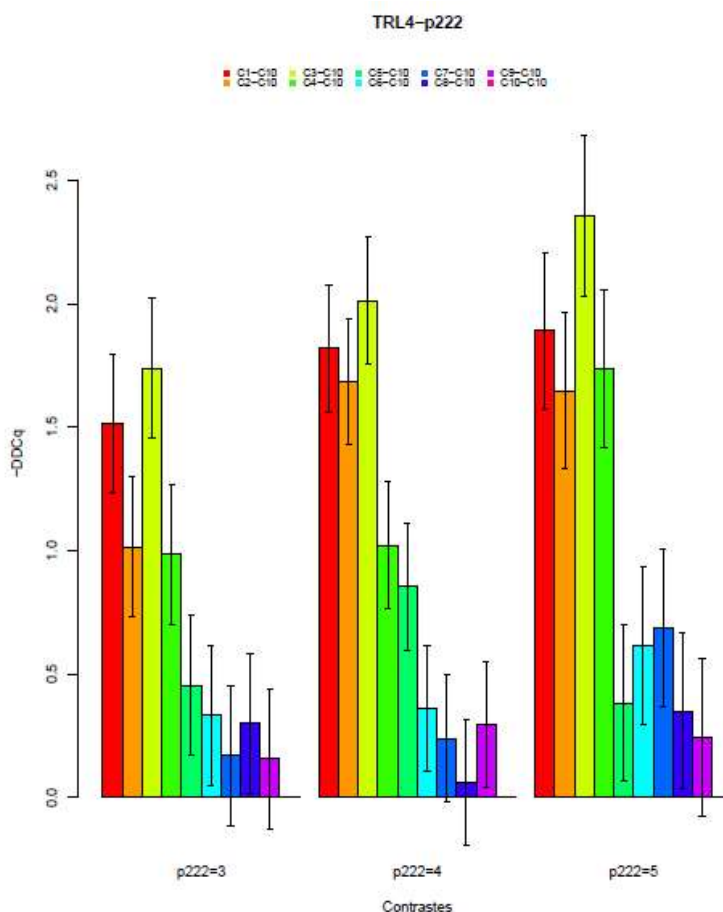


Figura 7. Diferenças da expressão do gene TLR4 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.

Com relação às diferenças entre as classes, que podem ser observadas na figura 8, nenhuma significância foi observada. Nota-se comportamento semelhante ao observado para o gene WC1, em que a classe 3 apresenta maior expressão em relação à classe 4 (barra vermelha) e a classe 5 apresenta maior expressão em relação à classe 3 (barra verde) e em relação à classe 4 (barra azul). Portanto, temos que a classe 5 tem maior expressão que classe 3 e esta, por sua vez, maior expressão que a classe 4.

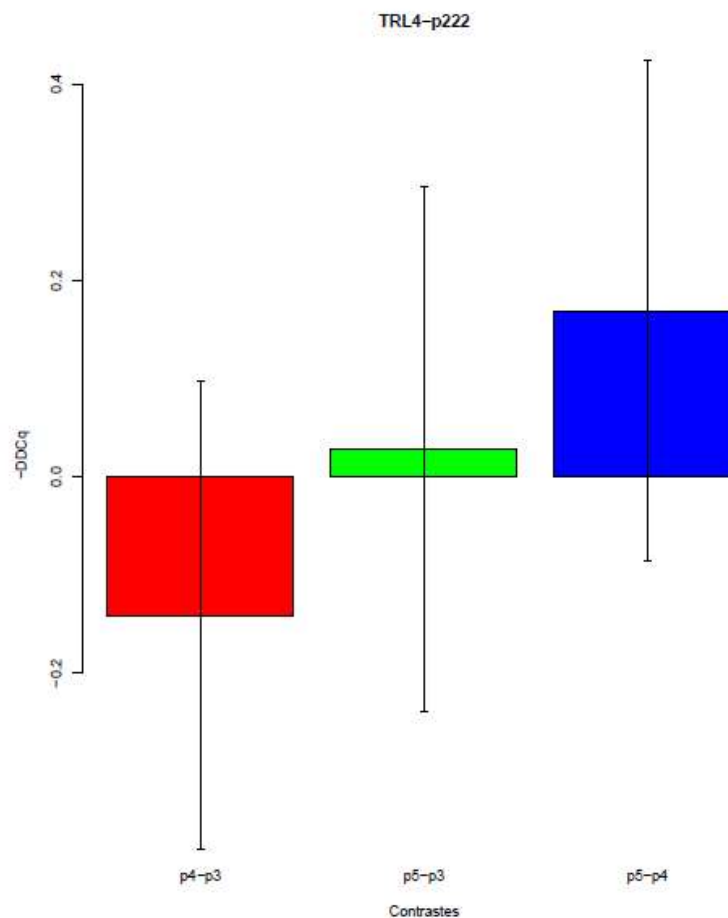


Figura 8. Diferenças entre as classes de precedência (p222), dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para o gene TLR4.

Por outro lado, as diferenças entre as classes de precedência em cada colheita, variaram bastante como pode ser visto na figura 9. Nesse caso, a diferença entre as classes 5 e 4 em C4 foi significativa ($p < 0,05$).

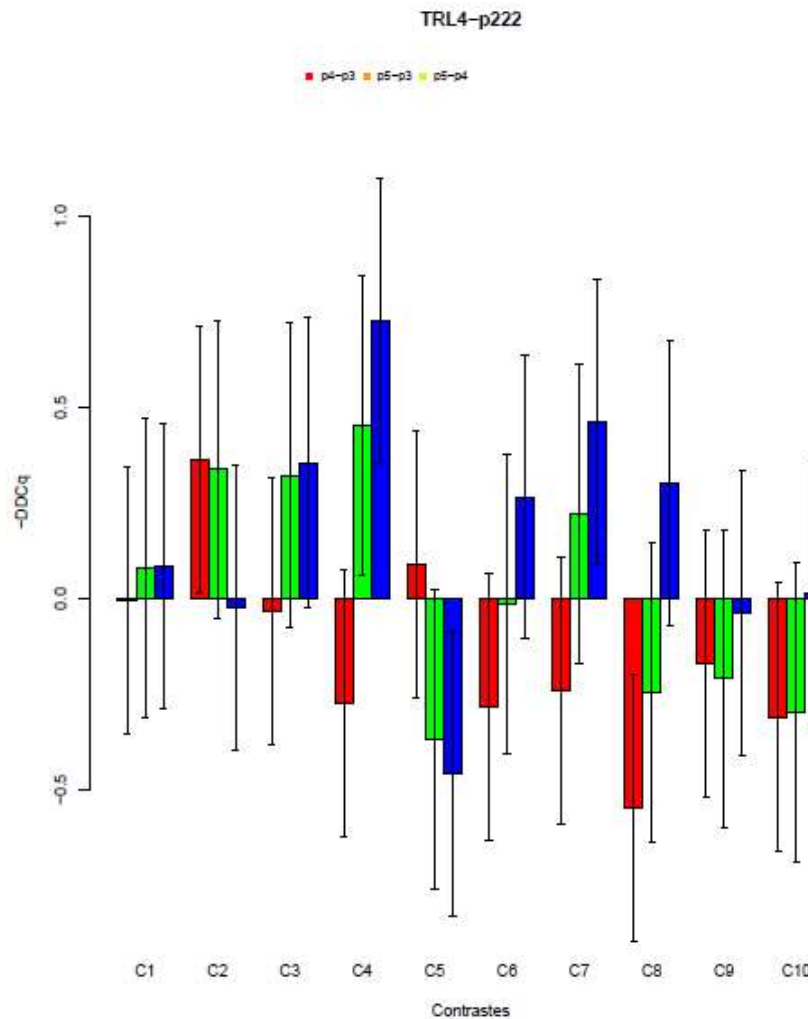


Figura 9. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para cada colheita (C1 a C10) do gene TLR4.

Ibeagha-Awemu et al. (2008) incubaram uma linhagem de células epiteliais mamárias bovinas na ausência e na presença de LPS de *Escherichia coli* por 24 horas e observaram que a expressão do receptor TLR4 crescia à medida que a concentração de LPS aumentava, revelando correlação positiva entre eles e influência sobre as respostas imunes. Entretanto, no nosso trabalho foram observadas oscilações de expressão com o passar das colheitas que impedem esse tipo de associação com maior nível de infecção, mas sugerem, por exemplo, que na C4 - colheita com segunda maior expressão gênica na classe 5 e com significância na diferença entre as classes 5 e 4 - os grupos de animais analisados podem ter se reinfectado ou apresentarem maiores parasitemias e, conseqüentemente, maiores demandas de atividades gênicas.

Entretanto, inferências específicas em C4 são dificultadas, pois o fenótipo dos animais experimentais não apresentou nenhuma variação evidente, permanecendo ao longo do tempo de estudo com o mesmo manejo e as mesmas condições as quais estava submetido inicialmente.

Há de ressaltar que o entendimento dos mecanismos biológicos implicam no estudo completo de vias de sinalização, mas as evidências desse estudo levam a melhor compreensão do papel do gene TLR4 na resolução de infecções causadas por *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. Ainda assim, sugerimos, como perspectiva futura, que as diferenças de expressão no comportamento de TLR4 podem ser explicadas por investigação de polimorfismos, o que torna este trabalho um ponto de partida para estudo genômicos detalhados de TLR4 como marcador de resistência em bovinos.

Para as análises do gene WC1 no desdobramento da interação colheita, classe de precedência e expressão do gene, foram identificadas diferenças significativas entre as médias das colheitas, e a interação entre as classes de precedência e as colheitas, mas não foram identificadas diferenças significativas entre as médias das classes de precedência, assim como nos demais genes estudados. Na figura 10, pode-se verificar que as diferenças relativas aumentam desde C1 até C4, quando a diferença em expressão é máxima neste estudo. A partir de C4 as diferenças diminuem até atingir um mínimo em C8, oscilando um pouco em C9. A identificação do perfil de resultados elucidados na figura 10 revela a atividade desse gene durante todas as colheitas em comparativo com os resultados dos genes de referência, destacando-se pelo aumento crescente da diferença de expressão em relação à C10 desde o nascimento até a colheita 4, ou seja, durante o primeiro mês e meio de vida dos bezerros.

Entretanto, apesar da diminuição a partir da colheita 5, ainda se observa a diferença de expressão desse gene, inferindo que exista ação ao longo do estudo. Esse resultado identifica padrões diferentes de expressão ao longo do período sujeito ao enfrentamento das infecções naturais - babesiose e anaplasiose, no qual os animais estão susceptíveis durante essa fase da vida, o que pode ser relacionado ao fato de que o gene WC1 é codificado por uma família multigênica (Herzig e Baldwin, 2009) e diferenças no resultado de expressão podem resultar da modulação de diferentes isoformas WC1 (Rogers

et al., 2006). Rogers et al. (2005) por meio de clonagem e sequenciamento das caudas citoplasmáticas das isoformas WC1 sugerem em seus estudos que as células T WC1+ $\gamma\delta$ diferenciadas desempenham papéis diferentes nas respostas imunes. Como, em nosso estudo, optamos por trabalhar com a sequência gênica WC1 não diferenciada, inferimos que diferentes isoformas podem estar sendo expressas.

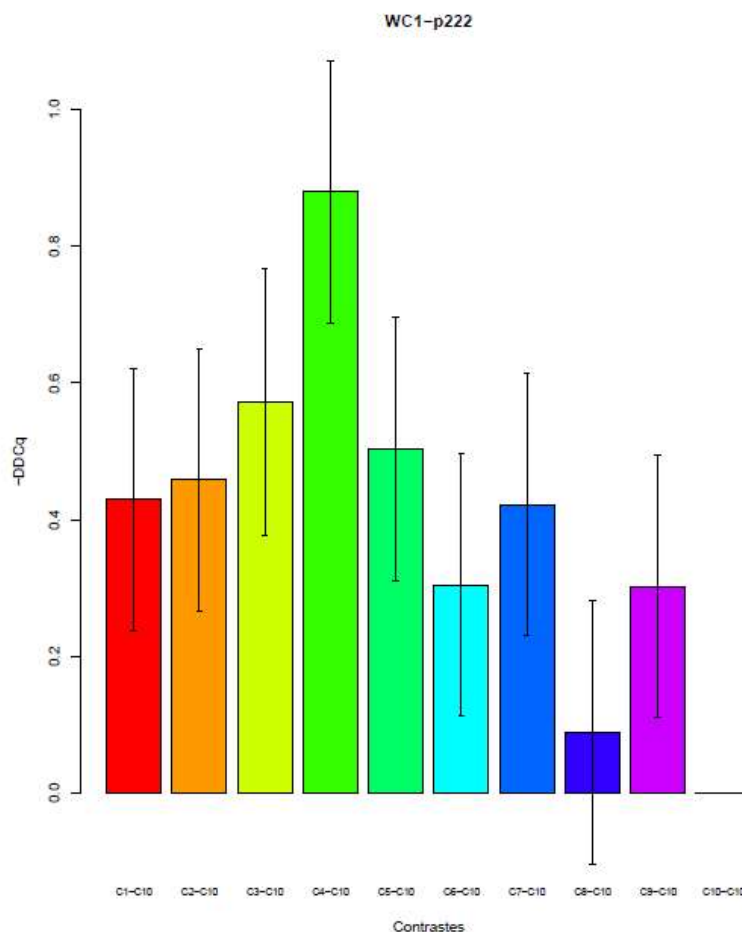


Figura 10. Diferenças da expressão do gene WC1 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), segundo o modelo proposto.

Sugerimos também que o perfil de expressão identificado neste trabalho está ligado ao recrutamento de diversos mecanismos imunológicos distintos interdependentes, sendo eles inatos devido à presença de imunidade colostril (Brito et al., 2019), à resistência inversa à idade que provoca baixa parasitemia, mas ainda pode ser quantificada (Zintl et al., 2005); adquiridos (Abbas et al., 2018) e devido à atividade de outros genes associados às características

imunológicas para realizar a defesa apropriada. Alguns trabalhos de expressão gênica de WC1 elucidaram a presença deste gene como mediador de respostas imunes inata e adquirida, por exemplo, em infecções de *Anaplasma* spp. (Lahmers et al., 2005) e *Leptospira* spp. (Rogers et al., 2005) em bovinos. Apesar desses trabalhos serem voltados para a caracterização das isoformas deste gene, há de se levar em consideração que o nosso estudo dá a primeira base genética sobre comportamento gênico de WC1 em bezerros Canchim e, como perspectiva futura, pode ser comparativo para a avaliação das isoformas e suas diferenças imunorreguladoras, principalmente, no fenótipo desses bezerros.

Com relação à interação entre colheita e classe de precedência nota-se, na figura 11, que as diferenças em relação à C10 em particular e entre as colheitas em geral são menores na classe 3, e crescem até a classe 5. Entretanto, não se pode afirmar que há maior ou menor expressão entre as classes, pois os dados estão dispostos em diferenças de expressão, ou seja, apesar da classe 5 ter diferenças maiores que as classes 4 e 3, isso não significa que ela tenha maior expressão gênica de WC1 que as demais classes. Por esse espectro de classes de precedência, observamos um comportamento que diverge, a exceção da classe 5, da Figura 10, em que as diferenças de expressão ao longo das colheitas aumentam até a C4 e depois sofrem declínio. Sendo assim, a classe 3 mostra um perfil de atividade que diminui drasticamente de C1 até C3, aumenta em C4, onde é sua maior expressão, e vai diminuindo e oscilando até C10 – colheita referência, mas sem diferenças significativas (Quadro 3); já a classe 4 tem um aumento crescente de expressão entre C1 e C3, sendo a última sua maior expressão, seguido de declínio e de oscilações que culminam na menor expressão em C8 e posterior aumento em C9. Sendo assim, nota-se que para a segunda classe de precedência (classe 4), a maior expressão do gene WC1 ocorre em C3, enquanto nas classes 3 e 5 a maior expressão ocorre em C4.

Quanto às diferenças em relação à colheita de maior expressão (C4), na classe 3 não foram observadas significância entre colheitas (Quadro 3), e na classe 5, a exceção de C2 e C3, as colheitas diferiram significativamente de C4. Na classe 4, a maioria das diferenças significativas em relação a C4 envolvem C8 e C10, as duas últimas com a menor expressão de WC1 (Quadro 3); e em

relação à sua colheita de maior expressão (C3), as diferenças ocorrem em C6, C7, C8 e C10. Esse resultado sugere que a colheita 4, portanto, amostras coletadas a 1 mês e meio de vida, apresenta algum diferencial em relação às demais colheitas, principalmente, na classe 5, isto é, quando os animais ultrapassaram o limiar de 2,0 para o log (NC +1) para pelo menos um dos patógenos a partir da quinta colheita – metade do tempo de estudo.

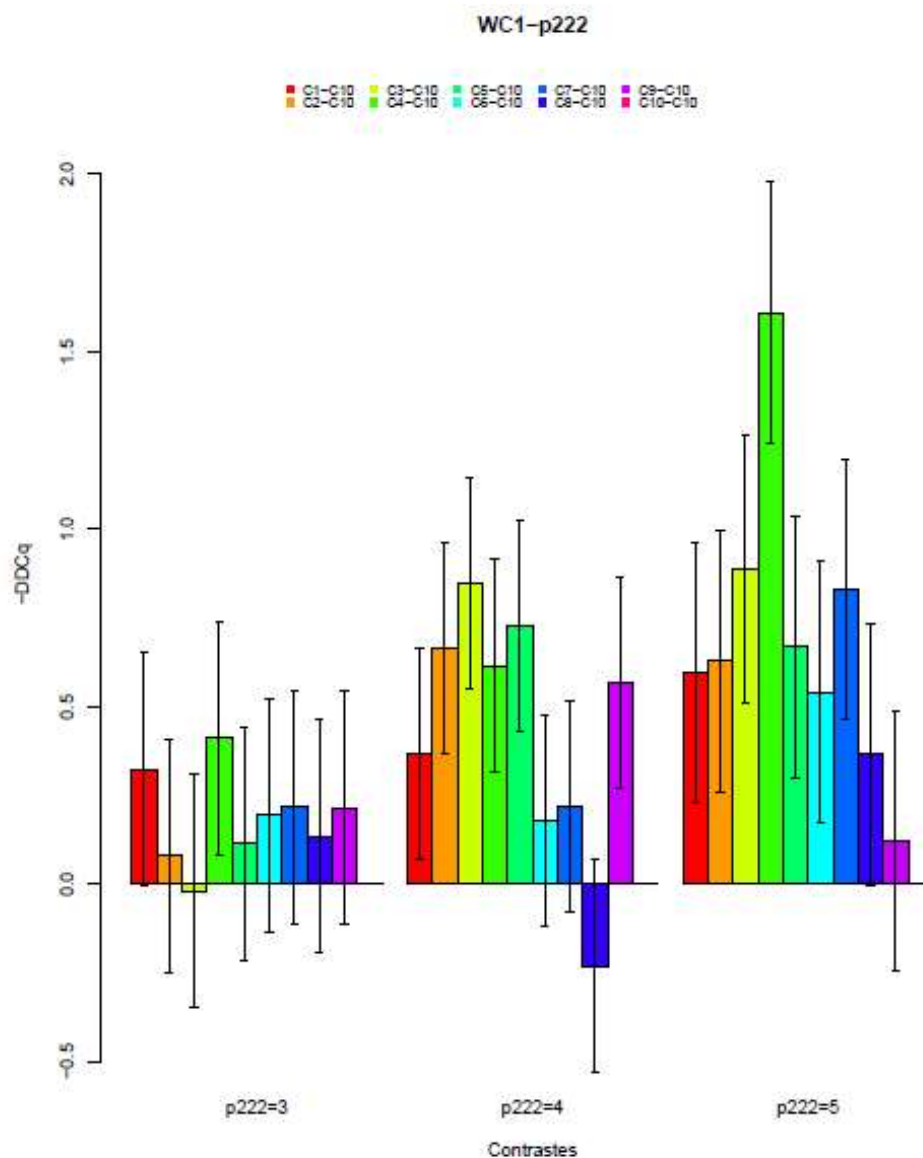
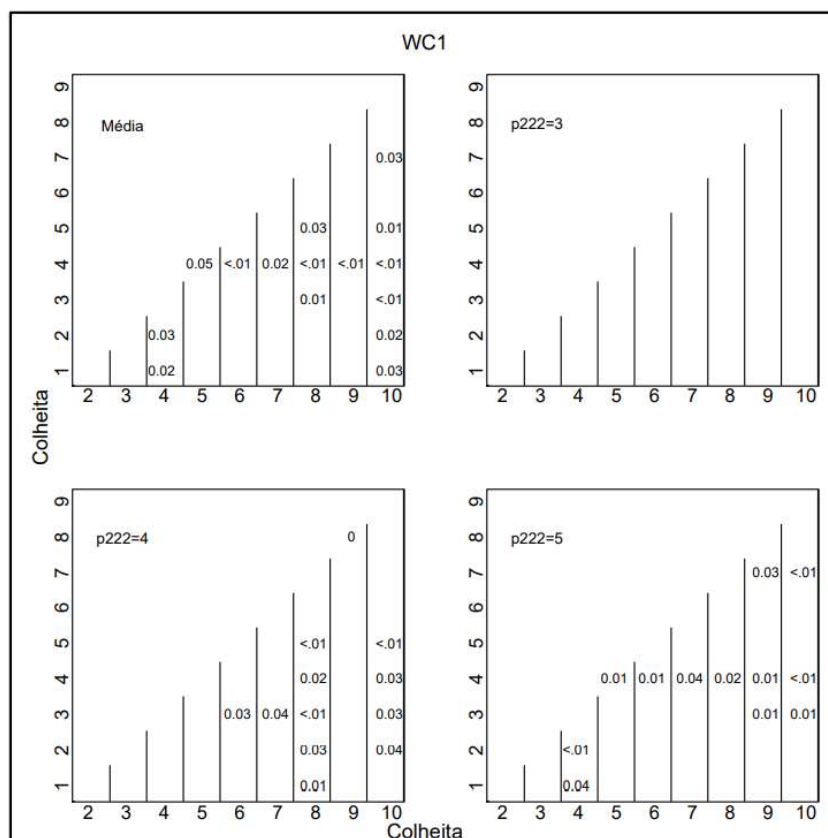


Figura 11. Diferenças da expressão do gene WC1 em cada colheita em relação à colheita 10 dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ ($-\Delta\Delta Cq$), de acordo com o modelo proposto.



Quadro 3. Anotação das diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as colheitas para as médias e para cada uma das classes de precedência (P222) para o gene WC1.

Levando em consideração a análise por contrastes, sugerimos que parasitemias com níveis de infecção igual ou acima do estipulado neste estudo requereram atividade gênica deste correceptor desde o primeiro contato com o desafio infeccioso, confirmando o seu papel adjuvante nos mecanismos de defesa, mas sem caracterização completa que permita a descrição do tipo de resposta. Pollock e Welsh (2002), por exemplo, acreditam que as células T $\gamma\delta$ bovinas funcionam como elo entre as respostas imune inata e adaptativa diante de infecções intracelulares, enquanto Silva (2015) constatou resposta imune adquirida e induzida por meio da vacinação contra a Doença Respiratória Bovina (DRB) em bezerros holandeses pela presença constante de subpopulações de

linfócitos WC1+ dos 14 aos 240 dias de vida, mas ambos sem determinar um padrão de atividade gênica de WC1.

Os achados do nosso estudo em sua maioria identificam um perfil de demanda de atividade gênica inicialmente maior com posterior declínio frente às circunstâncias de estabilidade endêmica, aquelas onde os animais estão susceptíveis às parasitemias a todo tempo. O desdobramento no aspecto celular de WC1 com diferentes níveis de envolvimento foi identificado em infecções experimentais causadas por *Mycobacterium bovis*, que indicaram que as células T $\gamma\delta$ WC1+ se acumulam nos locais primários da infecção e, inicialmente, diminuem na circulação, o que sugere que a sua participação independe de maior ou menor atividade gênica no momento da infecção, havendo somente um deslocamento para o local infectado (Cassidy et al., 2001). Entretanto, Pollock e Welsh (2002) sugerem que o aumento na produção de células T $\gamma\delta$ está associado ao desenvolvimento de uma resposta imune adquirida influenciada por resposta celular Th1 com posterior produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α . Ainda de acordo com esses autores, o decorrer da resposta inflamatória e o reconhecimento do antígeno instigam a proliferação de células T $\gamma\delta$ e, assim, a atuação destas em diferentes estágios da infecção, inclusive, na sua resolução.

Sendo assim, inferimos que o desdobramento dos resultados no nosso estudo estimula uma resposta inicial do gene WC1 culminando em proliferação secundária de células WC1 para o reconhecimento e enfrentamento das infecções, e, portanto, com atuação de recrutamento, proliferação celular e participação na resolução das infecções causadas por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Mais do que isso, a análise por contrastes permite que avaliemos a expressão de WC1 em animais infectados com esses agentes ao longo do tempo de estudo, o que sugere que esse gene se apresenta em todas as classes, garantindo sua participação no enfrentamento das patologias e posterior análise da sua contribuição por meio de outros estudos.

Ainda no contexto das classes de precedência e apesar de não ter sido reconhecida nenhuma significância estatística, a figura 12 reúne as diferenças entre as médias de expressão do gene WC1 para as classes 3, 4 e 5. Observa-se que a classe 3 apresenta maior expressão em relação à classe 4 (barra vermelha); a classe 5 apresenta maior expressão em relação à classe 3 (barra

verde) e, por último, a classe 5 com maior expressão em relação à classe 4 (barra azul). Portanto, temos que a classe 5 tem maior expressão que classe 3 e esta, por sua vez, maior expressão que a classe 4. Enfim, o agrupamento de classes por colheitas subsequentes ao atingir o limiar estabelecido ($\log(\text{NC}+1) > 2.0$) para ao menos um das infecções estudadas não foi determinante para revelar um resultado crescente, e sim, com padrão de colheita 4 diferente das colheitas anteriores e superiores.

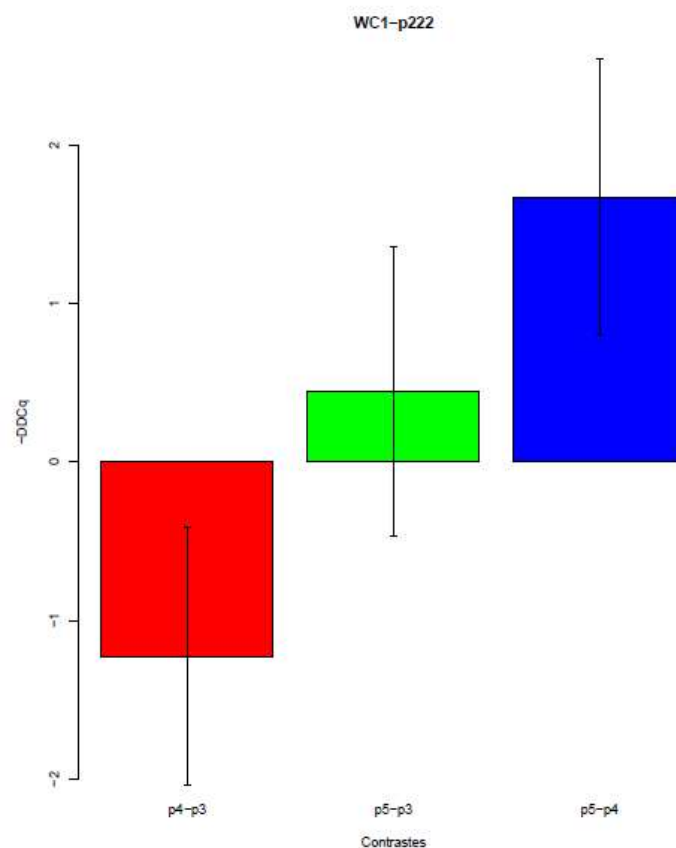


Figura 12. Diferenças entre as classes de precedência (p222), dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para o gene WC1.

A figura 13 mostra as diferenças entre as classes para cada colheita. Nota-se, que a tendência é bastante semelhante entre todas as colheitas. Observa-se que a classe 3 é maior que a classe 4 em todas as colheitas, assim como a classe 5 é maior que a classe 4. No mais, a classe 5 teve maior expressão em relação a classe 3 na maioria das colheitas com exceção da C9. Quanto às relações de significância, nas colheitas C4, C7 e C8, as diferenças entre as classes 4 e 5 foram significativas, enquanto a diferença entre as classes

3 e 4 foi significativa apenas em C8. Mais uma vez, a colheita C4 apresenta resultados em destaque que, na figura 7, revelam expressão maior da classe 5 em comparação com a classe 4.

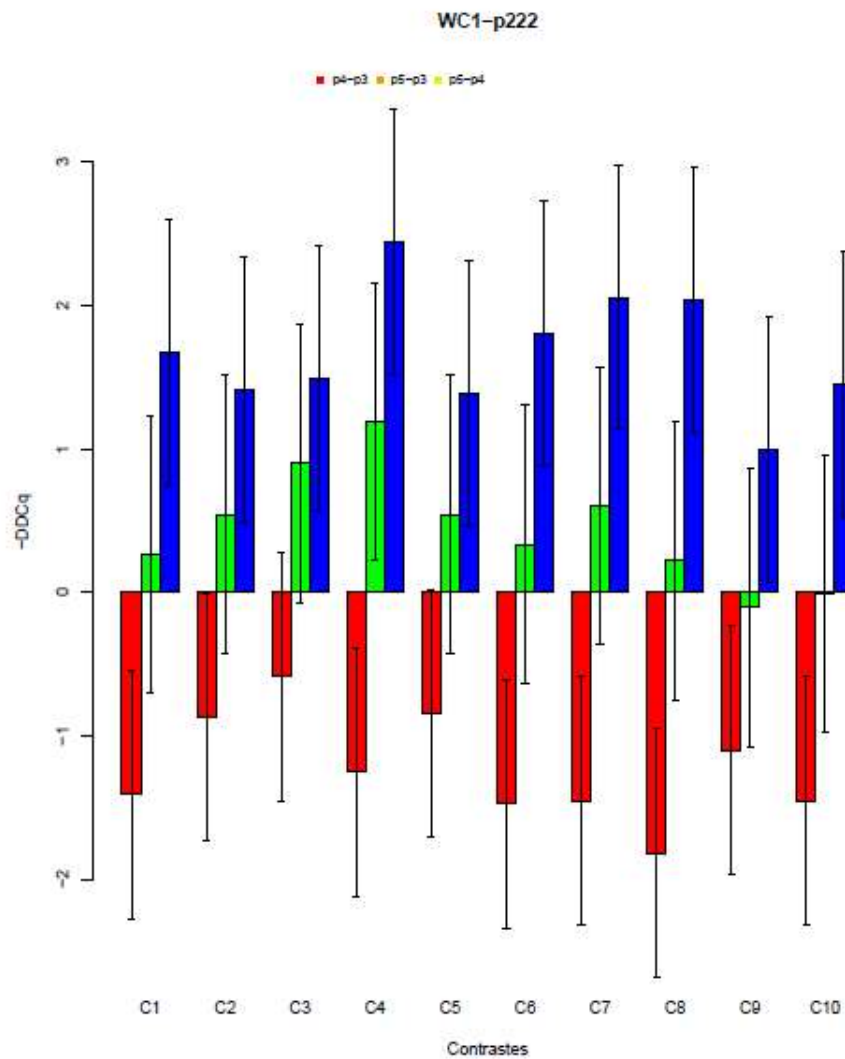


Figura 13. Diferenças entre as classes de precedência p222, dados em termos de $-\Delta\Delta Cq$ para cada colheita (C1 a C10) do gene WC1.

Essa abordagem com classes de precedência é inédita para TLR2, TLR4 e WC1, o que dificulta a comparação com outros perfis, mas, por outro lado, apresenta detalhadamente efeitos de infecção ao longo dos meses (colheitas) e de determinação de grupos precoce ou tardiamente infectados (classe de precedência). Em resumo, os resultados acima indicam que o efeito de colheita

em relação aos genes TLR2, TLR4 e WC1 foi significativo para a maioria das análises e o efeito de classe de precedência com diferenças significativas em determinados períodos revelou a expressão em momentos distintos de manifestação da doença e de níveis de infecção. Em especial, TLR2 com destaque para C1, TLR4 com a padronização de expressão nos diversos tratamentos e WC1 com oscilações de demanda diferenciada ao longo do estudo.

Esses resultados também indicam que outros fatores influenciam o processo de transcrição para tradução eficaz de proteínas, e, possivelmente, há outros genes envolvidos na resposta imunológica frente à babesiose e anaplasiose. Entretanto, esse estudo se consolida como ponto de partida para caracterização de genes de resposta imunológica importantes nos estudos de resistência às babesioses e anaplasmoses em bovinos.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente experimento podemos concluir que os genes TLR2, especialmente, TLR4 e WC1 desempenham papel importante no desenvolvimento da resposta imune contra as infecções de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em bezerros Canchim, sendo que os diferentes graus de parasitemia influenciaram no nível de expressão desses receptores. Trabalhos futuros poderão explorar de forma mais aprofundada como as diferenças nos níveis de expressão desses receptores celulares influenciam a resistência de hemoparasitas, tornando possível o seu uso como marcadores genéticos para características de resistência.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2018). **Cellular and Molecular Immunology**, 9ª edição, Editora Elsevier.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124(4), 783-801.
- Araya-Anchetta, A., Busch, J. D., Scoles, G. A., Wagner, D. M. (2015). Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. **Infection, Genetics and Evolution**, 29, 164-179.
- Antoniassi N.A.B., Corrêa A.M.R., Santos A.S., Pavarin I.S.P., Sonne L., Driemeier P.M.B.D. (2009). Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. 39(3):933-6.
- Atif, F. A. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. **Parasitology research**, 114(11), 3941-3957.
- BABES, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes rendus hebdomadaires des seances del'Academie des Sciences**, Paris 107, 692–694.
- Barbosa, M. F. R., Costa, J. O.; Tafuri, W. L. (1994). Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso autóctone em Minas Gerais – Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 519-526.
- Blumerman, S. L., Herzig, C. T., Rogers, A. N., Telfer, J. C., Baldwin, C. L. (2006). Differential TCR gene usage between WC1– and WC1+ ruminant $\gamma\delta$ T cell subpopulations including those responding to bacterial antigen. **Immunogenetics**, 58(8), 680-692.
- Bilhassi, T. B., Oliveira, H. N., Ibelli, A. M., Giglioti, R., Regitano, L. C., Oliveira-Sequeira, T. C., Bressani, F. A., Malagó Jr, W., Resende, F. D., Oliveira, M. C. (2014). Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, 5(3), 234-238.

Bock, R. E., De Vos, A. J., Kingston, T. G., McLellan, D. J. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian veterinary journal**, 75(5), 337-340.

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129(S1), S247-S269.

Brown, W. C., Woods, V. M., Dobbelaere, D. A., Logan, K. S. (1993). Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis*-specific bovine CD4+ T cells clones activated in vitro. **Infection and immunity**, 61(8), 3273-3281.

Bracarense, A. P. F.; Vidotto, O.; Cruz, G. D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. (2001). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 479-481.

Brito, L. G., Barbieri, F. D. S., Ferreira, T. A. A., Carneiro, D. D. S., Amaral, T. M., Figueiró, M. R., & Oliveira, M. D. S. (2019). Transmissão congênita de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. Embrapa Amazônia Oriental, **Circular Técnica**, 48.

Brown, W. C., McElwain, T. F., Ruef, B. J., Suarez, C. E., Shkap, V., Chitko-McKown, C. G., Tuo, W., Rice-Ficht, A. C., Palmer, G. H. (1996). *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. **Infection and immunity**, 64(8), 3341-3350.

Brown, W. C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T. C., Tuo, W., McElwain, T. F., Palmer, G. H. (1998a). CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and immunity**, 66(11), 5406-5413.

Brown, W. C., Zhu, D., Shkap, V., McGuire, T. C., Blouin, E. F., Kocan, K. M., & Palmer, G. H. (1998b). The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4+ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. **Infection and Immunity**, 66(11), 5414-5422.

Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary parasitology**, 138(1-2), 75-87.

Bustin, S. A., Benes, V. et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Birmingham, v. 55, n. 4, p. 611-622.

Cabezas-Cruz, A., Passos, L. M. et al. (2013). Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. **PLoS One**, 8(6), e65243.

Cassidy, J. P., Bryson, D. G., Cancela, M. G., Forster, F., Pollock, J. M., & Neill, S. D. (2001). Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. **Journal of comparative pathology**, 124(1), 46-51.

Chaplin, D. D. (2003). 1. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 111(2), S442-S459.

Chaudhry, Z. I., Suleman, M., Younus, M., Aslim, A. (2010). Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. **Pakistan Journal of Zoology**, 42(2).

Clevers, H., Machugh, N. D., Bensaid, A., Dunlap, S., Baldwin, C. L., Kaushal, A., Iams, K., Howard, C. J., Ivan Morrison, W. (1990). Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4⁻ CD8⁻ T cell receptor γ/δ ⁺ T lymphocytes. **European journal of immunology**, 20(4), 809-817.

Costa, S. C. L.; Magalhães, V. C. S.; Oliveira, U. V.; Carvalho, F. S.; Almeida, C. P.; Machado, R. Z.; Munhoz, A. D. (2016). Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 270-275.

Davies, D., Meade, K. G., Herath, S., Eckersall, P. D., Gonzalez, D., White, J. O., Conlan, R. S., O'Farrelly, C., Sheldon, I. M. (2008). Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 6(1), 1-12.

Eriks, I. S., Stiller, D., Palmer, G. H. (1993). Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of clinical microbiology**, 31(8), 2091-2096.

Estrada-Peña, A., García, Z., Sánchez, H. (2006). The distribution and ecological references of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. **Experimental & Applied Acarology**. 38(4), 307-316.

French, D. M., McElwain, T. F., McGuire, T. C., Palmer, G. H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity**, 66(3), 1200-1207.

French, D. M., Brown, W. C., Palmer, G. H. (1999). Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and immunity**, 67(11), 5834-5840.

Ezz, M. A., Marey, M. A. et al. (2019). TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro. **PLoS One**, 14(4), e0214516.

Folly M.M., Madruga R., Emmott V.P., Pereira M.A.V.C. Vita G.F. 2009. Ocorrência de *Babesia* sp. em bezerros mestiços, por meio de testes sorológicos, em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 10(1):44-51.

Fu, Y., Liu, B. et al. (2013). Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 151(1-2), 20-27.

Giglioti, R. (2013). **Estudo quantitativo da infecção por Babesia bovis em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos**. 81 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Unesp, Jaboticabal

Giglioti, R., Oliveira, H. N., Santana, C. H., Ibelli, A. M. G., Néo, T. A., Bilhassi, T. B., Rabelo, M. D., Machado, R. Z., Brito, L. G., Oliveira, M. D. S. (2016). *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, 7(5), 657-662.

Giglioti, R., de Oliveira, H. N., Okino, C. H., de Sena Oliveira, M. C. (2018). qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental and Applied Acarology**, 75(2), 235-240.

Giglioti, R., Bassetto, C. C., Okino, C. H., de Oliveira, H. N., & de Sena Oliveira, M. C. (2019). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Anaplasma marginale*. **Experimental and Applied Acarology**, 77(1), 65-72.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23, 150-156.

Goff, W. L., Wagner, G. G., Craig, T. M., Long, R. F. (1982). The bovine immune response to tick - derived *Babesia bovis* infection: serological studies of isolated immunoglobulins. **Veterinary parasitology**, 11(2-3), 109-120.

Goff, W. L., Johnson, W. C., Cluff, C. W. (1998). *Babesia bovis* Immunity: In Vitro and in Vivo Evidence for IL-10 Regulation of IFN- γ and iNOS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 849(1), 161-180.

Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., Valdez, R. A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite immunology**, 23(9), 463-471.

Goff, W. L., Johnson, W. C., Tuo, W., Valdez, R. A., Parish, S. M., Barrington, G. M., Davis, W. C. (2002). Age-related innate immune response in calves to *Babesia bovis* involves IL-12 induction and IL-10 modulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 969(1), 164-168.

Gonçalves, P.M., 2000. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, 30(1), 187-194.

Guglielmone, A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, 57, 109-119.

Herzig, C. T., Baldwin, C. L. (2009). Genomic organization and classification of the bovine WC1 genes and expression by peripheral blood gamma delta T cells. **BMC genomics**, 10(1), 1-20.

Hirata, T., Osuga, Y., et al. (2007). Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. **Journal of reproductive immunology**, 74(1-2), 53-60.

Ibeagha-Awemu, E. M., Lee, J. W., Ibeagha, A. E., Bannerman, D. D., Paape, M. J., & Zhao, X. (2008). Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. **Veterinary research**, 39(2), 1-12.

Jann, O. C., Werling, D., Chang, J. S., Haig, D., Glass, E. J. (2008). Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. **BMC evolutionary biology**, 8(1), 288.

Karthikeyan, A., Radhika, G., Aravindhakshan, T. V., Anilkumar, K. (2016). Expression profiling of innate immune genes in milk somatic cells during subclinical mastitis in crossbred dairy cows. **Animal biotechnology**, 27(4), 303-309.

Kennedy, H. E., Welsh, M. D., Bryson, D. G., Cassidy, J. P., Forster, F. I., Howard, C. J., Collins, R. A., Pollock, J. M. (2002). Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1+ $\gamma\delta$ T cells. **Infection and immunity**, 70(3), 1488-1500.

Kessler, R. H., Madruga, C. R., de Jesus, E. F., Semprebom, D. V. (1987). Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 22(7), 747-752.

Kessler, R. H.; Schenk, Maria Aparecida M. (1998). Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. **Embrapa Gado de Corte - Livro técnico** (INFOTECA-E).

Kessler, R.H. (2001). Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 21, 177-179.

Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary parasitology**, 167(2-4), 95-107.

Kumar, S., Kumar, S., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, A., Sulabh, S., Bharati, J., Singh, S. V. (2019). Genetic association of polymorphisms in bovine TLR2 and TLR4 genes with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in Indian cattle population. **Veterinary research communications**, 43(2), 105-114.

Lahmers, K. K., Norimine, J., Abrahamsen, M. S., Palmer, G. H., Brown, W. C. (2005). The CD4+ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates $\gamma\delta$ T cell clones that express unique T cell receptors. **Journal of leukocyte biology**, 77(2), 199-208.

Lahmers, K. K., Hedges, J. F., Jutila, M. A., Deng, M., Abrahamsen, M. S., Brown, W. C. (2006). Comparative gene expression by WC1+ $\gamma\delta$ and CD4+ $\alpha\beta$ T lymphocytes, which respond to *Anaplasma marginale*, demonstrates higher expression of chemokines and other myeloid cell-associated genes by WC1+ $\gamma\delta$ T cells. **Journal of leukocyte biology**, 80(4), 939-952.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 25(4), 402-408.

Mackay, C. R., & Hein, W. R. (1989). A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. **International Immunology**, 1(5), 540-545.

Mahoney, D. F., Kerr, J. D., Goodger, B. V., Wright, I. G. (1979). The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **International Journal for Parasitology**, 9(4), 297-306. doi:10.1016/0020-7519(79)90078-x

McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J. L., Glass, E. J., Jann, O. (2006). Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. **Animal genetics**, 37(1), 47-50.

Menzies, M., Ingham, A. (2006). Identification and expression of Toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. **Veterinary immunology and immunopathology**, 109(1-2), 23-30.

Meissner, N., Radke, J., Hedges, J. F., White, M., Behnke, M., Bertolino, S., Abrahamsen, M., Jutila, M. A. (2003). Serial analysis of gene expression in circulating $\gamma\delta$ T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. **The Journal of Immunology**, 170(1), 356-364.

Monteiro, S. G. (2012). **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Ed. Roca, São Paulo, 1a Ed., p. 368p.

McCosker, P.J. (1981). The global importance of babesiosis. In: Ristic, M., Kreier, J.P.(Eds.), Babesiosis. **Academic Press**, New York, NY, pp. 1–24.

Norton, J. H.; Parker, R. J.; Forbes-Faulkner, J. C. (1983) Neonatal anaplasmosis in a calf. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 11, p. 348.

Neto, L. R. P., Jonsson, N. N., Michael, J. D., Barendse, W. (2011). Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary parasitology**, 180(3-4), 165-172.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2014). Recommendations for validation of diagnostic tests. In: **OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.00_INTRODUCTION.pdf.

Okino, C. H., Giglioti, R., Silva, P. C., de Oliveira, H. N., de Sena Oliveira, M. C. (2018). Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. **Molecular biology reports**, 45(6), 2671-2680.

Oliveira, M. C. S., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Araujo Jr, J. P., Amarante, A. F. T., & Oliveira, H. N. (2005). *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 130(1-2), 61-67.

Oliveira, M. C. S., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Regitano, L. C. A., Alencar, M. M., Néo, T. A., Silva, A. M., Oliveira, H. N. D. (2008). Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, 155(3-4), 281-286.

Parker, R. J., Shepherd, R. K., Trueman, K. F., Jones, G. W., Kent, A. S., Polkinghorne, I. G. (1985). Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. **Veterinary Parasitology**, 17(3), 205-213.

Parker, C. M., Groh, V., Band, H., Porcelli, S. A., Morita, C., Fabbi, M., Glass, D., Strominger, J. L., Brenner, M. B. (1990). Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. **The Journal of experimental medicine**, 171(5), 1597-1612.

Passos, L. M. F.; Lima, J. D. (1984). Diagnóstico de anaplasmosse bovina congênita em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 743-744.

Piper, E.K., Jackson, L.A., Bagnall, N.H., Kongsuwan, K.K., Lew, A.E., Jonsson, N.N. (2008). Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 126, 110–119.

Pollock, J. M., & Welsh, M. D. (2002). The WC1+ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 89(3-4), 105-114.

Price, J. C., Bromfield, J. J., & Sheldon, I. M. (2013). Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. **Endocrinology**, 154(9), 3377-3386.

Rogers, A. N., VanBuren, D. G., Hedblom, E. E., Tilahun, M. E., Telfer, J. C., Baldwin, C. L. (2005). $\gamma\delta$ T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. **The Journal of Immunology**, 174(6), 3386-3393.

Rogers, A. N., VanBuren, D. G., Hedblom, E., Tilahun, M. E., Telfer, J. C., Baldwin, C. L. (2005). Function of ruminant $\gamma\delta$ T cells is defined by WC1. 1 or WC1. 2 isoform expression. **Veterinary immunology and immunopathology**, 108(1-2), 211-217.

Rogers, A. N., VanBuren, D. G., Zou, B., Lahmers, K. K., Herzig, C. T., Brown, W. C., Telfer, J. C., Baldwin, C. L. (2006). Characterization of WC1 co-receptors on functionally distinct subpopulations of ruminant $\gamma\delta$ T cells. **Cellular immunology**, 239(2), 151-161.

Santarosa B.P., Dantas G.N, Ferreira D.O.L., Rocha N.S., Gonçalves R.C., Amorim R.M., Chiacchio S.B. (2013). Infecção neurológica por *Babesia bovis* em bovino neonato – relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**. 20(3):9-14.

Silva, B. T. (2015). **Influência dos anticorpos maternos na resposta imune induzida pela vacinação em bezerros Holandeses**. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo.

Shoda L.K., Palmer G.H., Florin-Christensen J., Florin-Christensen M., Godson D.L., Brown W.C. (2000). *Babesia bovis* stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**, 68(9):5139-5145.

Smith, T.; Kilborne, F. L. (1893). Investigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. In Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892, pp. 177–304. Washington, **Government Printing Office**.

Souza, F. D. A., Braga, J. F., Pires, L. V., de Carvalho, C. J., Costa, É. A., Ribeiro, M. F., Santos, R. L., Silva, S. M. (2013). Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(9), 1057-1061.

Steibel, J. P.; Poletto, R.; Coussens, P. M.; Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, p.146-152.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, 21(1), 335-376.

Taraktoglou, M., Szalabska, U., Magee, D. A., Browne, J. A., Sweeney, T., Gormley, E., MacHugh, D. E. (2011). Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 140(1-2), 130-139.

Theiler, A. (1910). Gall-sickness of South Africa. (Anaplasmosis of cattle.). **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, 23, 98-115.

Theiler, A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. **Pretoria: Government Printer and Stationery Office.**

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of biotechnology**, 75(2-3), 291-295.

Trueman, K. F., Blight, G. W. (1978). The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Australian Veterinary Journal**, 54(6), 301-305.

Tucker, T.R., Aly, S.S., Maas, J., Davy, J.S., Foley, J.E. (2016). Investigation of *Anaplasma marginale* Seroprevalence in a Traditionally Managed Large California Beef Herd. **Veterinary Medicine International.**

Vieira, L. L., Canever, M. F., Cardozo, L. L., Cardoso, C. P., Herkenhoff, M. E., Neto, A. T., Vogel, C. I. G., Miletto, L. C. (2019). Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite epidemiology and control**, 6, e00114.

Wang, M., Guerrero, F.D., Pertea, G., Nene, V.M. (2007). Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Genomics**, 8, 368.

Wang, Y., Zhou, X., Lin, J., Yin, F., Xu, L., Huang, Y., Ding, T., Zhao, D. (2011). Effects of *Mycobacterium bovis* on monocyte-derived macrophages from bovine tuberculosis infection and healthy cattle. **FEMS microbiology letters**, 321(1), 30-36.

Wright, I. G., Goodger, B. V., Leatch, G., Aylward, J. H., Rode-Bramanis, K., Waltisbuhl, D. J. (1987). Protection of *Babesia bigemina* -immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. **Infection and immunity**, 55(2), 364-368.

Wright, I. G. (1990). Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot**, 9, 345-356.

White S.N., Kata S.R., Womack J.E. (2003) Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. **Mamm Genome**. 14(2):149-55.

Yang, Z., Fu, Y., Gong, P., Zheng, J., Liu, L., Yu, Y., Li, J., Li, H., Yang, J., Zhang, X. (2015). Bovine TLR2 and TLR4 mediate *Cryptosporidium parvum* recognition in bovine intestinal epithelial cells. **Microbial pathogenesis**, 85, 29-34.

Zintl, A., Gray, J. S., Skerrett, H. E., & Mulcahy, G. (2005). Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite immunology**, 27(4), 115-120.

Zhao, G., Yu, M., Cui, Q. W., Zhou, X., Zhang, J. C., Li, H. X., Qu, K. X., Wang, G. L., Huang, B. Z. (2013). Association of bovine Toll-like receptor 4 with tick infestation rates and blood histamine concentration. **Genetics and Molecular Research**, 12(3), 2783-2793.

Zhao, L., Cavallaro, A. S., Wibowo, D., Zhang, B., Zhang, J., Mitter, N., Yu, C., Zhao, C., Middelberg, A. P. (2017). A partially purified outer membrane protein

VirB9-1 for low-cost nanovaccines against *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, 35(1), 77-83.