

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E DOS
PERFIS MOLECULARES EM BOVINOS ANGUS E
MISTIÇOS NA RESISTÊNCIA À INFECÇÃO NATURAL
POR *Babesia spp.***

**Bianca Tainá Azevedo Barreto
Médica veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E DOS PERFIS
MOLECULARES EM BOVINOS ANGUS E MISTIÇOS NA
RESISTÊNCIA À INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia spp.***

Bianca Tainá Azevedo Barreto

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Giglioti

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Ciência Animal**

B273i	Barreto, Bianca Tainá Azevedo Influência da composição genética e dos perfis moleculares em bovinos Angus e mestiços na resistência à infecção natural por <i>Babesia</i> spp. / Bianca Tainá Azevedo Barreto. -- Jaboticabal, 2026 68 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Henrique Nunes de Oliveira Coorientador: Rodrigo Giglioti 1. Genética animal. 2. Bovinos Melhoramento genético. 3. Parasitologia veterinária. 4. Doenças transmitidas por carrapatos. 5. Expressão gênica. I. Título.
-------	---

Impacto potencial desta pesquisa

Esta pesquisa beneficia a sociedade ao promover uma pecuária mais sustentável e produtiva. O estudo de genes de resistência à babesiose fornece bases para o melhoramento genético assistido, visando reduzir a necessidade de tratamentos e a mortalidade animal. Resultando em alimentos mais seguros, maior bem-estar animal e eficiência no setor.

Potential Impact of this Research

This research benefits society by promoting more sustainable and productive livestock farming. Studying genes related to babesiosis resistance provides the foundation for future genetic breeding, aiming to reduce the need for chemical treatments and prevent animal loss. This results in safer food, improved animal welfare, and greater efficiency in the sector.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E DOS PERFIS MOLECULARES EM BOVINOS ANGUS E MISTIÇOS NA RESISTÊNCIA À INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia* spp.

AUTORA: BIANCA TAINÁ AZEVEDO

ORIENTADOR: HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA

COORDENADOR: RODRIGO GIGLIOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO GIGLIOTI**
Data: 31/10/2025 17:24:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. RODRIGO GIGLIOTI (Participação Virtual)
IZ - Instituto de Zootecnia / Nova Odessa/SP

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA MORITA KATIKI**
Data: 03/11/2025 12:26:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LUCIANA MORITA KATIKI (Participação Virtual)
IZ - Instituto de Zootecnia / Nova Odessa/SP

Documento assinado digitalmente
 **LENIRA EL FARO ZADRA**
Data: 03/11/2025 13:18:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA (Participação Virtual)
IZ - Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA MÉRICA GUARATINI IBELLI**
Data: 01/11/2025 15:22:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dr. ADRIANA MÉRICA GUARATINI IBELLI (Participação Virtual)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) / São Carlos/SP

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME LUIS PEREIRA**
Data: 03/11/2025 15:06:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME LUIS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 31 de outubro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bianca Tainá Azevedo Barreto: nascida em Brasilândia, Mato Grosso do Sul, em 20 de setembro de 1995. Tornou-se bacharela em Medicina veterinária pela faculdade Anhanguera Educacional, Campinas em 2017. Em 2019 foi bolsista de treinamento técnico III da FAPESP no projeto intitulado “Impacto da tosquia na infestação por parasitas, no desempenho e saúde de animais da raça Holandês” sendo a pesquisadora responsável Profa. Dra Cecília José Veríssimo. Ingressou em 2019 no mestrado em Produção animal sustentável do Instituto de Zootecnia (IZ- APTA), Nova Odessa, concluindo-o em 2021 defendendo a dissertação intitulada “Desenvolvimento de técnicas de genética molecular para a identificação de fraude de leite de vaca em leite e produtos lácteos de búfala”, como bolsista CAPES, sob orientação da Profa. Dra. Cecília José Veríssimo e coorientação do prof. Dr. Rodrigo Giglioti. Em 2021, ingressou no doutorado em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) em Jaboticabal, São Paulo, como bolsista Capes, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira e do Prof. Dr. Rodrigo Giglioti.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos, por me dar oportunidades e força diante dos momentos de dificuldade.

Ao meu marido, Matheus, pelo apoio, compreensão, ajuda e preocupação. Você foi meu suporte ao longo de todo esse processo.

À minha mãe, que me deu todas as condições para o meu desenvolvimento, educação e incentivo ao longo de toda minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, pela oportunidade e confiança em mim.

Ao meu coorientador, Dr Rodrigo Giglioti, expressei minha sincera gratidão e profunda admiração. Sem dúvidas aprendi muito sob sua orientação, tanto na dimensão acadêmica quanto pessoal. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, apoio, confiança, por ser um exemplo de profissional e por me guiar nessa trajetória acadêmica desde antes do meu mestrado.

Aos alunos de PIBIC e da pós-graduação do Instituto de Zootecnia pela ajuda nas avaliações, colheitas e análises.

Ao Instituto de Zootecnia pela parceria nas análises experimentais.

A CAPES, pelo apoio financeiro que me permitiu trabalhar e executar este projeto.

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

À FAPESP, pelo auxílio financeiro no projeto 2019/22675-22, cujos resultados obtidos corroboraram para esta tese.

SUMÁRIO

PÁGINA

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Resistência dos bovinos a babesiose	3
2.2. Métodos para detecção e quantificação de hemoparasitas	5
2.3. Avaliação da expressão gênica utilizando RNA-seq	6
3. REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2 – A small proportion of zebu genetic background in crossbred calves may not be enough to improve resistance against natural bovine <i>Babesia spp.</i> infections	14
ABSTRACT.....	14
1. Introduction	15
2. Material and methods	16
2.1. Experimental animals.....	16
2.1.1. Tick counts and sample processing.....	17
2.2. qPCR assays	18
2.3. Recombinant indirect ELISA assays	18
2.4. Statistical analysis	19
3. Results.....	20
4. Discussion.....	23
5. Conclusions	28
6. References	28
CAPÍTULO 3 - Análise transcriptômica de bovinos angus e mestiços em resposta à infecção natural por <i>Babesia bovis</i>	32
RESUMO.....	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos.....	35
2.1. Animais experimentais	35
2.2. Extração de DNA e RNA.....	36

2.3. PCR quantitativa para a seleção dos grupos animais	36
2.4. Preparação da Biblioteca de RNA e Sequenciamento por RNA-Seq..	37
2.5. Controle de Qualidade e Identificação de Genes Diferencialmente Expressos	37
2.6. Análises Funcionais e de Enriquecimento de Genes	38
3. Resultados	39
3.1. Infecções naturais por <i>B. bovis</i>	39
3.2. RNA e controle de qualidade	39
4. Discussão	44
5. Conclusão	50
6. Referências bibliográficas	50

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Protocolo nº 328-2021

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto de Zootecnia

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA EM BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS SUBMETIDOS A INFECÇÕES POR *BABESIA BOVIS*”, protocolo nº “328-2021, sob a responsabilidade de **Rodrigo Giglioti, Anibal Eugênio Vercesi Filho, Luciana Morita Katiki, Cecília José Veríssimo, Márcia Cristina de Sena Oliveira, Gunta Gutmanis**, que envolve a utilização de bovinos para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO DE ZOOTECNIA, em reunião de **20/08/2021**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica () Treinamento
Vigência do Projeto	01/09/2021 a 01/11/2022
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus/angus, brangus e nelore</i>
No. de Animais	30
Peso/Idade	50-100kg/ 01 dia de vida
Sexo	30/sem sexo definido
Origem	Produção comercial

José Evandro de Moraes
Presidente CEUA-IZ

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO GENÉTICA E DOS PERFIS MOLECULARES EM BOVINOS ANGUS E MISTIÇOS NA RESISTÊNCIA À INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia* spp.

RESUMO – A babesiose, causada principalmente por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, representa um desafio significativo para a pecuária, especialmente considerando que a maioria dos bovinos em regiões tropicais e subtropicais está constantemente exposta à infecção por esses parasitas por meio da presença de carrapatos *Rhipicephalus microplus*. A utilização de raças taurinas nessas regiões enfrenta o desafio da alta suscetibilidade desses animais às doenças transmitidas por carrapatos, logo, programas de cruzamento entre raças zebuínas e taurinas buscam aumentar a heterose, favorecendo resistência a parasitas e adaptação a climas tropicais. Diante disso, o presente estudo teve como objetivos principais avaliar o impacto de uma pequena proporção de genética zebuína na resistência dos animais mestiços (Ultrablack) e analisar o perfil transcricional do sangue de bezerros Angus puros e mestiços naturalmente infectados, identificando genes e vias biológicas associadas a diferentes níveis de resistência. E como objetivos específicos analisar os níveis de infecção por *Babesia* spp. utilizando qPCR, a infestação por carrapatos, os títulos de anticorpos específicos contra *B. bovis* e *B. bigemina* em bezerros Angus e Ultrablack criados em ambiente tropical no Brasil, utilizando ELISA. No capítulo 2 foram estudados os níveis de infecção em bezerros Angus (100% taurinos, n = 17) e Ultrablack (~82% taurinos e 18% zebuínos, n = 14) avaliando-se a influência da composição genética na resistência de bovinos frente à infecção natural por *Babesia* spp. Durante 13 avaliações realizadas entre novembro de 2021 e abril de 2022, foram analisadas as cargas de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* e os níveis de anticorpos IgG específicos. Os resultados mostraram que, embora não houvesse diferenças significativas nos títulos de IgG entre os grupos, os bezerros Ultrablack apresentaram níveis de DNA significativamente maiores, indicando que a baixa proporção de genética zebuína não foi suficiente para conferir maior resistência à babesiose. Esses achados sugerem que maiores proporções de genética zebuína ou outros fatores podem ser necessários para reduzir a suscetibilidade à infecção, fornecendo base para futuras pesquisas sobre melhoramento genético visando resistência à babesiose bovina. No capítulo 3 foram utilizados dez bezerros, sendo cinco Angus (100% taurino) e cinco mestiços (~82% Angus e 18% Zebu). Em dois momentos distintos, foram coletadas amostras de sangue para posterior extração de DNA e RNA de animais sem infecção por *B. bovis* (número de cópias (NC) de DNALog, NC = 0) e com infecção (NC ≥ 2), onde as amostras de DNA foram utilizadas para quantificação do número de cópias de *B. bovis* por PCR quantitativo, permitindo a identificação de animais infectados e não infectados e as amostras de RNA provenientes de 10 animais (número total de amostras coletadas em dois momentos, n= 20; 10 no momento sem infecção e 10 no momento pós-infecção) foram analisadas por RNA-Seq. Devido à diferença de idade entre os grupos, cada grupo genético foi analisado separadamente. No grupo mestiço, foram identificados 40 genes diferencialmente expressos (FDR

$\leq 0,05$; fold change $\log \leq -2,0$ ou $\geq 2,0$), sendo 24 super expressos e 16 menos expressos após a infecção. A análise de anotação gênica revelou diversas vias biológicas, incluindo interações de proteínas virais com citocinas e seus receptores, interações citocina-receptor (reguladas negativamente) e sinalização de IL-17 e quimiocinas (reguladas positivamente). Os resultados fornecem uma visão exploratória dos mecanismos transcricionais envolvidos na resposta à babesiose bovina em animais mestiços Angus $\times$ Zebu. A identificação de vias imunológicas, especialmente IL-17 e sinalização de quimiocina, destaca potenciais alvos para estudos futuros sobre resistência à *B. bovis* e contribui para investigações voltadas à compreensão da interação hospedeiro-parasita.

Palavras-chave: hemoparasitose, infecção, perfil transcricional, *Rhipicepalus microplus*, Taurino

INFLUENCE OF GENETIC COMPOSITION AND MOLECULAR PROFILES IN ANGUS AND CROSSBRED CATTLE ON RESISTANCE TO NATURAL INFECTION BY *Babesia* spp.

ABSTRACT – Babesiosis, primarily caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, represents a significant challenge for the livestock industry, especially considering that most cattle in tropical and subtropical regions are constantly exposed to infection by these parasites through the presence of *Rhipicephalus microplus* ticks. The use of taurine breeds in these regions faces the challenge of high susceptibility to tick-borne diseases; therefore, crossbreeding programs between Zebu and Taurine breeds aim to increase heterosis, favoring parasite resistance and adaptation to tropical climates. In this context, the primary objectives of this study were to evaluate the impact of a small proportion of Zebu genetics on the resistance of crossbred animals (Ultrablack) and to analyze the blood transcriptional profile of naturally infected purebred Angus and crossbred calves, identifying genes and biological pathways associated with different resistance levels. Specific objectives included analyzing *Babesia* spp. infection levels using qPCR, tick infestation, and specific antibody titers against *B. bovis* and *B. bigemina* in Angus and Ultrablack calves raised in a tropical environment in Brazil using ELISA. In Chapter 2, infection levels were studied in Angus (100% taurine, n = 17) and Ultrablack (~82% taurine and 18% zebu, n = 14) calves, evaluating the influence of genetic composition on bovine resistance to natural infection by *Babesia* spp. During 13 evaluations conducted between November 2021 and April 2022, *B. bovis* and *B. bigemina* DNA loads and specific IgG antibody levels were analyzed. The results showed that, although there were no significant differences in IgG titers between the groups, the Ultrablack calves presented significantly higher DNA levels, indicating that the low proportion of Zebu genetics was not sufficient to confer greater resistance to babesiosis. These findings suggest that higher proportions of Zebu genetics or other factors may be necessary to reduce susceptibility to infection, providing a basis for future research on genetic improvement aimed at resistance to bovine babesiosis. In Chapter 3, ten calves were used: five Angus (100% taurine) and five crossbred (~82% Angus and 18% Zebu). At two distinct time points, blood samples were collected for subsequent DNA and RNA extraction from animals without *B. bovis* infection (DNA copy number (CN) log, CN = 0) and with infection (CN ≥ 2). DNA samples were used to quantify the number of *B. bovis* copies via quantitative PCR to identify infected and uninfected animals. RNA samples from 10 animals (totaling 20 samples collected across two time points: 10 at the uninfected stage and 10 at the post-infection stage) were analyzed by RNA-Seq. Due to the age difference between the groups, each genetic group was analyzed separately. In the crossbred group, 40 differentially expressed genes (FDR ≤ 0.05; log fold change ≤ -2.0 or ≥ 2.0) were identified, with 24 upregulated and 16 downregulated after infection. Gene annotation analysis revealed several biological pathways, including viral protein interactions with cytokines and their receptors, cytokine-cytokine receptor interactions (downregulated), and IL-17 and chemokine signaling (upregulated). These results provide an exploratory view of the transcriptional

mechanisms involved in the response to bovine babesiosis in Angus × Zebu crossbred animals. The identification of immunological pathways, especially IL-17 and chemokine signaling, highlights potential targets for future studies on resistance to *B. bovis* and contributes to investigations aimed at understanding host-parasite interactions.

Keywords: Hemoparasitosis, infection, transcriptional profile, *Rhipicephalus microplus*, taurine

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas podem representar uma grande ameaça à pecuária em todo o mundo (Doeschl-Wilson et al., 2021). O desenvolvimento e a transmissão de hemoparasitas por carrapatos vetores é um fenômeno que ocorre juntamente com o ciclo de alimentação do carrapato. A infecção inicial no carrapato ocorre nas células epiteliais do seu intestino médio e após o desenvolvimento e multiplicação dos parasitas nas glândulas salivares pode ocorrer a transmissão quando este se alimenta (Kocan, 1995).

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças formado pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a rickettsia *Anaplasma marginale*. Nos bovinos, ambas as espécies de babesias são transmitidas exclusivamente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, sendo, portanto, consideradas doenças endêmicas em regiões onde o carrapato bovino está presente (Bock et al., 2004). No Brasil a babesiose ocorre em grande parte do território nacional (Pupin et al., 2019; Henker et al., 2020) sendo relatado na literatura diversos surtos da doença em determinadas épocas do ano (Canever et al., 2014).

Os prejuízos econômicos gerados pelos agentes infecciosos causadores da TPB, são de grande importância para a indústria pecuária de regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barros et al., 2005). Grisi et al. (2014), relataram que os prejuízos diretos e indiretos causados pelas infestações por *R. microplus* foram estimados em 3.24 bilhões de dólares. Sendo os custos referentes às babesioses e anaplasmoses não apenas à mortalidade de animais, abortos, perda na produção de leite/carne, mas também nas medidas de controle como: tratamentos acaricidas, compra de vacinas e protocolos terapêuticos para tratamento dos animais doentes (Bock et al., 2004).

Segundo Waal e Combrink (2006), em áreas endêmicas, o carrapato é mais difícil de ser controlado, além do custo elevado empregado nos métodos de seu controle. De acordo com esses autores, a TPB pode ser controlada pela erradicação de carrapatos ou pela manutenção de seus números baixos para que grandes surtos não ocorram. Contudo, estudos mais recentes realizados

por Giglioti et al. (2016; 2018) demonstraram que a variação dos níveis de infecção por hemoparasitas não dependem dos níveis de infestação de carrapatos nos bovinos. Além disso, um manejo intensivo do carrapato para o controle indireto da doença poderá promover o desenvolvimento da resistência parasitária desse vetor (Jonsson et al., 2000; Mekonnen et al., 2002).

As *Babesias* podem causar infecções agudas e persistentes em bovinos adultos sem exposição prévia ao agente infeccioso, sendo a doença em forma mais grave e maior taxa de mortalidade associada à infecção por *B. bovis*. No caso de animais jovens já foi verificado que estes apresentam maior resistência à infecção por *B. bovis* quando comparados a bovinos adultos, estando essa resistência relacionada ao sistema imunológico desses animais (Brown et al. 2006).

Dentre os fatores que estão associados aos surtos dessa doença são o desenvolvimento crescente da resistência a acaricidas, assim como a disseminação de carrapatos infectados e as condições climáticas favoráveis em áreas que normalmente são livres desses hemoparasitas (Waal & Combrick, 2006).

Estudos referentes à resistência ou suscetibilidade de bovinos a babesiose tem sido relatados em literatura. Em relação à infecção por *B. bovis*, os animais zebuínos se mostraram mais resistentes quando comparados aos animais taurinos (Zwart e Brocklesby, 1979; Bock et al. 1997; Bock et al., 1999). Benavides e Sacco (2007) identificaram três fenótipos: resistente, intermediário e animais suscetíveis ao desafiar bovinos sem contato prévio com *B. bovis*, contudo, os genes responsáveis por essa variação não são conhecidos. Embora, estudos já tenham avaliado a possibilidade de realização de seleção fenotípica, e mais recentemente, de seleção genômica para resistência de carrapatos (Porto-Neto et al., 2011; Cardoso et al. 2015; Mapholi et al., 2016), não há estudos focados para seleção de resistência à babesiose.

O sequenciamento total do RNA (RNA-Seq) é uma ferramenta de análise precisa e abrangente de *loci* expressos dentro de células e tecidos (Mortazavi et al., 2008), fornecendo uma imensa quantidade de novas informações sobre expressão gênica, estrutura de transcrição, função e regulação em nível de todo transcriptoma (Weikard et al., 2015). Em relação ao uso do RNA-seq para estudos de transcriptoma utilizando amostras de RNA de

sangue de bovinos relacionados às infestações por carrapatos e infecções causadas por este carrapato vetor, não há em literatura trabalhos envolvidos nessa linha de pesquisa. Diante disso, por meio dos dados obtidos pelo transcriptoma de amostras de RNA extraídas do sangue de bovinos infectados naturalmente por *B. bovis*, espera-se identificar genes diferencialmente expressos relacionados à resistência a infecções por esse hemoparasita. Nesse contexto, a hipótese central é que a pequena proporção de genética zebuína proporcione um aumento na resistência dos animais mestiços; assim, bezerros Ultrablack apresentariam menores níveis de infestação por carrapatos e menor carga parasitária de *B. bovis* (detectada via qPCR) do que bezerros Angus. Adicionalmente, espera-se que existam diferenças significativas no perfil de expressão gênica entre os dois grupos, permitindo a identificação de genes e vias biológicas específicas ligadas à resposta frente à infecção desses animais.

Com a possibilidade da seleção de bovinos de raças taurinas ou cruzamentos para a resistência à babesiose, será possível facilitar o controle desta doença, e consequentemente, estimular criadores a aumentarem a produção dos seus rebanhos ao utilizarem animais mais produtivos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência dos bovinos a babesiose

Com ampla distribuição geográfica, a *Babesia bigemina* e a *B. bovis* são detectadas em países de regiões tropicais e subtropicais, como América Central e do Sul, Austrália, Ásia, África e sul da Europa, apresentando prevalência elevada, estimada em 22% e 20%, respectivamente (Jacob et al., 2020).

Todos os parasitas do gênero *Babesia* podem levar a um quadro de anemia, porém a *Babesia bovis* possui início rápido e as infecções primárias geralmente são fatais, isso em razão de seu potencial de virulência ser maior em comparação às demais espécies, sendo resultante do sequestro de eritrócitos infectados para o endotélio dos microcapilares de órgãos vitais, podendo levar a uma síndrome de choque hipotensivo, disfunção ou

insuficiência cerebral, renal e pulmonar (Wright e Goodger, 1988; Clark e Jacobson, 1998; Schetters e Eling, 1999; Brown et al., 2006).

A intensidade com que a babesiose bovina se manifesta pode depender de alguns fatores, como idade, genética e condição imunológica dos animais, além da virulência específica das cepas de *Babesia* envolvidas (Bock et al., 2004 ; Schnittger et al., 2012).

Do ponto de vista do sistema imunológico, a resposta adaptativa contra as babesias é subdividida em imunidade celular e humoral (Benavides et al., 2006). Como as babesias infectam apenas eritrócitos, a resposta imune adaptativa à infecção subsequente e proteção contra doença clínica é dependente da apresentação de antígenos do parasita por células apresentadoras de antígeno para linfócitos T CD4 +.

Os animais que sobrevivem à infecção por *B. bovis*, naturalmente ou após o tratamento medicamentoso, podem permanecer persistentemente infectados e resistentes à doença clínica (Brown et al., 2006). Além disso, os animais jovens são mais resistentes ao desenvolvimento da forma clínica grave da doença em comparação aos animais adultos (Trueman e Blight, 1978; Goff et al., 2001). Isso em razão dos animais jovens resistentes à infecção por *B. Bovis* expressarem anteriormente e em níveis superiores a Interleucina 12 (IL-12), IFN- γ e ON (óxido nítrico), quando comparados com bovinos adultos infectados (Goff et al., 2001; Brown et al. 2006). A interleucina IL-12 é sintetizada por macrófagos, células dendríticas e células B, na qual estimula a atividade de células com perfil Th1, por meio da síntese de IL-2 e do Fator de Necrose Tumoral alfa (IFN- α), potencializando a proliferação e a citotoxicidade das células T e Natural Killer (NK) (Tizard, 2008). Assim, a IL-12 atua como fator de diferenciação sobre as células T CD4+ para um padrão de resposta imunológica do tipo Th1.

O uso de animais *Bos taurus taurus* e seus cruzamentos com *Bos taurus indicus*, está cada vez mais frequente no Brasil. Alguns estudos realizados (Wheeler, Cundiff e Koch 1994; Lages et al., 2012) demonstraram que algumas características relacionadas a qualidade de carne, como maciez e grau de marmoreio, são superiores em animais *B. t. taurus* e suas cruzas com *B. t. indicus*, quando comparados com animais *B. t. indicus* puros. Animais zebuínos são mais resistentes a infestações por *R. microplus* quando comparados aos

bovinos taurinos (Wambura et al., 1998; Porto-Neto et al., 2011; Jonsson et al., 2000; Biegelmeyer et al., 2015). Diante disso, o cruzamento entre zebuínos e taurinos visa melhorar a produtividade e a eficiência dos rebanhos.

Com base em dados fenotípicos, Benavides e Sacco (2007) utilizaram animais provenientes de uma região considerada livre de carrapatos e os avaliaram quanto ao comportamento frente à infecção artificial por *B. bovis*. Os resultados obtidos demonstraram a existência de variação fenotípica para *B. bovis* nos animais estudados (suscetíveis, intermediários e resistentes); contudo, o estudo utilizou apenas animais *B. t. taurus* e dados fenotípicos.

2.2. Métodos para detecção e quantificação de hemoparasitas

Um método direto, considerado de baixo custo e de fácil execução para a identificação do hemoparasita nos eritrócitos é o esfregaço de sangue, sendo a amostra colhida de capilares presentes em ponta de orelhas ou cauda e posteriormente corado com Giemsa (Bock et al., 2004), contudo esse método apresenta baixa sensibilidade.

Estudos envolvendo a associação de testes imunológicos e detecção molecular dos agentes da TPB também vêm sendo conduzidos (Ramos et al., 2011; Shebish et al., 2012; Machado et al., 2012; Mousa et al., 2013; Ibrahim et al., 2013; Hüe et al., 2013; Rosales et al., 2013). Os métodos sorológicos constituem métodos indiretos de diagnóstico, que detectam anticorpos sintetizados pelo organismo dos bovinos contra os agentes infecciosos. Em destaque, o ELISA fornece um resultado quantitativo (Böse et al., 1990). Estudos conduzidos por Giglioti et al. (2016) observaram, ao utilizarem o método ELISA, que animais com altos títulos de IgG anti-*B. bovis* apresentaram baixos níveis de infecção por esse patógeno (previamente avaliados por qPCR em tempo real). Verificou-se, assim, uma baixa correlação entre o nível de infecção e os níveis de anticorpos específicos. Um dos principais problemas associados ao uso do ELISA para a detecção da babesiose bovina é a ocorrência de reações cruzadas entre *B. bovis* e *B. bigemina* mesmo usando proteínas recombinantes com sequências heterólogas entre as espécies (Boonchit et al., 2002; Ortiz et al., 2018).

Os ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) apresentam diversas vantagens em relação à PCR convencional: além de serem mais sensíveis, permitem a quantificação da carga parasitária e reduzem o risco de contaminação, uma vez que a detecção e a quantificação ocorrem em um único tubo durante o processo de amplificação, eliminando a necessidade de manipulações pós-PCR (Byaruhanga et al., 2023).

Técnicas de qPCR são usadas atualmente para detectar e quantificar *Babesia spp.* e *Anaplasma spp.* em amostras de sangue (BULING et al., 2007; CARELLI et al., 2007). Giglioti et al. (2016) utilizaram a qPCR afim de estimar os níveis de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue de bovinos Angus criados em área endêmica do estado de São Paulo, na região sudeste do Brasil. Os autores encontraram baixos valores de repetibilidade para níveis de infecção nesses animais em duas avaliações consecutivas. Em estudos posteriores, Giglioti et al. (2018) usaram a qPCR para monitorar os níveis de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em gado Canchim (5/8 Charolês / Zebu) e concluíram que a idade pode influenciar na repetibilidade dessas características.

Byaruhanga et al. (2023) analisaram as sequências de *B. bovis* presente no sul do África com o intuito da identificação de possíveis variações em relação às sequências de referência. Os autores indentificaram alta diversidade de cepas de *B. bovis* na região e posteriormente realizaram ensaios de qPCR (18S rRNA) os quais conseguiram determinar os níveis de infecção do parasita em amostras coletadas a campo.

A identificação do nível de infecção por *Anaplasma marginale* também foi possível em ensaios de qPCR realizados por Carelli et al. (2007), onde os autores concluíram que tal ferramenta possibilita a detecção e quantificação de ricketsemia em bovinos infectados, a avaliação da correlação precisa entre os níveis de ricketsemia e a ocorrência de sinais clínicos, a avaliação da eficácia de vacinas e a possibilidade do acompanhamento após o tratamento com medicamentos específicos.

2.3. Avaliação da expressão gênica utilizando RNA-seq

O RNA-Seq apresenta vantagens relevantes na análise do transcriptoma, possibilitando a identificação de transcritos inéditos, isoformas resultantes de *splicing* alternativo e a quantificação da expressão gênica específica de alelos e isoformas (Zhao et al., 2014).

Ueti et al. (2021) realizaram uma comparação entre hospedeiros artrópodes e vertebrados utilizando o RNA-Seq para avaliar possíveis diferenças entre os perfis de expressão desses organismos frente às infecções por *B. bovis*. Os pesquisadores verificaram que o parasita apresenta perfis de expressão distintos entre esses hospedeiros, concluindo que tais resultados reforçam a hipótese de que genes diferencialmente expressos possam atuar em funções-chave do patógeno

A fim de compreender a regulação gênica da *Babesia* durante a infecção em hospedeiros mamíferos e carrapatos, Capelli-Peixoto et al. (2022) utilizaram o RNA-Seq em amostras de bezerros e carrapatos *R. microplus* infectados por *B. bigemina* e identificaram genes diferencialmente expressos tanto em *kinetes* presentes no carrapato vetor quanto em estágios sanguíneos em hemácias bovinas, destacando potenciais genes essenciais para o desenvolvimento do parasita em hospedeiros invertebrados e mamíferos.

Vimonish et al. (2025) utilizaram o RNA-Seq para analisar hemócitos de *Rhipicephalus microplus* infectados por *B. bovis* e *B. bigemina*. Os autores identificaram diversos genes diferencialmente expressos relacionados a vias metabólicas, ao sistema imunológico inato e ao rearranjo do citoesqueleto, evidenciando respostas específicas frente à infecção.

3. REFERÊNCIAS

Barros, S.L.; Madruga, C.R.; Araújo, F.R.; Menk, C.F.; Almeida, M.A., Melo, E.P.S.; Kessler, R.H.; (2005). Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of Bahia, Brazil, by enzyme linked immunosorbent assays. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** 100 (6): 613-617.

Benavides, M. V.; Sá, G. L.; Sacco, A. M. S. (2006). Resposta Imune dos Bovinos Frente à Infecção por *Babesia bovis*. Editoração Eletrônica, Embrapa Pecuária Sul, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa** 60: 32.

Benavides, Magda Vieira; Sacco, Ana Maria Sastre. (2007). Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary parasitology**, v. 150 (1-2): 54-64.

Biegelmeyer, P., Nizoli, L. Q., Da Silva, S. S., dos Santos, T. R. B., Dionello, N. J. L., Gulas- Gomes, C. C., & Cardoso, F. F. (2015). Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology** 208(3-4):, 231-237.

Bock, R.; Jackson, L.; De Vos, A. J.; Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. **Parasitol.** 129:247- 69.

Bock, R. E.; Kingston, T. G.; De Vos, A. J. (1999). Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.** 77: 461-464.

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*. **Aust. Vet. J.** 75(5):337-40.

Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W.L., Wagner, G., Igarashi, I. (2002). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Recombinant Rhoptry-Associated Protein 1 Antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in Cattle. **Vet. Res. Commun.** 40 (10): 3771-3775.

Böse, R., Jacobson, R.H., Gale, K.R., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G., (1990). An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *Babesia bovis* antigen. **Parasitol.** 76: 648–652.

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

Buling, A., Criado-Fornelio, A., Acenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J.C., Florin-Cristensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *B. bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary parasitology** 147: 16-25.

Byaruhanga, C., Makgabo, S. M., Choopa, C. N., Mulandane, F. C., Vorster, I., Troskie, M., ... & Collins, N. E. (2023). Genetic diversity in *Babesia bovis* from southern Africa and estimation of *B. bovis* infection levels in cattle using an optimised quantitative PCR assay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 14: 102084.

Canever, M. F., Vieira, L. L., Reck, C., Richter, L., & Miletto, L. C. (2014). First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean journal of parasitology** 52(5): 507.

Capelli-Peixoto J, Saelao P, Johnson WC, Kappmeyer L, Reif KE, Masterson HE, Ueti MW, (2022). Comparison of high throughput RNA sequences between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* revealed consistent differential gene expression that is required for the Babesia life cycle in the vertebrate and invertebrate hosts. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 12: 1093338.

Cardoso, F.F.; Gomes, C.C.G.; Sollero, B.P.; Oliveira, M.M.; Roso, V.M.; Piccoli, M.L.; Higa, R.H.; Yokoo, M.J.; Caetano, A.R.; Aguilar, I. (2015). Genomic prediction for tick resistance in Bradford and Hereford cattle. **Journal of Animal Science** 93: 2693-2705.

Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., ... & Buonavoglia, C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary microbiology**, 124: 107-114.

Clark, I.A., Jacobson, L.S. (1998). Do babesiosis and malaria share a common disease process? **Ann Trop Med Parasitol** 92(4): 483-8.

Doeschl-Wilson A, Knap PW, Opriessnig T, More SJ, (2021) Review: Livestock disease resilience: from individual to herd level. **Animal** 15: 100286.

Giglioti, R.; Oliveira, H.N.; Okino, C.H.; Oliveira, M.C.S. (2018). qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Exp. Appl. Acarol.** 75, p.235 – 240.

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.C.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: 657-662.

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-gamma and inducible

nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunol.** 23(9): 463-471.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH, (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 23: 150–156.

Henker, L. C., Lorenzetti, M. P., Fagundes-Moreira, R., Dalto, A. G. C., Sonne, L., Driemeier, D., Pavarini, S. P. (2020). Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 11(4): 101443.

Hüe, T., Graille, M., Mortelecque, A., Desoutter, D., Delathière, J., Marchal, C., Teurlai, M., Barré, N., (2013). Diagnostic methods used to monitor an outbreak of babesiosis (*Babesia bovis*) in a herd of feral cattle in New Caledonia. **Aust. Vet. J.** 9: 254–258.

Ibrahim, H.M., Adjou Moumouni, P.F., Mohammed-Geba, K., Sheir, S.K., Hashem, I.S.Y., Cao, S., Terkawi, M.A., Kamyngkird, K., Nishikawa, Y., Suzuki, H., Xuan, X. (2013). Molecular and serological prevalence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle and water buffalos under small-scale dairy farming in Beheira and Faiyum Provinces. **Egypt. Vet. Parasitol.** 198, 187–192.

Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., et al. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. **Veterinary parasitology** 283: 109136.

Jonsson, N.N.; Matschoss, A.L.; Pepper, P.; Green, P.E.; Ansell, J. (2000) Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*) **Veterinary parasitology** 89: 297-305.

Kocan KM, (1995) Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology** 57: 121-151.

Machado, R.Z., Toledo, C.Z.P., Teixeira, M.C.A., André, M.R., Freschi, C.R., Sampaio, P.H., (2012). Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil **Veterinary parasitology** 186: 461–465.

Mapholi, N.O., Maiwashe, A., Matika, O., Riggio, V., Bishop, S.C., MacNeil, M.D., et al. (2016). Genome-wide association study of tick

resistance in South African Nguni cattle. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7: 487–97.

Mekonnen S, Bryson NR, Fourie LJ, Peter RJ, Spickett, AM, Taylor RJ, Strydom T, Horak IG, (2002) Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res** 69: 99–105.

Mortazavi, A.; Williams, B.A.; Mccue, K.; Schaeffer, L.; Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods** 5:621–628.

Mousa, A.A., Cao, S., Aboge, G.O., Terkawi, M.A., Kirdasy, A., El Salama, A., Attia, M., Aboulaila, M., Zhou, M., Kamyngkird, K., Moumouni, P.F.A., Masatani, T., Aziz, S.A.A., El Moussa, W.M., Chahan, B., Fukumoto, S., Nishikawa, Y., Ballal, S.S., ElXuan, X., (2013). Molecular characterization and antigenic properties of a novel *Babesia gibsoni* glutamic acid- rich protein (BgGARP). **Exp. Parasitol.** 135: 414–420.

Ortiz, J.M.J., Montenegro, V.N., Fournière, S. A. M., Sarmiento, N.F., Farber, M.D., Wilkowsky, S.E. (2018). Development of an Indirect ELISA based on a recombinant chimeric protein for the detection of antibodies against Bovine Babesiosis. **Vet. Sci.** 5: 1-8.

Porto-Neto L.R., Bunch, R.J., Harrison, B.E., Barendse, W. (2011). DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Anim Genet.** 42: 50–55.

Pupin, Rayane Chitolina et al. (2019). Retrospective study of epidemiological, clinical and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995–2017). **Ticks and tick- borne diseases** 10: 36-42.

Ramos, CAN, Araújo, FR, Souza, IIF, Bacanelli, G, Luiz, HL, Russi, LS, Oliveira, RHM, Soares, CO, Rosinha, GMS, Alves, LC, (2011) Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary parasitology** 176: 79–83.

Rosales, R, Rangel-Rivas, A, Escalona, A, Jordan, LS, Gonzatti, MI, Aso, PM, Perrone, T, Silva-Iturriza, A, Mijares, A, (2013) Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. **Veterinary parasitology** 196: 37–43.

Schettters, TP, Eling, WM (1999) Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria? **Parasitol. Today** 15: 492-497.

Shebish, E, Vemulapalli, R, Oseto, C, (2012) Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. **Veterinary parasitology** 188: 164–167.

Tizard, IR (2008) *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. 8º ed., Elsevier 587p.

Trueman, KF, Blight, GW (1978) The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Aust Vet J.** 54: 301-5.

Ueti M W, Johnson WC, Kappmeyer LS, Herndon DR, Mousel MR, Reif K E, Brayton KA, (2021). Comparative analysis of gene expression between *Babesia bovis* blood stages and kinetes allowed by improved genome annotation. *International Journal for Parasitology*, 51(2-3), 123-136.

Vimonish, R., Capelli-Peixoto, J., Johnson, W., Kappmeyer, L., Saelao, P., Taus, N., ... & Ueti, M. (2025). Transcriptomic analysis of *Rhipicephalus microplus* hemocytes from female ticks infected with *Babesia bovis* or *Babesia bigemina*. **Parasites & Vectors** 18: 37.

Waal DT, Combrink MP, (2006) Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary parasitology** 138: 88-96.

Wambura PN, Gwakisa PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA, (1998) Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary parasitology** 77: 63-70.

Weikard R, Demasius W, Hadlich F, Kühn C, (2015) Different blood cell-derived transcriptome signatures in cows exposed to vaccination pre- or postpartum. **Plos One** 10:0136927.

Wheeler TL, Cundiff LV, Koch RM, (1994). Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of animal Science** 72: 3145-3151.

Wright IG, Goodger, BV (1988). Pathogenesis of babesiosis. In M Ristic, Babesiosis of domestic animals and man, CRC Press, Boca Raton. 99-118p.

Zhao, S., Fung-Leung, W.P., Bittner, A., Ngo, K., Liu, X., (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PloS One** 9: e78644.

Zwart D, Brocklesby DW, (1979) Babesiosis: non specific resistance immunological factors and pathogenesis. **Advances in Parasitology** 17: 49–112.

CAPÍTULO 2 – A small proportion of Zebu genetic background in crossbred calves may not be enough to improve resistance against natural bovine *Babesia* spp. infections¹

Bianca Tainá Azevedo ^a, Henrique Nunes de Oliveira ^a, Luciana Morita Katiki ^b, Anibal Eugênio Vercesi Filho ^b, Ana Gonçalves Domingos ^c, Sandra Antunes ^c, Cintia Hiromi Okino ^d, Márcia Cristina de Sena Oliveira ^d, Adriana Mércia Guaratini Ibelli ^d, Rodrigo Giglioti ^b

^a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, São Paulo, Brazil

^c Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

^d Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

The main objective of cattle breeders in tropical and subtropical regions is to acquire animals with taurine- productive traits adapted to the broad weather range of these regions. However, one of the main challenges on using taurine genetics in these areas is the high susceptibility of these animals to tick-borne diseases. Consequently, the present study evaluated from 10 November 2021–19 April 2022, the over 13 assessments, the *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA loads and the IgG anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* levels in Angus (n = 17, 100% Taurine) and Ultrablack (n = 14, ~82% taurine and 18% Zebu) calves. Data were analyzed using a multivariate mixed model with repeated measures of the same animal including the fixed effects of evaluation, genetic group, sex, *Babesia* spp., and their interactions. The repeatability values were estimated from the (co) variances matrix and expressed for each species. The correlations between the DNA loads (CNlog) and IgG titers (S/P) values for the two species were also estimated using the same model. Regarding the specific IgG antibody titers for both *Babesia* spp., no significant differences were observed between the two genetic groups. However, for *B. bovis* and *B. bigemina* DNA loads, Ultrablack calves presented significantly higher values than Angus calves. Under the conditions evaluated in this study, our findings suggest that the low percentage of Zebu genetic in the Ultrablack breed was insufficient to improve resistance against babesiosis. Further studies must demonstrate if the low percentages of Zebu genetics in Taurine breeds can modify the susceptibility to babesiosis infections.

Keywords: Antibody; Babesiosis; Bovine resistance; Genetic group; Parasite load

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Veterinary Parasitology v. 328, p. 110165, 2024 (<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110165>).

1. Introduction

Cattle producers utilize crosses between *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* as a strategy to achieve greater productive capacity. F1 crossbred cattle between Zebu x taurine cattle exhibit an increase in heterosis related to resistance to parasites and increased productivity, presenting better traits than the zebuine or taurine pure breeds (Seifert, 1971; Peacock et al., 1981). However, one of the main obstacles to using cattle with a high degree of taurine genetic is the higher susceptibility of these animals to parasites. Ticks and tick-borne agents are responsible for one of the main diseases that affect cattle herds and cause substantial economic losses in the livestock industry in tropical and subtropical regions (Barros et al., 2005). The direct and indirect losses caused by infestations with *Rhipicephalus microplus* were estimated at 3.24 billion dollars (Grisi et al., 2014).

In Brazil, bovine babesiosis is caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, which are exclusively transmitted by the one host tick *R. microplus* (Guglielmone, 1995; Oliveira-Sequeira et al., 2005). The most common manifestations of acute cases of babesiosis include fever, hemolytic anemia, icterus, weakness and haemoglobinuria, whereas chronic infections are usually subclinical (Bock et al., 2004; Schnittger et al., 2012). The most significant losses are attributed to *B. bovis* due to its higher pathogenicity than *B. bigemina*. Erythrocytes infected by *B. bovis* accumulate in the capillaries of various organs, including the brain and lungs, leading to often fatal clinical complications such as cerebral babesiosis, respiratory distress and multi organ failure (Gohil et al., 2013).

The occurrence of these hemoparasites in cattle usually depends on the tick's population dynamics, which require favorable climatic conditions. Most Brazilian regions are predominantly tropical, with a small proportion subtropical, favoring the vector ticks' development and consequently blood parasite infections (Frabetti et al., 2023).

The use of quantitative PCR (qPCR) may provide an estimate of the quantification of bovine *Babesia spp.* DNA levels, and the obtained results are frequently used to indicate the resistance/susceptibility of cattle from different genetic groups to these infections (Bilhassi et al., 2014; Giglioti et al. 2016,

2018, 2020). Furthermore, several studies have combined immune responses and molecular tests to detect *Babesia spp.*, aiming to better elucidate the mechanisms of host-parasite interactions involved in the resistant phenotype (Jaffer et al., 2010; Ramos et al., 2011; Machado et al., 2012; Shebish et al., 2012; He et al., 2013; Ibrahim et al., 2013; Rosales et al., 2013; Giglioti et al., 2017).

The inclusion of Zebu breeds in breeding programs with taurine breeds has been applied to increase heterosis, especially regarding traits associated to enhanced parasitic resistance and adaptability to tropical climates. According to the Australian Brangus Cattle Association (ABCA), "Ultrablack" or "Ultrared" cattle were developed by crossing Brangus (Brahman x Angus) with Angus breeds that are black or red, respectively. To be eligible for registration in the Ultra Register, these cattle breeds must have Brahman genetic content ranging from 8% to 25%. According to the International Brangus Breeders Association (IBBA), the small proportion of Zebu cattle genetics in the Ultra breed can enhance the slicking hair ability of the animals, improve the environmental adaptability and reproductive performance of the resulting offspring. Additionally, this breed combines the environmental adaptability and maternal excellence of the Brangus breed with exceptional meat marbling and calving ease.

Therefore, the present study evaluated the levels of *Babesia spp.* infection, tick loads, and specific antibody titers for *B. bovis* and *B. bigemina* in Angus and Ultrablack calves raised under tropical conditions in Brazil, using qPCR and ELISA assays, and verified the effect of a small amount of Zebu genetics on Ultrablack resistance to these parasites.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

Thirty-one calves, from the municipality of José Bonif  cio (São Paulo, Brazil; coordinates 21   2' 23" S, 49   41' 28" W) and representing two breeds, were used: Angus (n=17; 12 females and five males) and Ultrablack (n=14; six females and eight males). At the beginning of the experiment, the average ages of calves from the Angus and Ultrablack genetic groups were 2.8   1.6 months

and 2.1 ± 1.3 months, respectively. In the same order, the Angus group had maximum and minimum ages of 150 days and 13 days, while the Ultrablack group had maximum and minimum ages of 137 days and 13 days, respectively. According to the breeder's records, the Ultrablack breed was produced by crossing Brangus (3/8 Zebuine and 5/8 Angus), resulting in a zebu genetic composition representing approximately half of that of the Brangus breed parents (approximately 18%). Thirteen samplings were conducted at average intervals of 12 days between 10 November 2021 and 19 April 2022 (1st to 13th: 10-Nov-21, 17-Nov-21, 24-Nov-21, 8-Dez-21, 21-Dez-21, 5-Jan-22, 19-Jan-22, 31-Jan-22, 15-Fev-22, 2-Mar-22, 16-Mar-22, 30-Mar-22, 19-Abr-22), resulting in a total of 403 observations. Previous studies have confirmed that this region evaluated was considered endemic for babesiosis (Bilhassi et al., 2014; Giglioti et al., 2018). During the experimental period, the animals were constantly exposed to natural infestation by the tick vector *R. microplus*, and at all evaluations, the animals presented a score of tick infestations ≥ 1 (Frabetti et al., 2023). The mean rainfall levels for the six months of the experimental period were 2.9, 2.8, 9.1, 10.2, and 2.7 mm, respectively (National Institute of Meteorology - INMET, José Bonifácio station, São Paulo). The calves were kept in rotated paddocks comprising coast-cross grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). Tick controls were performed every 21 days by the application of fipronil pour-on (Topline®). Hemoparasite controls were performed when animals presented clinical signs. This experiment adhered to the ethical principles of animal experimentation of the Instituto de Zootecnia Ethics Committee on Animal Experimentation (Protocol Nr. 328–2021).

2.1.1. Tick counts and sample processing

For each animal, *R. microplus* counts were based on the tick infestation scores (IS), which were assigned for all stages of parasite development, including adult females. This methodology was originally developed by Fraga et al. (2003) and subsequently modified by Frabetti et al. (2023): IS=0 (no visible tick instars), IS=1 (up to 20 ticks), IS=2 (20–60 ticks), IS=3 (60–100 ticks), and IS=4 (>100 ticks). At the time of each tick count, two blood samples were collected from the jugular vein of each animal using a vacuum system

(Vacutainer®, Becton Dickinson), one containing the anticoagulant EDTA for DNA extraction, and the other, without anticoagulant, for serum separation.

Blood samples with EDTA underwent DNA extraction using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit, following the protocol for isolating genomic DNA from 300 µL of whole blood (cat. No. A1620, Promega®, Madison, WI, USA). The DNA samples were assessed for purity and concentration using a BioDrop spectrophotometer (BioDrop uLITE, Biochrom Ltd, UK) and then diluted in TE buffer (Tris-EDTA, pH 7.8) at a ratio of 1:4 (DNA: TE). The serum from blood samples without anticoagulant was transferred into microtubes. Both DNA and serum samples were frozen at – 20° C until analysis.

2.2. qPCR assays

The DNA copy number (CNlog) of *B. bovis* and *B. bigemina* was estimated by absolute quantification as described by Okino et al. (2018), using primers and probes that flank a 98 nucleotide fragment located in the gene encoding the cytochrome b mitochondrial gene (cybmt).

The PCR assays were performed using the CFX™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA, USA), with a reaction volume of 10 µL: 2 µL 5x HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 0.5 µL of each primer (10 µM), 0.5 µL of probe (2.5 µM), 4.0 µL of nuclease-free water, and 2.0 µL of the DNA sample. The thermal conditions were set to 10 minutes at 95° C, followed by 40 cycles of 95° C (denaturation) for 15 seconds and 60° C (annealing/extension) for 1 minute. The samples were analysed in duplicates, including positive and negative controls. The calibration curve for the quantification of *B. bovis* and *B. bigemina* DNA was constructed using synthetic DNA, gBlocks® gene fragments (IDT, IA, USA). The gBlocks® fragments representing each target sequence of *B. bovis* and *B. bigemina* cybmt were subjected to 10-fold serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻¹⁰).

2.3. Recombinant indirect ELISA assays

Serum samples were analysed by the recombinant indirect ELISA assay following the methodology described by Terkawi et al. (2011) and modified by

Okino et al. (2020). In brief, polystyrene high-bind microplates (Cat. CLS3590, Sigma, St. Louis, USA) were coated overnight at four °C with 0.19 µg of recombinant protein BbSBP4 (*B. bovis*) or Bbi- gRAP (*B. bigemina*) (Terkawi et al., 2011) (Genscript, USA synthesized both proteins), using delimited protein sequences diluted in 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. The plates were washed (all washing steps were performed using 0.05% Tween 20 PBS, repeated six times) and incubated with 100 µL of blocking solution (3% skimmed milk in PBS) at 37° C for 1 hour. After that, the plates were washed and incubated with 50 µL of serum samples (diluted 1:100 in a blocking solution) at 37° C for 1 hour, followed by washing and incubating with sheep anti-IgG bovine antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Cat.AAI23P, Bio-rad) diluted at 1: 4000 in a blocking solution. After this, the plates were washed and incubated with 100 µL of SIG- MAFAST OPD (Cat. P9187, Sigma) at room temperature (20–25° C) for 15 min. The enzymatic reaction was blocked by adding 50 µL of 1 M HCl solution. All samples were tested in duplicates, and standard controls (positive and negative serum) were included in each plate. Optical density (OD) at 490 nm was measured using Model 550 of the micro- plate reader (Biorad). The (OD) values were transformed into sample/positive (S/P) using the following equation: $(\text{OD of the sample} - \text{OD of negative control serum}) / (\text{OD of positive control serum} - \text{OD of negative control serum})$.

2.4. Statistical analysis

The CNlog and S/P values were analyzed using mixed model methods, employing two different models: (i) to estimate repeatability and compare means, and (ii) to estimate associations between variables (CNlog, S/P, and IS values). Model (i) was applied to each variable separately and included repeated measurements of the same animal. The effects of evaluation (EV), genetic group (GG), sex, and the interaction between EV and GG were considered as fixed effects. The covariance matrix assumed a first-order autoregressive structure (AR (1)). The repeatability levels were estimated from the (co) variance matrix, expressed for each species as the correlation between measures taken from the same individual across evaluations. Model (ii) was

multivariate with repeated measurements in the same animal, including the fixed effects of EV, GG, variable analysis (VA) (CN log and S/P values for each *Babesia spp.*, and tick score values), sex, and the interactions between EV x GG and EV x GG x VA. This model used a structure for the (co) variance matrix of direct product structures (UN@CS) designed for multivariate repeated measures. For both models, all analyzed variables were precorrected for the animal's age effect for each evaluation, using the fixed effects of GG and sex in the model. A $p\text{-value} \leq 0.05$ was considered statistically significant for both models.

3. Results

For all analyzed variables (CNlog, S/P, and IS), the evaluation effect (EV) was significant ($p < 0.001$), whereas the sex effect was not significant ($p > 0.05$), except for IS, where males presented higher infestation than females.

For IS, there was no significant effect of GG ($p = 0.8157$). However, significant effects of the interaction between GG and EV ($p < 0.0001$) were observed. The distribution of mean scores along with their standard errors for each assessment is shown in Fig. 1. The average IS in females (1.65 ± 0.06) was significantly lower ($p = 0.0379$) than males (1.85 ± 0.07).

Regarding the general means of DNA loads (CNlog), the Ultrablack group showed significantly higher values compared to Angus for both *B. bovis* ($p = 0.0174$) and *B. bigemina* ($p < 0.001$). The CNlog means, followed by standard errors for *B. bovis* and *B. bigemina* and for Angus and Ultrablack breeds, were 1.43 ± 0.09 , 1.76 ± 0.09 , 3.18 ± 0.11 , and 4.10 ± 0.11 , respectively. The interaction effect of EV x GG was also significant ($p < 0.01$) for both *Babesia spp.* However, only one evaluation (8-Dec-21) showed significantly higher levels of *B. bovis* DNA in the Ultrablack group, while during the first five evaluations (10-Nov-20, 17-Nov-20, 24-Nov-20, 8-Dec-20, and 21-Dec-20), the levels of *B. bigemina* DNA were significantly higher in this group (Fig. 1).

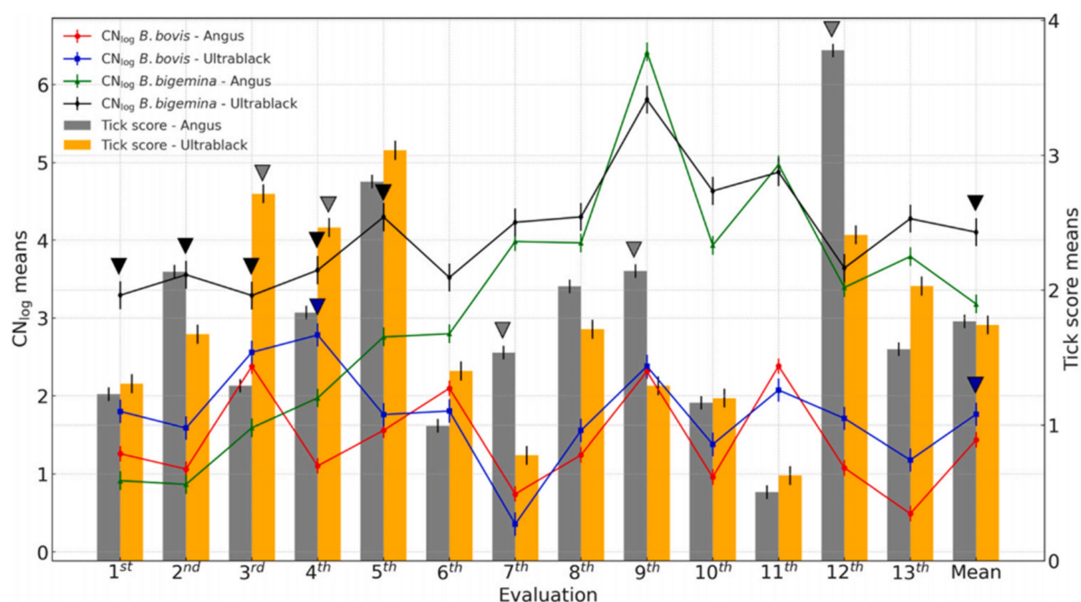


Fig. 1. Means ($\pm$ error standard) of DNA copy number (CNlog) of *Babesia bovis* (blue and red lines) and *Babesia bigemina* (black and green lines), as well as the tick score (gray and orange bars) in Angus and Ultrablack calves for 13 evaluations (1st to 13th: 10-Nov-21, 17-Nov-21, 24-Nov-21, 8-Dez-21, 21-Dez-21, 5-Jan-22, 19-Jan-22, 31-Jan-22, 15-Feb-22, 2-Mar-22, 16-Mar-22, 30-Mar-22, 19-Abr-22) and general means. Triangles indicate significant differences ($p \leq 0.05$): The black triangle represents the CN of *B. bigemina* between Angus and Ultrablack; the blue triangle represents the CN of *B. bovis* between Angus and Ultrablack; and the orange triangle represents the tick score between Angus and Ultrablack.

There were no significant differences ($p > 0.05$) in the general mean of specific IgG antibody titers between the two genetic groups for both *Babesia spp.* However, the interaction EV x GG was significant ($p < 0.01$). At the 2nd and 3rd samplings for anti-*B. bovis* titer levels, and from the 2nd to the 6th samplings for anti-*B. bigemina*, the Ultrablack calves exhibited significantly higher levels than the Angus calves (**Fig. 2**). At no point in the evaluations did the Angus calves exhibit anti-*Babesia spp.* titers higher than those observed in Ultrablack calves.

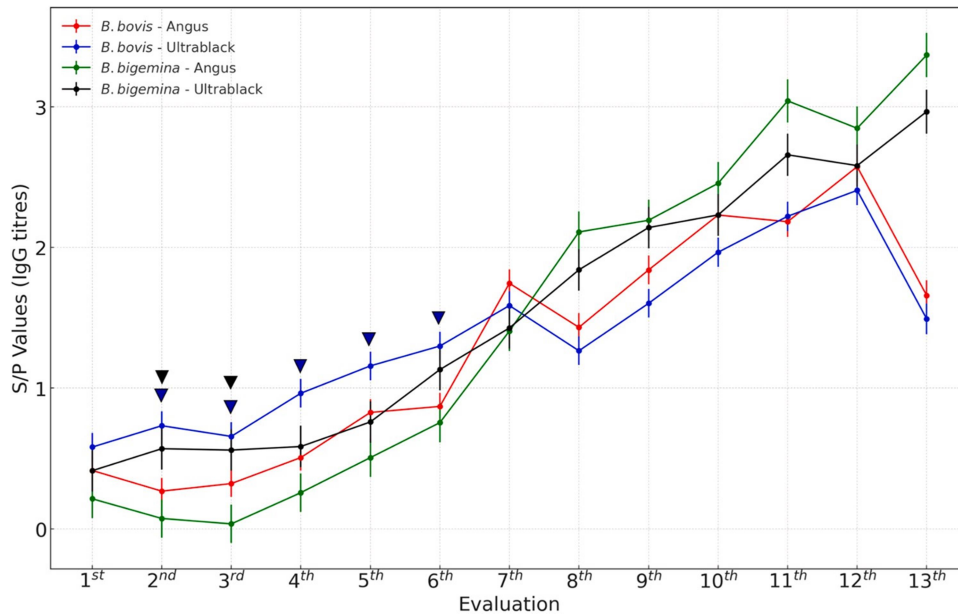


Fig. 2. Means ($\pm$ SE) of specific IgG titers (S/P), anti-*Babesia bovis* (red and blue lines) and anti-*Babesia bigemina* (black and green lines) in Angus and Ultrablack calves for 13 evaluations (1st to 13th: 10-Nov-21, 17-Nov-21, 24-Nov-21, 8-Dez-21, 21-Dez-21, 5-Jan-22, 19-Jan-22, 31-Jan-22, 15-Fev-22, 2-Mar-22, 16-Mar-22, 30-Mar-22, 19-Apr-22). Triangles indicate significant differences ($p \leq 0.05$): The black triangle represents the S/P of *B. bigemina* between Angus and Ultrablack; the blue triangle represents the S/P of *B. bovis* between Angus and Ultrablack.

The positive frequencies for the CNlog and S/P values for *B. bovis* and *B. bigemina* did not differ among the genetic groups ($p > 0.05$), although there was a significant ($p < 0.05$) effect of EV for both species. For the CNlog data, the positive frequencies of *B. bigemina* started lower in the initial evaluations and increased over time, while the positive frequencies of *B. bovis* also showed the lowest frequency in the initial evaluations, with variable increases and decreases throughout the evaluations. The frequencies of *B. bovis* and *B. bigemina* positive values were initially high, above 80%, in the first evaluations but declined from evaluation 11 onwards (**Fig. 3**).

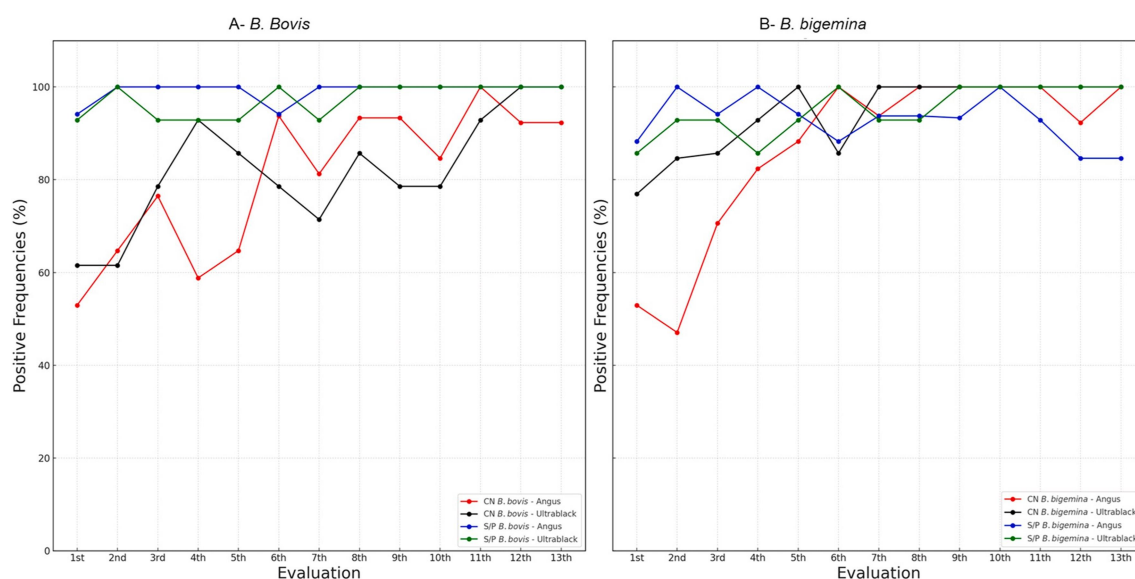


Fig. 3. Distribution of positive frequencies of qPCR (CN – DNA copy number) and ELISA (S/P- sample/positive) values for *Babesia bovis* (A) and *Babesia bigemina* (B) in Angus and Ultrablack calves for 13 evaluations (1st to 13th: 10-Nov-21, 17-Nov-21, 24-Nov-21, 8-Dez-21, 21-Dez-21, 5-Jan-22, 19-Jan-22, 31-Jan-22, 15-Fev-22, 2-Mar-22, 16-Mar-22, 30-Mar-22, 19-Abr-22).

The estimated repeatabilities for the CNlog and S/P values of *B. bovis* and *B. bigemina* were 0.21 and 0.31, and 0.71 and 0.82, respectively (Table 1). The correlation between the CNlog and S/P values of *B. bovis* and *B. bigemina* was low, 0.05 and 0.14, respectively, as were other associations (Table 1).

Table 1. Estimated repeatabilities and correlations of the CN and S/P values for *B. bigemina*, *B. bovis*. Repeatabilities are in diagonals (in bold), and correlations are above the diagonals.

Species	Copy number (CN)		Antibody titers (S/P)	
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. Bigemina</i>
CN <i>B. bovis</i>	0.21			
<i>B. bigemina</i>	0.06	0.31		
S/P <i>B. bovis</i>	0.02	0.03	0.71	
<i>B. bigemina</i>	0.05	0.00	0.11	0.82
Tick Score	-0.09	0.08	0.03	0.00

4. Discussion

Babesiosis monitoring by quantitative PCR may be utilized to characterize phenotypic or genetic resistance in cattle and can be implemented in a selection system. The present study compared babesiosis DNA loads in

calves from two genetic groups: Angus (100% Taurine) and Ultrablack (~18% Zebuine, according to the breeder's records). Our results showed that Ultrablack calves had higher DNA loads of both *B. bovis* and *B. bigemina* than Angus calves. During the experimental period, all animals presented tick infestations with a score ≥ 1 (≥ 20 tick counts), which allowed the frequent inoculation of tick fever agents. Moreover, throughout the study, all animals shared the same paddocks, ensuring uniformity in tick infestations and, consequently, in babesiosis inoculations. Here, the 31 calves were monitored through 13 consecutive evaluations, with repeated measures over time (mean interval of 12 days). According to Vickers (2003), several studies estimate a continuous endpoint repeatedly over time since researchers aim to observe the time course of a clinical sign or evaluate how the effect of a treatment evolves over time.

As expected, significant effects of evaluation on tick scores and levels of babesiosis infection were identified. It is well-established that climatic conditions influence the development of free-living tick stages in pastures, indirectly affecting the transmission dynamics of babesiosis, as reported by Jongejan and Uilenberg (2004). The study area's tropical climate, with hot and humid summers and moderately cool and dry winters, supports the tick life cycle in pastures throughout the year, including the drier months. This area has been studied three times and is recognized as endemic for babesiosis (Bilhassi et al., 2014, Giglioti et al., 2016, Frabetti et al., 2023). The prevalence of hemoparasites in cattle is largely determined by the dynamics of the tick population, which thrives under favorable climatic conditions (Mahoney and Ross, 1972) have noted. Areas with constant tick occurrences are defined as regions of endemic stability, a term initially coined by Mahoney (1962) and further detailed by Mahoney and Ross (1972). In such environments, cattle are constantly exposed to these pathogens, leading to the development of enhanced immunity and the emergence of healthy, asymptomatic carriers (Bock et al., 2004).

This study was the first to compare *Babesia spp.* infection levels between Angus and Ultrablack animals. We initially hypothesized that even a small proportion of Zebu genetics added to Taurine animals could enhance resistance against babesiosis. Contrary to our expectations, for both *Babesia spp.* the

general mean of the 13 evaluations showed higher infection rates in Ultrablack calves. However, for *B. bovis*, only one evaluation revealed a higher infection rate in Ultrablack, indicating that both Angus and Ultrablack breeds exhibited similar resistance levels to *B. bovis* infections. The interaction effect between genetic group and evaluation was more pronounced for *B. bigemina*, where, in the first five evaluations, Ultrablack calves exhibited higher infection rates than the Angus breed. The Angus breed's higher resistance to *B. bigemina* infection may be attributed to the calves' younger age during the initial evaluations. According to Zintl et al. (2005), though both young and adult cattle are susceptible to *Babesia spp.* infections upon first exposure, younger animals display stronger innate resistance, also known as inverse age resistance, wherein clinical signs are milder if the first infection occurs at a very young age; after recovery, low levels of parasitemia persist for extended periods without causing apparent harm to the animals (Zintl et al., 2005). This phenomenon was not observed in Ultrablack calves, despite their younger age during the initial evaluations.

Studies have revealed divergences in bovine resistance to hemoparasite infections among Taurine, Zebu, and their crossbreeds using the qPCR method. Bilhassi et al. (2014), evaluating calves and cows from the Angus, Nellore, and Angus x Nellore genetic groups, found that only the Angus breed exhibited higher *B. bovis* infection levels in both calves and cows. In this study, the crossbred (Angus x Nellore) animals did not differ from the Nellore breed in either calves or cows. Maiorano et al. (2018) assessed resistance to *B. bovis* infection in beef heifers from *Bos taurus taurus* (Caracu, n = 20) and *Bos taurus indicus* (Nelore, n = 20) and found no differences in resistance between the two groups. Martins et al. (2020) examined *Anaplasma marginale* infection levels between Brangus and Nelore calves aged 8–10 months and found that infections in Brangus cattle had six times more DNA copies than in Nellore cattle.

Significant differences were observed in some evaluations regarding the specific antibody titers for both *Babesia spp.* For *B. bigemina*, at the 4th and 5th evaluations, the parasite DNA loads and antibody levels were significantly higher in the Ultrablack breed. Although antibody titers against *B. bovis* and *B. bigemina* in calves were lower in the initial evaluations, the positive frequencies

in the first evaluation were already high (> 80%). Moreover, during the evaluations, no clinical cases of *Babesia spp.* infections were observed. According to Perez et al. (1996), the absence of clinical cases can be explained by a high number of seropositive animals; under these conditions, it is expected that most animals will become seropositive over time, and clinical cases will be rare. In the current study, as the animals were frequently exposed to *R. microplus*, high inoculation for babesiosis was anticipated based on the high antibody titers in the initial evaluations.

The correlation analysis between babesiosis infection levels determined by qPCR and antibody levels quantified by ELISA revealed no association between these two measures. The low correlations (or absence thereof) across the 13 evaluations demonstrated that the variation in CNlog value was independent of the level of antibodies; in other words, higher levels of antibodies do not necessarily indicate a better ability to maintain low levels of infection (Giglioti et al., 2017). As the repeatability coefficients estimated for the S/P values for both *Babesia spp.* were high, it is suggested that even an animal positive at one evaluation and negative at another by qPCR can present high IgG anti-*Babesia spp.* levels at both evaluations, as antibody levels can remain high between or during the evaluations. Although Ultrablack calves may have exhibited an earlier immunological response compared to Angus calves, we cannot infer that they demonstrated greater resistance to babesiosis infections. Despite having higher anti-babesia titers, Ultrablack calves displayed a phenotype more susceptible to babesiosis, as verified by DNA copy levels. Thus, based on our study, the ELISA assay could not discriminate between resistance/susceptibility to *B. bovis* and *B. bigemina*, as previously predicted by Giglioti et al. (2017).

The low estimated correlation between the babesiosis infection levels measured by qPCR and tick infestation, determined by the tick score, demonstrates that, as in other previous studies, in regions endemic to tick occurrence, the level of babesiosis infection is independent of the tick infestation level (Giglioti et al., 2016, 2018; Maiorano et al., 2018). The estimated repeatability for *B. bovis* CNlog was low (0.21), whereas for *B. bigemina*, it was moderate (0.31). The lower repeatability estimated for *B. bovis* CNlog may explain this species' greater fluctuation during evaluations

compared to *B. bigemina*. According to Giglioti et al. (2018), lower repeatabilities indicate that variations in parasitic loads depend more on factors specific to each evaluation rather than on the animal's intrinsic factors. Consequently, the permanent environmental effect may have exerted a greater influence on the fluctuation of *B. bovis* levels than on *B. bigemina* levels. Our findings contrast with those by Giglioti et al. (2018), who reported repeatability estimates for *B. bovis* and *B. bigemina* infections in Canchim calves from the weaning phase between 0.17–0.35 and 0.04–0.32, respectively. These authors suggested that it is possible to identify animals with the most resistant phenotype to both hemoparasites. However, the age of the animal may be a crucial factor in resistance against these parasites.

High values were observed for the estimated repeatabilities of the titers of IgG against anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* (0.74 and 0.85, respectively). However, these high values merely indicate that the higher levels of antibodies against *B. bovis* and *B. bigemina* in one evaluation remained high in subsequent evaluations. Therefore, the absence of a correlation between the CNlog and S/P values indicates that high anti-*B. bovis* titers and anti-*B. bigemina* do not determine the decrease or increase in infection by these hemoparasites.

Ultrablack (or Ultrared) is a synthetic breed created by crossing existing breeds, such as Brangus and Angus. This results in a 50% reduction in the Zebu genetic composition derived from the Brangus breed. Compared to terminal crosses, the disadvantages of synthetic breeds include a lower degree of heterozygosity and the loss of epistatic superiority in the gametes produced by the crossed parents (Alencar, 1997). Therefore, due to Mendelian segregation of gametes and crossing-over processes, the estimated proportion of Zebu genetics derived from mating between Ultrablack animals may differ from the actual proportion (~18%). Further studies should try and establish a threshold value for sufficient Zebu genotype to ensure a reliable degree of babesiosis resistance. Such studies would need to increase the animal sampling size to assess the possible genetic and environmental effects on the herd and apply genomic and functional genetic analyses to identify genes related to resistance to babesiosis.

5. Conclusions

Levels of *B. bigemina* infection were significantly higher in Ultrablack calves compared to Angus calves, especially in the initial evaluations. Although *B. bovis* infection was also significantly higher in Ultrablack animals, the differences between the two genetic groups across various measurements were not pronounced. The IgG antibody titers against *B. bovis* and *B. bigemina* were not correlated with the infection levels determined by the number of DNA copies of each *Babesia spp.* Our results suggest that under the conditions of this study, the low proportion of Zebu genetics in Ultrablack calves was insufficient to enhance resistance against infection and reduce the parasite load.

6. References

- Alencar, M.M., 1997. Utilização de cruzamentos para a produção de carne bovina. EMBRAPA-CPPSE. Documentos 25, 63–79.
- Barros, S.L., Madruga, C.R., Araújo, F.R., Menk, C.F., Almeida, M.A., Melo, E.P.S., Kessler, R.H., 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of Bahia, Brazil, by enzyme linked immunosorbent assays. Mem. Inst. Osw. Cruz. v.100 (n.6), 613–617.
- Bilhassi, T.B., Oliveira, H.N., Ibelli, A.M.G., Giglioti, R., Regitano, L.C.A., Oliveira Sequeira, T.C.G., Bressani, F.A., Malago, W., Resende, F.D., Oliveira, M.C.S., 2014. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. Ticks Tick. Borne Dis. 5, 234–238.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A.J., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. Parasitol 129, 247–269.
- Frabetti, A.F., Katiki, L.M., Caetano, L., Sarti, M.B., Falasca, T.M., Polli, H., Verissimo, C. J., Vercesi Filho, A.E., Oliveira, H.N., Oliveira, M.C.S., Giglioti, R., 2023. Natural levels of *Rhipicephalus microplus* infestation and *Anaplasma marginale* infection in Angus and Ultrablack calves. Exp. Appl. Acarol. 89, 131–140.
- Fraga, A.B., Alencar, M.M., Figueiredo, L.A., Razook, A.G., Cyrillo, J.N.S.G., 2003. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). R. Bras. Zootec. 32, 1578–1586.

- Giglioti, R., Oliveira, H.N., Santana, C.H., Ibelli, A.M.G., Neo, T.A., Bilhassi, T.B., Rabelo, M.D., Machado, R.Z., Brito, L.G., Oliveira, M.C.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 Tick-Borne Dis, 7, 657–662.
- Giglioti, R., Oliveira, H.N., Ibelli, A.M.G., Bilhassi, T.B., Néo, T.A., Santana, C.H., Rabelo, M.D., Machado, R.Z., Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., 2017. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. Ticks Tick-borne Dis. 8 (3), 335–340.
- Giglioti, R., Oliveira, H.N., Bilhassi, T.B., Portilho, A.I., Okino, C.H., Marcondes, C.R., Oliveira, M.C.S., 2018. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. Vet. Parasitol. 250, 78–84.
- Giglioti, R., Oliveira, H.N.O., Gutmanis, G., Luciani, G.F., Azevedo, B.T., Fiorin, C.F.C., Andrade, M.F., Silva, M.A.F., Vercesi Filho, A.E., Katiki, L.M., Okino, C.H., Oliveira, M.C.S., Veríssimo, C.J., 2020. Correlations and repeatability between *Babesia spp.* infection levels using two dairy cattle breeding system. Exp. Appl. Acarol. 81, 599–607.
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., Cooke, B.M., 2013. Bovine babesiosis in the 21 st century: advances in biology and functional genomics. Int. J. Parasitol. 43, 125–312.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., Leon, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23, 150–156.
- Guglielmone, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet. Parasitol. 57, 109–119.
- Hüe, T., Graille, M., Mortelecque, A., Desoutter, D., Delathiere, J., Marchal, C., Teurlai, M., Barre, N., 2013. Diagnostic methods used to monitor an outbreak of babesiosis (*Babesia bovis*) in a herd of feral cattle in New Caledonia. Aust. Vet. J. 91, 254–258.
- Ibrahim, H.M., Adjou Moumouni, P.F., Mohammed-Geba, K., Sheir, S.K., Hashem, I.S.Y., Cao, S., Terkawi, M.A., Kamyngkird, K., Nishikawa, Y., Suzuki, H., Xuan, X., 2013. Molecular and serological prevalence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle and water buffalos under small-scale dairy farming in Beheira and Faiyum Provinces. Egypt. Vet. Parasitol. 198, 187–192.
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U., Schuster, R.K., 2010. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. Parasitol. Res. 106, 709–713.

- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitol* 129, 3–14.
- Machado, R.Z., Toledo, C.Z.P., Teixeira, M.C.A., André, M.R., Freschi, C.R., Sampaio, P., H., 2012. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Vet. Parasitol.* 186, 461–465.
- Mahoney, D.F., 1962. Bovine babesiosis. Diagnosis of infection by a complement fixation test. *Aust. Vet. J.* 38, 48–52.
- Mahoney, D.F., Ross, D.R., 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48, 292–298.
- Maiorano, A.M., Giglioti, R., Oliveira, M.C.S., Oliveira, H.O., Cyrillo, J.N.S.G., Mercadante, M.E.Z., Silva, A.I.I.V., 2018. Resistance to the tick *Rhipicephalus microplus* and *Babesia bovis* infection levels in beef heifers raised in an endemic area of Sao Paulo state, Brazil. *Anim. Prod. Sci.* 59 (5), 938–944.
- Martins, K.R., Garcia, M.V., Bonatte-Junior, P., Duarte, P.O., Higa, L.O.S., Csordas, B.G., Barros, J.C., Andreotti, R., 2020. Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 81, 585–598.
- Okino, C.H., Giglioti, R., Silva, P.C., Oliveira, H.N., Oliveira, M.C.S., 2018. Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. *Mol. Biol. Rep.* 45, 2671–2680.
- Okino, C.H., Bassetto, C.C., Giglioti, R., Silva, P.C., Tonelli, M.F., Marcondes, C.R., Oliveira, H.N., Oliveira, M.C.S., 2020. A polymorphic CD4 epitope related to increased susceptibility to *Babesia bovis* in Canchim calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 230, 110132.
- Oliveira-Sequeira, T.C.G., Oliveira, M.C.S., Araujo Jr, J.P., Amarante, A.F.T., 2005. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J. Parasitol.* 35, 105–111.
- Peacock, F.M., Koger, M., Olson, T.A., Crockett, J.R., 1981. Additive genetic and heterosis effects in crosses among cattle breeds of British, European and Zebu origin. *J. Anim. Sci.* 52, 1007–1013.
- Perez, E., Jaen, ´ M., Herrero, M.V., 1996. Effect of management and inherent factors on birth seropositivity and seroconversion to *Babesia bovis* in calves in Costa Rica. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791, 100–109.
- Ramos, C.A.N., Araújo, F.R., Souza, I.I.F., Bacanelli, G., Luiz, H.L., Russi, L.S., Oliveira, R. H.M., Soares, C.O., Rosinha, G.M.S., Alves, L.C., 2011. Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 176, 79–83.

- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L.S., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A., Mijares, A., 2013. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. *Vet. Parasitol.* 196, 37–43.
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. *Babesia*: a world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12 (8), 1788–1809.
- Seifert, G.W., 1971. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust. J. Agric. Res.* 22, 159–168.
- Shebish, E., Vemulapalli, R., Oseto, C., 2012. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Vet. Parasitol.* 188, 164–167.
- Terkawi, M.A., Huyen, N.X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y.K., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X., Igarashi, I., 2011. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.* 178 (3-4), 201–207.
- Vickers, A.J., 2003. How many repeated measures in repeated measures designs? Statistical issues for comparative trials. *BMC Med. Res. Methodol.* 3, 22.
- Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E., Mulcahy, G., 2005. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol* 27 (4), 115–120.

CAPÍTULO 3 - ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE BOVINOS ANGUS E MESTIÇOS EM RESPOSTA À INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia bovis*

Bianca Tainá Azevedo Barreto¹, Henrique Nunes de Oliveira¹, Mayne Barboza Sarti¹, Luciana Morita Katiki², Anibal Eugênio Vercesi Filho², Ana Gonçalves Domingos³, Sandra Antunes³, Mariana Marchi Santoni⁴, Adriana Mércia Guaratini Ibelli⁵, Rodrigo Giglioti^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

²Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, São Paulo, Brasil

³Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, – Unesp/FCF, Araraquara, São Paulo, Brasil

⁵Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brasil

RESUMO

Babesia bovis é um parasita do filo *Apicomplexa* considerado um dos principais agentes da tristeza parasitária bovina (TPB), que causa a babesiose bovina. A identificação de animais de raças puras ou cruzadas com maior capacidade produtiva e resistência à babesiose é considerada um grande desafio. Este estudo objetivou monitorar bezerros naturalmente infectados por *B. bovis* para correlacionar a dinâmica da infecção com o perfil transcriptômico dos animais. Foram utilizados dez bezerros (cinco Angus (100% taurino) e cinco mestiços (~82% Angus e 18% Zebu)). Em dois momentos distintos, amostras de animais sem infecção por *B. bovis* (número de cópias de DNAlog (NC) = 0) e com infecção (NC ≥ 2) foram analisadas por RNAseq. Amostras de sangue foram coletadas de cada animal em tubos contendo EDTA e submetidas às extrações de DNA e RNA. As amostras de DNA foram utilizadas para quantificar o número de cópias de DNA de *B. bovis* por PCR quantitativo, permitindo a identificação de animais infectados e não infectados. As amostras de RNA (n = 20, sendo 10 sem infecção e 10 pós-infecção) foram submetidas à análise por RNAseq. Devido à diferença de idade entre os grupos, os dois grupos genéticos foram analisados separadamente. Foram identificados apenas para o grupo genético mestiço, 40 genes diferencialmente expressos (DE) pela análise de RNAseq (FDR ≤ 0,05, *fold change* log ≤ 2,0 e ≥ 2,0), dos quais 24 estavam super expressos e 16 menos expressos após a infecção. Após análises de anotação gênica, diversas vias biológicas identificadas, entre elas: interação de proteínas virais com citocinas e seus receptores e interação citocina-receptor de citocina (reguladas negativamente); e vias de sinalização de IL-17 e quimiocinas (reguladas positivamente). Os resultados fornecem uma visão exploratória dos mecanismos transcricionais associados à resposta à babesiose bovina em animais mestiços Angus × Zebu. A identificação de vias imunológicas, especialmente IL-17 e sinalização de quimiocina, destaca alvos potenciais para estudos futuros sobre resistência à *B. bovis* e pode contribuir para estudos futuros voltados à investigação de eventos específicos na relação hospedeiro-parasita.

Palavras-chave: RNA-seq; bezerros; sangue total; interação hospedeiro-parasita; expressão de genes.

1. Introdução

A babesiose bovina é causada por parasitas Apicomplexa, do gênero *Babesia*, e figura entre as enfermidades parasitárias de maior impacto na pecuária mundial. Entre as duas espécies causadoras da babesiose bovina, *Babesia bovis* está associada aos sinais clínicos mais graves da doença e causadora dos maiores prejuízos econômicos (Cuy-Chaparro et al., 2023). No Brasil, a babesiose bovina é transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, causando grandes prejuízos a pecuária nacional e ainda representam um obstáculo à expansão do uso de raças taurinas devido à sua maior sensibilidade a carrapatos e hemoparasitas em comparação às raças zebuínas (Giglioti et al., 2018). Estimativas de Grisi et al. (2014) indicam que os prejuízos diretos e indiretos, incluindo os decorrentes de babesiose, provocados pelas infestações por *R. microplus* chegam a 3,24 bilhões de dólares.

Raças zebuínas são amplamente utilizadas em regiões tropicais devido à maior resistência que apresentam a carrapatos e às doenças transmitidas por esses ectoparasitas. Há evidências de que bovinos *Bos taurus indicus* são relativamente mais resistentes às infecções por *B. bovis* e *B. bigemina* (Johnston & Sinclair, 1980; Bock et al., 1997; 1999; Jonsson et al., 2008). Em desafios experimentais, animais Hereford e Droughtmaster, ambas raças taurinas exibiram respostas clínicas semelhantes, enquanto zebuínos Brahman apresentaram resistência significativamente superior (Johnston & Sinclair, 1980). Corroborando esses achados, Bock et al. (1997) demonstraram que zebuínos puros toleram melhor a infecção por *B. bovis* e alertaram para o risco elevado de mortalidade caso rebanhos cruzados sejam expostos a cepas virulentas. Em estudo subsequente, o mesmo grupo confirmou o alto grau de resistência dos *B. indicus* puros, ao passo que mestiços *Bos indicus* × *Bos taurus* permaneceram suscetíveis (Bock et al., 1999). O cruzamento entre raças taurinas e zebuínas, adotado para elevar a produtividade, tem atraído o interesse de produtores brasileiros que buscam maior eficiência em seus

rebanhos (Ibelli et al., 2012). No entanto, perdas causadas por infecções por hemoparasitas e infestações por carrapatos limitam o aumento da produtividade por meio da introdução de raças taurinas e seus cruzamentos em sistemas de criação de gado de corte (Oliveira et al., 2014). Estudos já demonstraram a viabilidade tanto da seleção fenotípica para resistência a carrapatos (Fraga et al., 2003) quanto da seleção genômica voltada para esse mesmo objetivo (Porto-Neto et al., 2011; Cardoso et al. 2015; Mapholi et al., 2016). E mais recente, alguns estudos mostraram que é possível identificar animais que apresentam fenótipo mais resistente à infecção tanto por hemoparasitas quanto por carrapatos (Giglioti et al., 2018; Frabetti et al., 2023). Em relação a estudos genômicos Cavani et al. (2020) estimaram a correlação genética entre a infecção por *Babesia bovis* e a contagem de carrapatos e estimaram herdabilidade e correlação genética baixas para as infecções por *B. bovis*, 0,10 e 0,15, respectivamente. Além, disso, os autores encontraram 10 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mais relevantes identificados no GWAS que explicaram 5,04 % da variância genética total para a infecção por *B. bovis*.

No que se diz respeito às infecções causadas pelos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), ainda não existem estudos que identifiquem genes ou regiões cromossômicas associadas à resistência em bovinos; além disso, trabalhos recentes mostraram que o nível de infestação por carrapatos não se correlaciona diretamente com a intensidade da infecção por esses agentes (Giglioti et al., 2016; Giglioti et al., 2018), ressaltando a necessidade de pesquisas voltadas à descoberta de genes ou SNPs envolvidos na resistência a tais doenças. Diante desse cenário, evidencia-se uma lacuna no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta do hospedeiro à infecção natural por *B. bovis*. Estudos anteriores concentraram-se em desafios experimentais ou em análises genômicas de resistência, mas, até onde sabemos, este é o primeiro a caracterizar o transcriptoma de bovinos naturalmente infectados por *B. bovis* por meio de análise de sequenciamento de RNA. Assim, o objetivo deste estudo foi utilizar essa abordagem para avaliar o perfil transcricional de bezerros Angus e mestiços (Ultrablack) naturalmente infectados, visando identificar genes e vias biológicas associados a diferentes níveis de resistência.

2. Material e Métodos

2.1. Animais experimentais

A seleção dos animais utilizados na análise de RNAseq compreendeu parte daqueles envolvidos no estudo conduzido por Azevedo et al. (2024). Desse estudo, foram selecionados dez bezerros de dois grupos genéticos (cinco fêmeas Angus (100% taurinas) e cinco mestiços (~82% Angus e 18% Zebu). As amostras animais foram selecionadas da seguinte forma: nas avaliações iniciais, os bezerros que apresentaram nível de infecção por *B. bovis* (número de cópias de DNALog – NClog) igual a zero foram selecionados como grupo não infectado; posteriormente, os mesmos animais que apresentaram $\text{NClog} \geq 2,0$ (1024 cópias/ μL) foram selecionados como grupo infectado. No total, foram selecionadas 20 amostras (cinco de cada grupo genético no momento pré-infecção e cinco no pós-infecção). O CNlog de *B. bovis* foi estimado conforme descrito por Azevedo et al. (2024). As idades médias dos animais selecionados no início do experimento foram de 151 ± 24 dias para os Angus e 49 ± 20 dias para os mestiços. Estudos prévios sugeriram que a região avaliada é considerada endêmica para babesiose, anaplasmoses e *Rhipicephalus microplus* (Frabetti et al., 2023; Azevedo et al., 2024). Por se tratar de um cenário de infecção natural, os animais permaneceram sob as condições usuais de manejo da propriedade, o que impôs limitações ao controle integral de fatores ambientais e sanitários. Consequentemente, não foi possível controlar a ocorrência de infecções concomitantes por hemoparasitas, como *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, nem de infestações por ectoparasitas, como *Rhipicephalus microplus* e a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*).

De cada animal, foram colhidas duas amostras de sangue em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA, sendo uma destinada à extração de DNA e a outra à extração de RNA. Este experimento foi conduzido em conformidade com os princípios éticos de experimentação animal, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Zootecnia (Protocolo nº 328–2021).

2.2. Extração de DNA e RNA

A extração de DNA a partir de amostras de sangue total foi realizada empregando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit, seguindo o protocolo para isolamento de DNA genômico a partir de 300 µL de sangue total (Promega, EUA). As amostras de DNA foram avaliadas quanto à pureza e concentração utilizando um espectrofotômetro BioDrop (BioDrop uLITE, Biochrom Ltd, Reino Unido) e, em seguida, diluídas em tampão TE (Tris-EDTA, pH 7.8) na concentração de 20ng/uL.

A extração de RNA total das amostras de sangue foi realizada utilizando o protocolo descrito por Giglioti et al. (2022), e em seguida, foi purificada com o RNeasy Protect Animal Blood Kit (Qiagen, Holanda) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza das amostras de RNA foram determinadas utilizando um espectrofotômetro BioDrop, enquanto que a integridade do RNA foi verificada com o Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) em um instrumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para determinação do RIN (RNA Integrity Number) e por análise de RNA em eletroforese em gel de 2%.

2.3. PCR quantitativa para a seleção dos grupos animais

A seleção dos animais não infectados e infectados foi realizada por meio de ensaios de PCR quantitativa (qPCR), que determinaram a infecção por *B. bovis* com base na quantificação absoluta do número de cópias de DNA (NClog). A metodologia utilizada seguiu o protocolo descrito por Okino et al. (2018), empregando primers e sondas que flanqueiam um fragmento de 98 nucleotídeos localizado no gene mitocondrial que codifica o citocromo b de *B. bovis*. Os ensaios foram conduzidos no sistema CFX Real-Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, EUA), em um volume de reação de 10 µL, contendo: 2 µL de 5x HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), 0,5 µL de cada primer (10 µM), 0,5 µL da sonda (2,5 µM), 4,0 µL de água livre de nucleases e 2,0 µL da amostra de DNA (20 ng/µL). A condição térmica consistiu em uma etapa inicial de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anexação/extensão a

60 °C por 1 minuto. As amostras foram analisadas em duplicata, com inclusão de controles positivos e negativos. A curva de calibração para quantificação do DNA de *B. bovis* foi elaborada utilizando DNA sintético, por meio de fragmentos gênicos gBlocks® (IDT, IA, EUA).

2.4. Preparação da Biblioteca de RNA e Sequenciamento por RNA-Seq

Após passarem pelo controle de qualidade, as amostras de RNAs foram submetidas para a construção de bibliotecas usando o kit Illumina TruSeq Stranded mRNA (Illumina, San Diego, EUA). Após a validação das bibliotecas usando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) e Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), as bibliotecas foram sequenciadas na plataforma NextSeq2000, utilizando um fluxo P3 com 200 ciclos, produzindo leituras pareadas de 101 pb e gerando aproximadamente 50 milhões de leituras para cada amostra sequenciada.

2.5. Controle de Qualidade e Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

O pipeline de análise dos dados brutos de RNA-Seq alinhados ao genoma de referência seguiu os seguintes passos: remoção de sequências e nucleotídeos de baixa qualidade, alinhamento com o genoma de referência, mapeamento e contagem das leituras, normalização da contagem e identificação de genes diferencialmente expressos. Os dados de RNA-Seq foram analisados utilizando a plataforma pública Galaxy (usegalaxy.org), que contém todas as ferramentas necessárias para o processamento de dados brutos de RNA-Seq, conforme descrito a seguir.

A qualidade dos dados (FASTQ) de cada amostra sequenciada (*paired-end*) foi avaliada com o software FastQC, tanto antes quanto após o processo de filtragem dos dados. Para o controle de qualidade, a ferramenta *Trimmomatic* foi utilizada para remover leituras de baixa qualidade (qualidade média exigida < 20), bem como sequências de adaptadores. As sequências filtradas foram então alinhadas ao genoma de referência bovino (*Bos taurus*, montagem do genoma: ARS-UCD1.2 (GCA_002263795.2), disponível no

Ensembl 96) utilizando a ferramenta STAR (Versão Galaxy 2.7.8a+galaxy1). As leituras mapeadas foram quantificadas com o Htseq-count (Versão Galaxy 0.9.1+galaxy1), que utiliza arquivos no formato BAM gerados pelo STAR e o arquivo de anotação do genoma de referência no formato GTF.

Devido à diferença de idade entre os dois grupos genéticos, cada grupo foi analisado separadamente. Os genes diferencialmente expressos (DE) foram identificados utilizando a ferramenta limma (Versão Galaxy 3.50.1+galaxy0), aplicando o método de expressão diferencial limma-voom. As análises de contrastes foram realizadas separadamente para cada grupo genético: pré-infecção vs. pós-infecção. Para cada contraste, os genes foram considerados diferencialmente expressos quando um valor de p ajustado para a taxa de descoberta falsa (FDR) $\leq 0,05$, conforme o método de Benjamini-Hochberg, e um log da razão de mudança de expressão (logFC) $\geq 2,0$ (baixa regulação na pós-infecção) ou $\leq -2,0$ (super expresso na pós-infecção).

2.6. Análises Funcionais e de Enriquecimento de Genes

Os genes DEs foram submetidos a análises funcionais e de enriquecimento com o objetivo de elucidar os processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares associados às alterações transcriptômicas decorrentes da infecção por *Babesia bovis*. Para isso, foram utilizadas as ferramentas DAVID Bioinformatics Resources 6.8, ShinyGO (v0.76.3) e STRING (v11.5), considerando como referência o genoma de *Bos taurus* (Ensembl 96, ARS-UCD1.2).

A análise de enriquecimento de termos da ontologia gênica (GO) foi conduzida separadamente para genes super-regulados e baixo-regulados. A plataforma DAVID foi utilizada para a anotação funcional e identificação de termos enriquecidos nas três categorias principais da ontologia gênica: processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC). Para todos os conjuntos de genes DEs, foram considerados significativos os termos com $p < 0,05$ após correção por FDR (Benjamini-Hochberg). A ferramenta ShinyGO foi empregada para visualização gráfica dos principais termos GO enriquecidos, bem como para identificação de vias metabólicas associadas por meio da base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes

and Genomes). Além disso, a análise de rede gênica foi realizada com a plataforma STRING, a fim de identificar interações gênicas entre os genes diferencialmente expressos, com base em dados experimentais, co-expressão e predições computacionais.

3. Resultados

3.1. Infecções naturais por *B. bovis*

Para os bezerros Angus, as médias ($\pm$ desvio-padrão) dos níveis de infecções naturais foram de $39,0 \pm 19,0$ dias até a infecção por *B. bovis* e de $3,30 \pm 0,57$ para o número de cópias de DNA pós-infecção ($\text{NClog} \geq 2$). Para os bezerros mestiços, os valores correspondentes foram de $33,6 \pm 16,8$ dias e $3,35 \pm 0,39$ cópias de DNA. Não foram observadas diferenças significativas entre as raças para nenhuma das duas medidas ($p \geq 0,05$; dados não mostrados).

3.2. RNA e controle de qualidade

Em relação às amostras de RNA, todas as 20 apresentaram valores de RIN entre 8,1 e 9,9, indicando RNA íntegro e adequado para as etapas de construção de bibliotecas e sequenciamento. Em média, 21,9 milhões de *reads* foram geradas para cada amostra e, após o controle de qualidade dos dados, restaram uma média de 20,3 milhões de *reads*. A porcentagem de alinhamento STAR de todas as amostras ficou entre 88,3 e 92,8%. Um total de 12778 genes foram expressos no conjunto de dados da raça Angus e 11480 para o grupo genético cruzado.

Destes, nenhum gene foi diferencialmente expresso entre os grupos analisados para o grupo genético Angus, enquanto 40 genes foram diferencialmente expressos para o grupo genético Mestiços. Um total de 24 estavam super regulados ($\text{FDR} < 0,05$ e $\log_2\text{FC} \leq -2$) e 16 baixos regulados ($\text{FDR} < 0,05$ e $\log_2\text{FC} \geq 2$) no grupo infectado comparado com o não infectado (**Figura 1**). Genes com possível relevância para a resposta à infecção por *Babesia bovis* como *FOSB* — proto-oncogene *FOSB*, subunidade do fator de transcrição AP-1, *CXCL8 (IL-8)* — ligante de quimiocina *CXC 8*, e *FOS* —

proto-oncogene *FOS*, entre os menos expressos, e *SELP* — seletina P e HBB — subunidade beta da hemoglobina (beta-globina), entre os mais expressos no grupo pós-infecção.

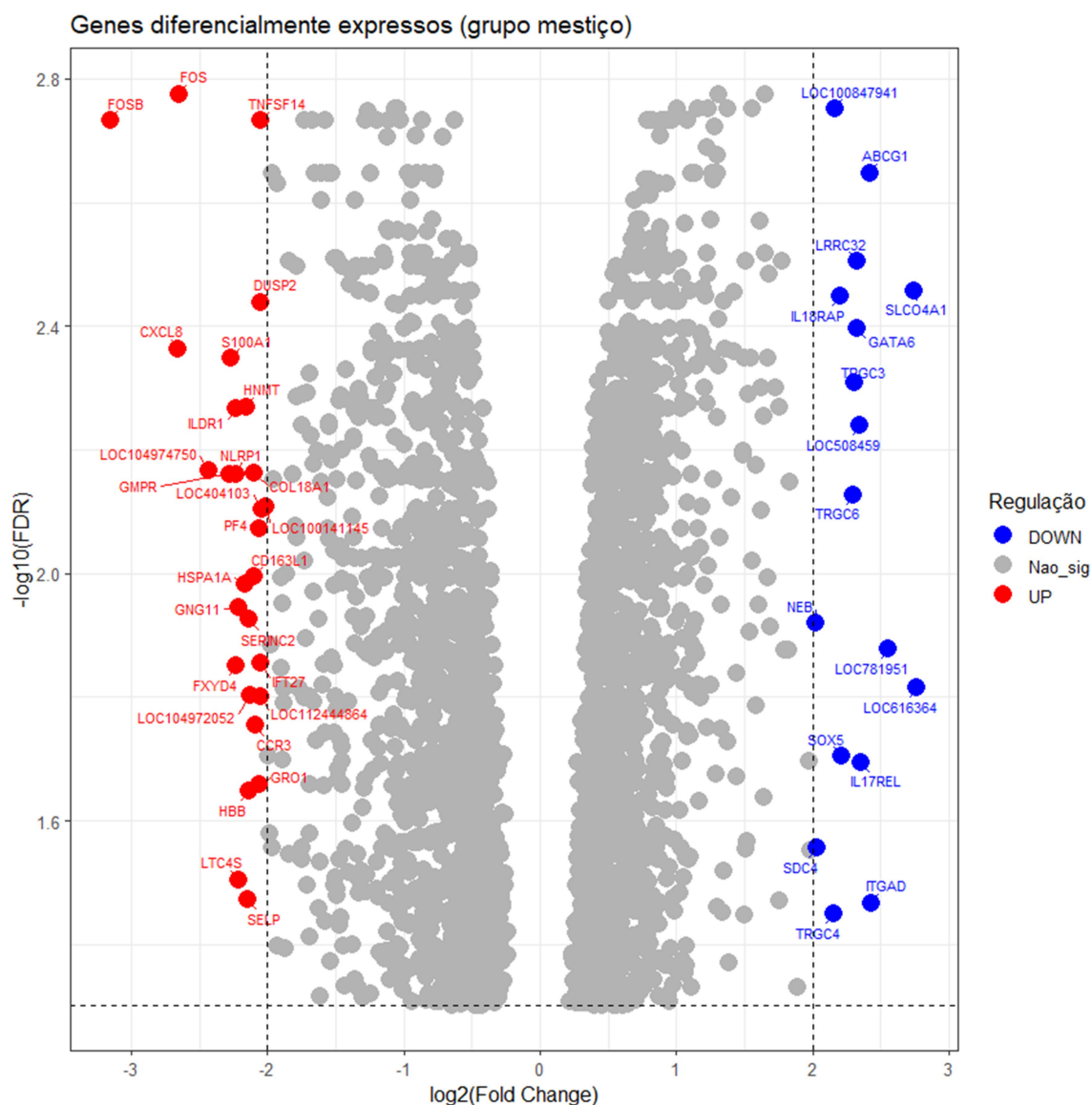


Figura 1. Gráfico Volcano da expressão gênica diferencial no grupo mestiço. Cada ponto representa um gene analisado; o eixo x mostra o log2 fold-change (log2FC) pós-infecção versus pré-infecção, e o eixo y mostra a significância estatística como $-\log_{10}(\text{FDR})$. Genes baixo-regulados ($\log_2\text{FC} \geq 2$ e $\text{FDR} \leq 0,05$) aparecem em azul; genes Up-regulados ($\log_2\text{FC} \leq -2$ e $\text{FDR} \leq 0,05$) em vermelho; demais transcritos não-significativos, em cinza.

Um total de 34 termos de Ontologia Gênica (GO) foram enriquecidos (Figura 2). Observa-se que os termos de Processo Biológico (BP) associados a

super regulação concentram-se em processos de ativação de granulócitos e neutrófilos, regulação positiva da angiogênese, migração de leucócitos e regulação positiva do desenvolvimento da vasculatura. Os principais processos biológicos (BP) enriquecidos para os genes baixo regulados envolveram a regulação negativa da proliferação e da ativação de células do sistema imune (linfócitos, leucócitos e células T), processos do sistema imune e sua regulação, a ativação e produção de TGF- β , a regulação da proliferação da população celular, o transporte de glicoproteínas, a resposta a substâncias orgânicas e a regulação positiva da diferenciação de células-tronco. Para o termo de Função molecular (MF) os processos enriquecidos associados a super regulação destacaram-se ligação ao receptor de citocina e quimiocina CXCR, atividade da quimiocina, atividade reguladora da peptidase e endopeptidase e atividade reguladora da função molecular. As principais MF enriquecidas para os genes de baixa regulação foram a atividade do transportador transmembrana lipídico acoplado à ATPase, ligação à proteína NFAT, atividade do receptor de trombospondina e atividade da fosfatidilcolina flopase (**Figura 2**).

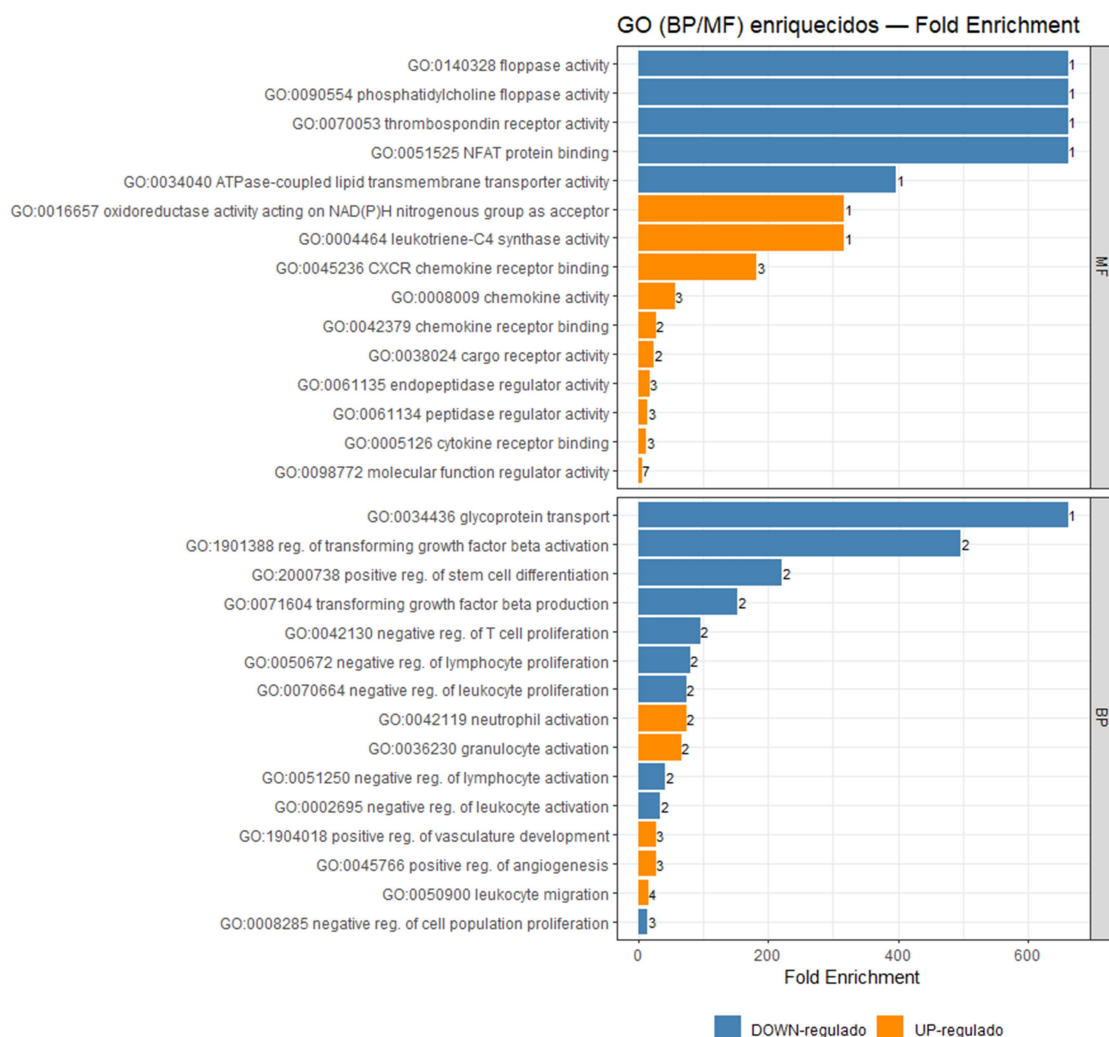


Figura 2. Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos. Termos de Processo Biológico (BP) e Função Molecular (MF) enriquecidos pelas ferramentas DAVID e ShinyGO. Barras azuis representam categorias associadas a genes baixo-regulados, enquanto barras laranja indicam genes super-regulados. O eixo x exibe o valor de enriquecimento do gene. Após as barras estão presentes o número de genes enriquecidos para cada termo.

As vias metabólicas enriquecidas pela base de dados do KEGG foram: três vias ligadas a resposta inflamatória — “*Cytokine-cytokine receptor interaction*”, “*Lipid and atherosclerosis*” e “*Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor*” (**Figura 3**), enquanto a maior parte das vias enriquecidas para os genes down-regulados envolve sinalização IL-17, cascatas de quimiocinas, interação citocina–receptor e diversos módulos de infecção viral/bacteriana (COVID-19, citomegalovírus, legionelose) ou inflamação crônica. Dessa forma, pode-se dizer que os genes super-expressos estão associados sobretudo a processos de diferenciação e

regulação negativa da proliferação imune, ao passo que a baixa-regulação se concentra em vias clássicas de resposta inflamatória e patogênica.

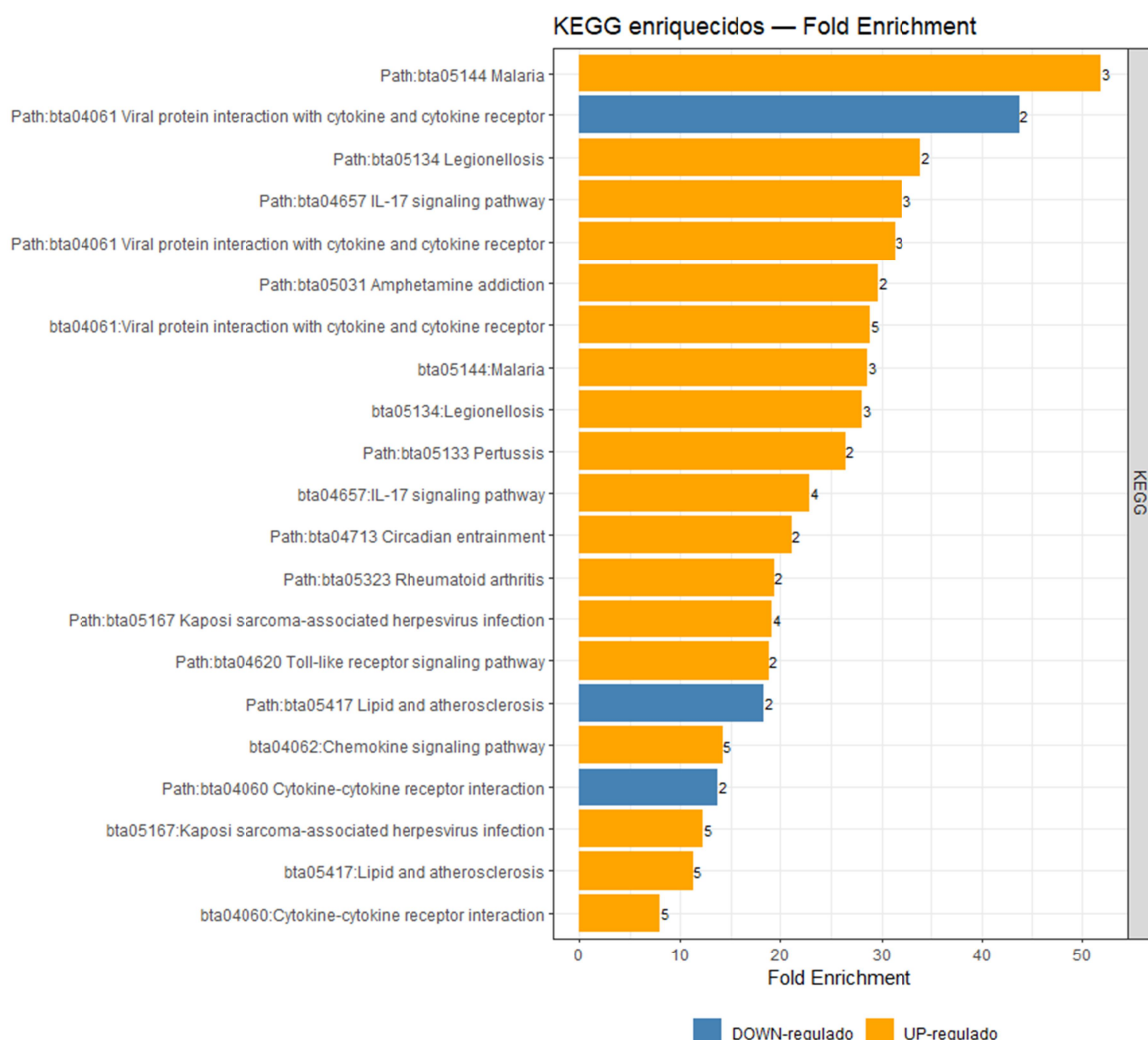
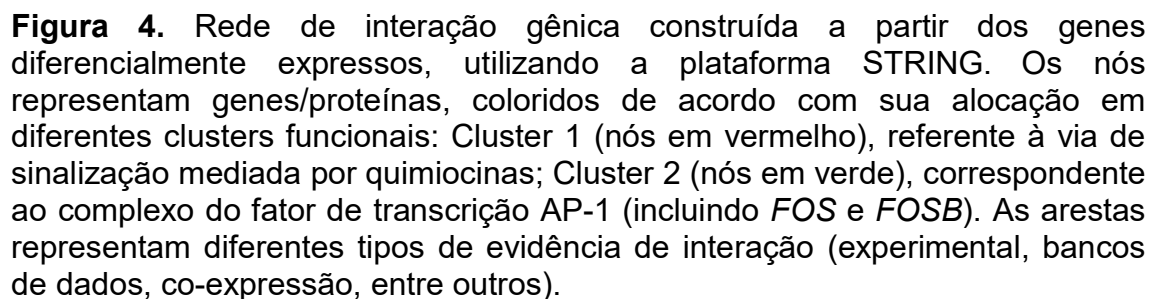


Figura 3. Vias KEGG enriquecidas entre os genes diferencialmente expressos. Caminhos metabólicos identificados como significativamente associados a genes baixo-regulados (barras laranja) e super-regulados (barras azuis) pelas ferramentas DAVID e ShinyGO. O eixo x exibe o valor de enriquecimento do gene. Após as barras estão presentes o número de genes enriquecidos para cada termo.

A análise dos genes pela ferramenta STRING revelou uma rede de interações centrada em quimiocinas, seus receptores (*CCR1*, *CCR3*, *CCR5*, *CCL3*, *CXCL8*, entre outros) e fatores de transcrição (*FOS*, *FOSB*), evidenciando papel destacado na resposta inflamatória e imunológica (**Figura**



4. Discussão

Nas avaliações genotípicas, as quantificações do número de cópias de DNA de *Babesia bovis* obtidas nos momentos pré e pós-infecção e o intervalo (dias) até a infecção não diferiram entre os grupos genéticos avaliados. Essas medidas foram suficientes para confirmar o status infeccioso e orientar a seleção das amostras para a posterior análise por RNA-seq. A análise transcriptômica revelou que a infecção natural por *Babesia bovis* resultou em resposta gênica diferencial apenas nos bezerros mestiços (~82% Angus × 18% Zebu). Neste trabalho, foi possível observar que não houve diferença na expressão gênica entre os grupos genéticos (Angus x Mestiços), enquanto 45 genes foram diferencialmente expressos dentro do grupo mestiço, quando comparados nos momentos pré e pós-infecção. Embora alguns trabalhos associem a presença de componentes zebuínos à menor parasitemia clínica em infecções por babesiose (Johnston & Sinclair, 1980; Bock et al., 1997; 1999; Jonsson et al., 2008), estudos recentes realizados em bovinos Angus e Mestiços (raça composta com pequena proporção genética de *Bos indicus*) mostraram que a fração zebuína não resultou na menor infecção por hemoparasitas, incluindo babesiose e anaplasmoses (Frabetti et al., 2023; Azevedo et al., 2024). Ainda assim, no presente estudo, os mestiços analisados apresentaram um perfil transcricional mais modulável frente ao desafio infeccioso.

A maior amplitude transcricional observada nos bezerros mestiços pode ser, em parte, atribuída à diferença etária em relação aos Angus (~50 dias versus ~150 dias, respectivamente). Fases mais precoces do desenvolvimento imunológico tendem a favorecer respostas transcriptômicas mais pronunciadas e maior plasticidade frente a estímulos infecciosos (Liang et al., 2016; Surlis et al., 2018). Bezerros jovens, por exemplo, demonstram uma forte imunidade inata contra a infecção por *B. bovis*, capaz de controlar eficientemente a infecção e prevenir quadros graves por aproximadamente seis meses após o nascimento (Goff et al., 2001). Estudos experimentais indicam que essa imunidade precoce está associada a uma indução mais rápida de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ , essenciais para o controle inicial do parasita (Goff et al., 2001). Esses dados reforçam a hipótese de que a idade do animal pode influenciar significativamente a capacidade de montar respostas imunes mais rápidas e eficazes. Adicionalmente, a natureza de infecção natural dos

animais neste estudo impôs uma limitação no controle integral de efeitos ambientais e da ocorrência de infecções concomitantes, como *B. bigemina*, *A. marginale*, e infestações por ectoparasitas como *Rhipicephalus microplus* e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*).

Genes como *FOS*, *FOSB* e *CXCL8* foram superexpressos no grupo infectado por *B. bovis*. Estes genes estão em vias associadas à quimiotaxia de neutrófilos, sinalização de IL-17 e de quimiocinas. A IL-17 é uma citocina produzida principalmente por células T CD4, que induz a granulopoiese por meio da produção do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e também quimiocinas CXC (Ye et al., 2001). Muitas dessas citocinas e quimioatraentes induzidos por IL-17 são importantes para estimular a granulopoiese e o recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação (Ghosh et al., 2017). Embora a IL-17 não tenha sido diretamente estudada em infecções por *B. bovis*, já foi demonstrado que este protozoário modula intensamente a expressão de citocinas, como IL-10, que regula respostas inflamatórias mediadas por IFN- γ e iNOS (Goff et al., 1998). Essa modulação reforça a possibilidade de que vias relacionadas à IL-17 e à quimiotaxia de neutrófilos também sejam recrutadas ou reguladas durante a infecção, contribuindo para o controle do parasita e para a dinâmica da resposta inflamatória.

A identificação das vias KEGG de "*cytokine–cytokine receptor interaction*" e "*malaria*" sugere que a resposta imune desencadeada por parasitas intracelulares, como no caso da babesiose. Isso se deve ao fato de que ambas as enfermidades são causadas por protozoários intraeritrocitários e envolvem processos inflamatórios mediados por citocinas pró e anti-inflamatórias. Em ambas as infecções, a ativação de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α é fundamental para a ativação de macrófagos e o controle inicial do parasita, enquanto citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , modulam a intensidade da resposta inflamatória para prevenir danos teciduais excessivos (Goff et al., 2001; Omer e Riley, 1998). Em bovinos, a infecção por *B. bovis* induz a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-12 e TNF- α , por macrófagos estimulados por merozoítos, resultando em inibição da replicação parasitária *in vitro* (Shoda et al., 2000). No entanto, a IL-10 pode inibir a

produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico dependente de iNOS por macrófagos, modulando negativamente a resposta tipo-1 (Goff et al., 1998).

A maior expressão dos genes *FOS* e *FOSB* (Tabela 2) após a infecção por *B. bovis* sugere um papel ativo desses genes, que, como fatores de transcrição da família AP-1, desempenham um papel positivo na diferenciação celular e na regulação da expressão gênica (Lyu et al., 2021), sendo também ativados em processos relacionados ao ciclo celular, fatores de crescimento e, em condições patológicas, contribuindo para a promoção do ciclo celular e a transformação celular (Ashrafi et al., 2020).

Os genes *CXCL8* (IL-8/NAP-1) e *CCR3* também apresentaram mais expressos no momento pos-infecção por *B. bovis*. O receptor *CXCR1* (também conhecido como *IL-8RA*, *IL-8R-I* ou *IL-8R*) interage com quimiocinas como *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6*, *CXCL7* e *CXCL8* e é expresso em granulócitos polimorfonucleares, monócitos, astrócitos, células endoteliais e mastócitos. Enquanto isso, o receptor *CCR3* (também conhecido como *CKR3*, *CC CKR3*, *EotR* ou *CMKBR3*) liga-se a *CCL5*, *CCL7*, *CCL8*, *CCL11*, *CCL13*, *CCL14*, *CCL15*, *CCL24* e *CCL26* e atua em eosinófilos, basófilos, células T (Th2 > Th1), células dendríticas, plaquetas e mastócitos. Além disso, *CXCL8* (IL-8/NAP-1), é uma quimiocina inflamatória, e induz quimiotaxia principalmente em neutrófilos, mas também em células T, basófilos e células endoteliais (Le et al., 2004; Palomino e Marti, 2015). Embora não haja, até o momento, relatos sobre o papel de *CXCL8* e *CCR3* nas infecções por *B. bovis*, evidências provenientes de outros hemoparasitas como *Anaplasma marginale* fornecem insights sobre mecanismos imunológicos análogos. Ahlawat et al. (2023) demonstraram que a infecção por *A. marginale* altera significativamente a expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, incluindo *CXCL2* e *CXCL8*, que sinalizam via *CXCR1* e também foram encontradas suprarreguladas no presente estudo. No entanto, em nossos dados, não foi observada expressão diferencial do gene *CXCR1*.

O receptor IL17REL (interleukin 17 receptor E like) apresentou menor expressão significativa no momento pós-infecção por *B. bovis*. A menor expressão desse receptor, que é um componente da sinalização da interleucina-17, pode ter implicações significativas na modulação da resposta imune do hospedeiro, potencialmente atenuando vias inflamatórias específicas.

Estudos demonstraram que a sinalização mediada por IL-17/IL-17R é crucial para a geração de uma resposta polimorfonuclear eficaz, influenciando tanto a produção quanto o recrutamento de neutrófilos (Ye et al., 2001). Kelly et al. (2005) investigaram o papel da sinalização mediada pela interleucina-17 (IL-17) /receptor de IL-17 (IL-17R) na imunidade protetora contra o *Toxoplasma gondii*, e demonstraram pela primeira vez que a indução precoce de neutrófilos durante a infecção depende da sinalização mediada por IL-17. Em um estudo recente com embriões de frango infectados com o Vírus da Doença de Newcastle (NDV), o gene IL17REL, que pode estar envolvido nessa via, foi encontrado baixo-regulado, corroborando a ideia de que a baixa regulação de componentes da via IL-17 pode ser uma estratégia patogênica para modular a resposta imune antiviral (Muthusamy et al., 2024). Essas evidências sugerem que vias envolvendo IL-17 podem ser relevantes também em outras infecções por apicomplexos, incluindo a babesiose, justificando investigações futuras nessa área.

Os resultados de enriquecimento de via revelaram que a '*IL-17 signaling pathway*' estava significativamente enriquecida entre os genes diferencialmente expressos ($FDR \leq 0,05$). Nesse contexto, observamos que os genes *FOS*, *FOSB* e *CXCL8* — todos com funções conhecidas na resposta inflamatória e recrutamento de células imunes — estavam super regulados e foram identificados como os genes que contribuíram para o enriquecimento da via IL-17. A maior expressão de *FOS* e *FOSB*, que são componentes de fatores de transcrição ativados em respostas inflamatórias (Hess et al., 2004; Angel & Karin, 1991), juntamente com o aumento de *CXCL8*, uma potente quimiocina neutrofílica (Baggiolini, 2001), sugere uma ativação robusta de mecanismos inflamatórios a jusante ou paralelos à via da IL-17.

O gene *SELP* (P-selectina) foi superexpresso no grupo pós-infecção. Na literatura científica, o papel da SELP em infecções por patógenos Apicomplexa tem sido documentado, como observado pela sua super regulação em eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, um parasita Apicomplexa, sugerindo um papel na patogênese microvascular (Wassmer et al., 2004). Em contextos bacterianos em bovinos, a super-regulação de *SELP* foi reportada em tecido mamário após infecção experimental com *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Chen et al., 2017). Contudo, a expressão de *SELP* em

resposta a infecções pode variar significativamente dependendo do tecido, do tipo de patógeno e até mesmo da idade do hospedeiro (Elder et al., 2023). Um estudo investigando a expressão gênica em leucócitos periféricos de bezerros com Doença Respiratória Bovina, por exemplo, não detectou expressão diferencial de *SELP* entre animais doentes e saudáveis, mas observou que as variações na expressão de *SELP* foram influenciadas pela idade dos animais, com uma tendência de baixa regulação em indivíduos mais velhos (Elder et al., 2023).

Este foi o primeiro estudo a realizar uma análise transcriptômica de bovinos Angus puros e mestiços naturalmente infectados por *Babesia bovis*, fornecendo *insights* valiosos sobre os mecanismos genéticos envolvidos na resposta imune. Nossos resultados demonstraram que a infecção por *B. bovis* induziu uma resposta transcricional diferencial significativa exclusivamente nos bezerros mestiços. Essa resposta foi caracterizada pela modulação de genes e vias associadas à quimiotaxia de neutrófilos, à sinalização de IL-17, à interação citocina-receptor, à citotoxicidade mediada por células NK e à apresentação de antígenos. Genes envolvidos na manutenção da integridade eritrocitária, como *SELP* e *HBB*, também foram ativados, indicando um esforço homeostático diante da infecção. Em contraste, os animais Angus puros não apresentaram alterações transcricionais detectáveis, o que pode sugerir um perfil de estabilidade imune ou, possivelmente influenciado pela sua idade mais avançada, que a janela de amostragem não foi ideal para capturar sua dinâmica de resposta. Apesar das limitações relacionadas ao tamanho amostral e à diferença etária entre os grupos genéticos, este trabalho estabelece um fundamento importante para o entendimento da interação hospedeiro-parasita em condições naturais. Os genes candidatos e as vias biológicas identificadas nos bovinos mestiços são alvos promissores para futuras validações funcionais e, potencialmente, para a incorporação em programas de seleção assistida por marcadores (MAS). Compreender esses mecanismos transcriptômicos é fundamental para avançar no melhoramento genético da resistência à babesiose bovina e para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle e prevenção da doença na pecuária.

5. Conclusão

Este estudo evidenciou uma modulação transcricional significativa em resposta à infecção por *B. bovis* unicamente no grupo de animais mestiços. Em contrapartida, os animais Angus puros não exibiram mudanças transcricionais mensuráveis. Esse cenário sugere uma possível estabilidade imunológica ou, alternativamente, que a janela de amostragem foi insuficiente para capturar sua dinâmica de resposta, fator possivelmente influenciado pela idade mais avançada desses indivíduos. Os resultados ampliam o panorama sobre os mecanismos genéticos associados à resistência a doenças parasitárias, reforçando a necessidade de abordagens multidisciplinares para enfrentamento de desafios sanitários na pecuária. O conhecimento gerado serve como base para o desenvolvimento futuro de ferramentas de melhoramento animal e para subsidiar políticas voltadas à sustentabilidade e saúde dos rebanhos.

6. Referências bibliográficas

- Ahlawat, S., Bharti, P. K., Arora, R., & Kishore, A. 2023. Unraveling the genetic mechanisms governing the host response to bovine anaplasmosis. *Gene*, 877, 147532.
- Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1072(2-3), 129–157.
- Ashrafi, F., Nassiri, M., Javadmanesh, A., Rahimi, H., & Rezaee, S. A. (2020). Epigenetics evaluation of the oncogenic mechanisms of two closely related bovine and human deltaretroviruses: A system biology study. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103845.
- Azevedo, B.T., de Oliveira, H.N., Katiki, L.L., Vercesi Filho, A.E., Domingos, A.G., Antunes, S., Okino, C.H., de Sena Oliveira, M.C., Ibelli, A.M.G., Giglioti, R., 2024. A small proportion of Zebu genetic background in crossbred calves may not be enough to improve resistance against natural bovine *Babesia* spp. infections. *Veterinary Parasitology* 328, 110165.
- Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine*, 250(2), 91–104.
- Bock, R. E.; Kingston, T. G.; De Vos, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*,

- Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J., v.77, n.7, p.461-464, 1999.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., McLellan, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. Aust. Vet. J. 1997;75(5):337-40.
- Cardoso, F.F.; Gomes, C.C.G.; Sollero, B.P.; Oliveira, M.M.; Roso, V.M.; Piccoli, M.L.; Higa, R.H.; Yokoo, M.J.; Caetano, A.R.; Aguilar, I. Genomic prediction for tick resistance in Bradford and Hereford cattle. Journal of Animal Science., v.93, p.2693-2705, 2015.
- Cavani L, Lopes FB, Giglioti R, Bresolin T, Campos GS, Okino CH, Gulias-Gomes CC, Caetano AR, Oliveira MCS, Cardoso FF, Rosa GJM, Oliveira HN (2020) Inferring phenotypic causal networks for tick infestation, *Babesia bovis* infection, and weight gain in Hereford and Braford cattle using structural equation models. Livestock Science, 238.
- Chen X, Zhang S, Cheng Z, Cooke JS, Werling D, Wathes DC, et al. (2017). Polymorphisms in the selectin gene cluster are associated with fertility and survival time in a population of Holstein Friesian cows. PLoS ONE, 12(4): e0175555.
- Cuy-Chaparro, L., Reyes, C., Díaz-Guiot, E.V., Moreno-Pérez, D.A., Patarroyo, M.A., 2023. Developing Anti-*Babesia bovis* Blood Stage Vaccines: A New Perspective Regarding Synthetic Vaccines. International Journal of Molecular Sciences 24, 5219.
- Elder LA, Hinnant HR, Mandella CM, Claus-Walker RA, Parrish LM, Slanzon GS, et al. (2023). Differential gene expression in peripheral leukocytes of pre-weaned Holstein heifer calves with respiratory disease. PLoS ONE, 18(5): e0285876.
- Frabetti, A.F., Katiki, L.M., Caetano, L., Sarti, M.B., Falasca, T.M., Polli, H., Verissimo, C. J., Vercesi Filho, A.E., Oliveira, H.N., Oliveira, M.C.S., Giglioti, R., 2023. Natural levels of *Rhipicephalus microplus* infestation and *Anaplasma marginale* infection in Angus and Ultrablack calves. Exp. Appl. Acarol. 89, 131–140.
- Fraga, A.B., De Alencar, M.M., De Figueiredo, L.A., Razook, A.G., Dos Santos, Gonçalves, Cyrillo, J.N., 2003. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). Rev. Bras. Zootec. 32 (6), 1578–1586.
- Ghosh, D., Brown, S.L., Stumhofer, J.S., 2017. IL-17 Promotes Differentiation of Splenic LSK- Lymphoid Progenitors into B Cells following Plasmodium yoelii Infection. The Journal of Immunology 199(5), 1783-1795.
- Giglioti, R., Azevedo, B. T., de Oliveira, H. N., Katiki, L. M., Vercesi Filho, A. E., de Sena Oliveira, M. C., & Okino, C. H. (2022). How long does the mRNA

- remains stable in untreated whole bovine blood? *Molecular Biology Reports*, 49(1), 789–795.
- Giglioti, R., Oliveira, H.N., Bilhassi, T.B., Portilho, A.I., Okino, C.H., Marcondes, C.R., Oliveira, M.C.S., 2018. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 250, 78–84.
- 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.C.S. *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*, v. 7, p. 657-662, 2016.
- 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, 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-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 23, 463–471.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., Leon, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150–156.
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*, 117(25), 5965–5973.
- Ibelli, A.M.G., Ribeiro, A.R.B., Giglioti, R., Regitano, L.C.A., Alencar, M.M., Chagas, A.C.S., Paço, A.L., Oliveira, H.N., Duarte, J.M.S., Oliveira, M.C.S., 2012. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. *Vet. Parasitol.* 186, 425–430.
- Johnston, L.; Sinclair, D.F. 1980. Differences in response to experimental primary infection with *Babesia bovis* in Hereford, Droughtmaster and Brahman cattle, in *Ticks and Tick-borne Diseases*, edited by L.A.Y. Johnston & M.G. Cooper, Australian Veterinary Association, Artarmon.
- Jonsson, N.N.; Bock, R.E.; Jorgensen, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.*, v. 155.p. 1-9, 2008.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.

- Kelly, M. N., Kolls, J. K., Happel, K., Schwartzman, J. D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., & Khan, I. A. (2005). Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection. *Infection and Immunity*, 73(1), 617–621.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., & Wang, J. M. 2004. Chemokines and chemokine receptors: Their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 1(2), 95-118.
- Liang, G., Malmuthuge, N., Bao, H., Stothard, P., Griebel, P.J., Guan, L.L., 2016. Transcriptome analysis reveals regional and temporal differences in mucosal immune system development in the small intestine of neonatal calves. *BMC Genomics* 17, 602.
- Lyu, P., Settlage, R. E., & Jiang, H. (2021). Genome-wide identification of enhancers and transcription factors regulating the myogenic differentiation of bovine satellite cells. *BMC Genomics*, 22, 901.
- Mapholi, N.O., Maiwashe, A., Matika, O., Riggio, V., Bishop, S.C., MacNeil, M.D., et al. Genome-wide association study of tick resistance in South African Nguni cattle. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 487–97, 2016.
- Muthusamy, M., Ramasamy, K. T., Peters, S. O., Palani, S., Gowthaman, V., Nagarajan, M., Karuppusamy, S., Thangavelu, V., & Aranganoor Kannan, T. (2024). Transcriptomic Profiling Reveals Altered Expression of Genes Involved in Metabolic and Immune Processes in NDV-Infected Chicken Embryos. *Metabolites*, 14(12), 669.
- Okino, C.H., Giglioti, R.G., Silva, P.C., Oliveira, H.N., Oliveira, M.C.S. Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. 2018. *Mol. Biol. Rep.* 45: 2671.
- 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., 2008. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Vet. Parasitol.* 155, 281–286.
- Omer, F.M., Riley, E.M., 1998. Transforming growth factor β production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *Journal of Experimental Medicine* 188(1), 39-48.
- Palomino, D. C. T., & Marti, L. C. 2015. Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)*, 13(3), 469-473.
- Porto-Neto L.R., Bunch, R.J., Harrison, B.E., Barendse, W. 2011. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. *Anim Genet.* 42, 50–55.

- Shoda, L.K.M., Palmer, G.H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D., Brown, W.C., 2000. *Babesia bovis*–stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and Immunity* 68(9), 5139–5145.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545–15550.
- Surlis, C., Earley, B., McGee, M., Keogh, K., Cormican, P., Blackshields, G., Tiernan, K., Dunn, A., Morrison, S., Arguello, A., Waters, S.M., 2018. Blood immune transcriptome analysis of artificially fed dairy calves and naturally suckled beef calves from birth to 7 days of age. *Scientific Reports* 8, 15461.
- Wassmer SC, de Souza JB, et al. (2004). Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is associated with high expression levels of P-selectin. *Blood*, 104(12), 3792–3798.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001. Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung CXC Chemokine and Granulocyte Colony-stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *Journal of Experimental Medicine* 194(4), 519–527.