

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

**PADRÕES DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES
QUIMIOCÍNICOS E TLR10 EM INFECÇÕES NATURAIS DE
BABESIOSE E ANAPLASMOSE BOVINA**

Mayne Barboza Sarti

Médica veterinária

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

**PADRÕES DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES
QUIMIOCÍNICOS E TLR10 EM INFECÇÕES NATURAIS DE
BABESIOSE E ANAPLASMOSE BOVINA**

Discente: Mayne Barboza Sarti

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Giglioti

Coorientadora: Profa. Dra. Cintia Righetti Marcondes

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

S249p Sartí, Mayne Barboza
Padrões de expressão de mediadores quimioquímicos e tlr10 em infecções naturais de babesiose e anaplasmoses bovina / Mayne Barboza Sartí. -- Jaboticabal, 2026
50 p.

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

Orientador: Rodrigo Giglioti

Coorientadora: Cintia Righetti Marcondes

1. Quimioquinas. 2. Toll-Like Receptor 10. 3. Bovinos. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O impacto desta dissertação está na investigação de mediadores imunológicos em infecções por babesiose e anaplasrose em bovinos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças transmitidas por carrapatos, auxiliando na sanidade animal, na redução de perdas econômicas e na promoção da sustentabilidade da pecuária.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The impact of this dissertation lies in the investigation of immunological mediators in bovine babesiosis and anaplasmosis infections, contributing to the development of strategies for controlling tick-borne diseases, supporting animal health, reducing economic losses, and promoting sustainability in livestock production.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PADRÕES DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES QUIMIOCÍNICOS E TLR10 EM INFECÇÕES NATURAIS DE BABESIOSE E ANAPLASMOSE BOVINA


AUTORA: MAYNE BARBOZA SARTI

ORIENTADOR: RODRIGO GIGLIOTI ORIENTADORA: CINTIA RIGHETTI MARCONDES

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

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO GIGLIOTI**
Data: 25/02/2026 09:55:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **ANIBAL EUGENIO VERCESI FILHO**
Data: 25/02/2026 10:05:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pesquisador Dr. **ANIBAL EUGÊNIO VERCESI FILHO** (Participação Presencial)
CAPTA Bovinos de Leite / Instituto de Zootecnia - Nova Odessa/SP

Documento assinado digitalmente
 **LENIRA EL FARO ZADRA**
Data: 25/02/2026 15:09:07-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pesquisadora Dra. **LENIRA EL FARO ZADRA** (Participação Presencial)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mayne Barboza Sarti nasceu em 07 de julho de 2000, em Americana (SP). Em fevereiro de 2018, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Americana. Durante a graduação, desenvolveu duas iniciações científicas no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa. A primeira foi realizada na área de Forragicultura e Pastagens, sob orientação da Dra. Karina Batista. A segunda foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Molecular, sob orientação do Dr. Rodrigo Giglioti, com foco na estimativa dos níveis de infecção por hemoparasitoses em bezerros. Concluiu a graduação em 2023, obtendo o título de Médica Veterinária. Desde março de 2024, é pós-graduanda no curso de Mestrado em Ciência Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me permitir a realização de mais um sonho tão almejado, e aos meus pais, pelo amor incondicional e pelo apoio constante em cada etapa da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter realizado em minha vida este sonho. Foi Ele quem me sustentou em cada etapa, abriu portas, concedeu oportunidades e me fortaleceu até aqui.

Aos meus pais, pelo incentivo constante e por estarem sempre ao meu lado em cada desafio.

Ao meu irmão, Eduardo, que embarcou para morar em Portugal no mesmo dia em que iniciei o mestrado. Sinto sua ausência em muitos momentos, mas sei que, mesmo de longe, sempre esteve torcendo e apoiando.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rodrigo Giglioti, pela confiança no meu trabalho, pela orientação sempre acolhedora e por todo apoio e ensinamento desde a iniciação científica até esta etapa tão importante da minha vida acadêmica. Sua dedicação como professor e orientador foi essencial para o meu crescimento.

Ao meu namorado, Marcelo, por todo amor e paciência ao longo deste processo. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio nos dias de estresse e por me acalmar nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Gustavo Borges e Edimar, que conheci na no início da pós-graduação e que tornaram esta jornada mais leve e divertida. Obrigada pela amizade sincera.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Biomolecular do Instituto de Zootecnia, em especial à Mestre Fernanda e às Labcats, pela convivência, pela parceria nas colheitas, extrações, congressos e eventos, e pelos momentos de descontração que fizeram toda diferença.

À UNESP, por ser uma universidade que contribuiu de forma significativa para minha formação; ao Instituto de Zootecnia, que se tornou uma segunda casa ao disponibilizar sua estrutura e laboratório; (À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa processo 2019/22675–6.)

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

A todos, registro minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	ii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Parasitismo por carrapatos	3
2.2 Babesiose e Anaplasmosose	4
2.3 Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
2.4 A raça Angus e Ultrablack.....	8
2.5 Resposta imune inata e adaptativa de bovinos	9
3. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 2 - Expression patterns of chemokine mediators and TLR10 in natural bovine babesiosis and anaplasmosis infections	17
1. INTRODUCTION	17
2. MATERIALS AND METHODS.....	19
2.1 Experimental animals and blood collections	19
2.2 DNA extraction and qPCR.....	20
2.3 RNA extraction and cDNA synthesis.....	21
2.4 Relative gene expression.....	22
3. RESULTS	24
4. DISCUSSION	27
5. CONCLUSION.....	31
6. REFERENCES	31

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

O projeto foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia (CEUA-IZ-328-2021).

PADRÕES DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES QUIMIOCÍNICOS E TLR10 EM INFECÇÕES NATURAIS DE BABESIOSE E ANAPLASMOSE BOVINA

RESUMO – A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de enfermidades causadas pelos hemoparasitas *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, transmitidos principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. Trata-se de um importante desafio sanitário e econômico para a pecuária bovina, devido à elevada morbidade e mortalidade, à redução na produção de carne e leite, à ocorrência de abortos e aos altos custos associados às medidas de controle. A babesiose caracteriza-se, principalmente, pela hemólise intravascular resultante da multiplicação dos protozoários no interior das hemácias, enquanto a anaplasmoose manifesta anemia severa decorrente da destruição de eritrócitos parasitados e da resposta imune do hospedeiro. A apresentação clínica e a gravidade da TPB são influenciadas por fatores ambientais, pela intensidade de infestação do vetor e, pela composição genética dos animais. Bovinos zebuínos, apresentam maior resistência às infecções, enquanto animais taurinos e seus cruzamentos, apesar do elevado potencial produtivo, mostram-se mais susceptíveis aos agentes da TPB. Essas diferenças reforçam a importância da resposta imune do hospedeiro na evolução da doença e na capacidade de controle das infecções. No processo inflamatório, citocinas e quimiocinas desempenham papel fundamental na regulação da inflamação, atuando no recrutamento e na ativação de células do sistema imune. Da mesma forma, os receptores do tipo Toll (Toll-like receptors – TLRs) são essenciais para o reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos e para a ativação da imunidade inata. Entre eles, o TLR10 tem despertado interesse por seu papel modulador da resposta inflamatória. A interação entre quimiocinas, seus receptores e os TLRs pode interferir na intensidade da resposta imune e, conseqüentemente, na resistência dos animais às infecções. Dessa forma, o presente estudo avaliou a expressão dos genes CCR3, CXCL12, CXCL8, CXCR1 e TLR10 em bezerros Angus e Ultrablack naturalmente infectados por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, e a relação entre a expressão desses mediadores imunológicos, a carga parasitária e o grupo genético dos animais. Os resultados indicaram diferentes padrões de modulação da resposta imune na TPB, influenciados pela interação entre carga parasitária e genética do hospedeiro, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro.

Palavras-chave: Hemoparasitoses, quimiocinas, TLRs

EXPRESSION PATTERNS OF CHEMOKINE MEDIATORS AND TLR10 IN NATURAL BOVINE BABESIOSIS AND ANAPLASMOSIS INFECTIONS

ABSTRACT – Bovine Tick Fever (BTF) is a complex of diseases caused by the hemoparasites *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*, transmitted mainly by the tick *Rhipicephalus microplus*. It represents an important sanitary and economic challenge to cattle production due to high morbidity and mortality, reduced meat and milk yield, occurrence of abortions, and the high costs associated with control measures. Babesiosis is mainly characterized by intravascular hemolysis resulting from the multiplication of protozoa within erythrocytes, whereas anaplasmosis presents with severe anemia resulting from the destruction of parasitized erythrocytes and the host immune response. The clinical presentation and severity of BTF are influenced by environmental factors, the intensity of vector infestation, and the genetic composition of the animals. Zebu cattle generally show greater resistance to infection, whereas taurine cattle and their crosses, despite their high productive potential, are more susceptible to the agents of BTF. These differences highlight the importance of the host immune response in disease progression and in the control of hemoparasitic infections. During the inflammatory process, cytokines and chemokines play a fundamental role in regulating inflammation by promoting the recruitment and activation of immune cells. Likewise, Toll-like receptors (TLRs) are essential for the recognition of pathogen-associated molecular patterns and for the activation of innate immunity. Among these receptors, TLR10 has attracted interest due to its potential modulatory role in the inflammatory response. The interaction between chemokines, their receptors, and TLRs can influence the magnitude of the immune response and, consequently, the resistance of animals to infection. Accordingly, the present study evaluated the expression of the *CCR3*, *CXCL12*, *CXCL8*, *CXCR1*, and *TLR10* genes in Angus and Ultrablack calves naturally infected with *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale*, as well as the relationship between the expression of these immune mediators, parasite load, and genetic group. The results indicated distinct patterns of immune response modulation in BTF, influenced by the interaction between parasite burden and host genetics, contributing to a better understanding of the mechanisms involved in host response.

Keywords: Hemoparasitic diseases, chemokines, TLR10

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) corresponde a um conjunto de enfermidades causadas por diferentes agentes etiológicos, mas que apresentam manifestações clínicas, características e aspectos epidemiológicos semelhantes (Kikugawa, 2009; Santos et al., 2017; Silva Junior et al., 2018).

Embora seja mais conhecida pela sua ocorrência em bovinos, a TPB também pode acometer outros animais domésticos e silvestres, incluindo ovinos, caprinos, bubalinos, ruminantes silvestres, além de caninos, felinos, equinos, roedores e, ocasionalmente, seres humanos (Santos, 2013; Herrera, 2019; Turruella et al., 2020).

No Brasil, o carrapato *Rhipicephalus microplus* é o principal vetor da babesiose e da anaplasmose bovina. A tristeza parasitária é considerada uma das doenças parasitárias mais importantes que afetam o gado, causando perdas econômicas substanciais na pecuária brasileira. Essas infecções podem ocorrer de forma assíncrona ou se manifestar simultaneamente no mesmo animal.

A babesiose parasita os eritrócitos, causando anemia hemolítica intravascular, o principal sinal clínico (Bock et al., 2004). Em contraste, a anaplasmose leva à anemia e hemólise extensiva (Kocan et al., 2010; Tucker et al., 2016). Os impactos econômicos da babesiose e da anaplasmose bovina vão além da mortalidade e incluem morbidade, abortos, redução na produção de carne e leite, aumento dos custos veterinários e restrições ao comércio internacional de produtos bovinos (Kocan et al., 2003; Bock et al., 2004). Ambas as doenças apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, particularmente em áreas de instabilidade enzoótica (McCosker, 1981).

Raças zebuínas são amplamente utilizadas em regiões tropicais devido à sua maior resistência a carrapatos e às doenças transmitidas por esses vetores. No entanto, o uso do cruzamento entre taurinos e zebuínos pode ser uma estratégia voltada para aumentar a produtividade, despertando o interesse dos produtores brasileiros que buscam melhorar a eficiência do rebanho (Ibelli et al., 2012). Contudo, os ganhos produtivos advindos da introdução de raças taurinas e seus cruzamentos

nos sistemas de pecuária de corte muitas vezes são limitados pelas perdas causadas por infecções hemoparasitárias e infestações por carrapatos (Oliveira et al., 2013).

Os zebuínos (*Bos taurus indicus*) apresentam maior resistência às infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* quando comparados a bovinos europeus (*Bos taurus*) (Parker et al., 1990; Bock et al., 1997). Estudos mais recentes demonstram que bovinos da raça Nelore apresentam maior resistência aos carrapatos e que, mesmo quando criados juntamente com animais mais suscetíveis, não apresentam aumento no nível de infestação nem prejuízos no ganho de peso, contribuindo para a manutenção da estabilidade enzoótica (Andreotti et al., 2018).

As quimiocinas são pequenas moléculas inicialmente descritas como citocinas quimiotáticas (Luster, 1998), e desempenham um papel fundamental tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Essas proteínas regulam a ativação e o recrutamento de leucócitos e outros tipos celulares, guiando sua migração durante processos inflamatórios e em condições basais (Foxman et al., 1997; Mantovani et al., 2001; Bachelier et al., 2014; Russo et al., 2014).

A babesiose grave também é considerada uma doença imunomediada, caracterizada por uma resposta inflamatória excessiva, particularmente pela produção exacerbada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, em especial fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1, também conhecida como CCL2), quimiocina derivada de queratinócitos (KC, ou CXCL1), proteína induzida por interferon-gama 10 (IP-10, ou CXCL10), interleucina-6 (IL-6), IL-8 (CXCL8), IL-12, IL-18, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, ou CSF-2) e proteína de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB-1), participam do desenvolvimento dessas complicações (Zygner et al., 2023).

Além das quimiocinas, os receptores Toll-like (TLRs) desempenham um papel crucial na resposta imune inata, pois reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativam o sinal de defesa subsequente (Takeda et al., 2003). Os TLRs estão presentes em uma ampla variedade de organismos (Akira et al., 2006) e funcionam como moléculas sinalizadoras de superfície celular essenciais para o início da defesa contra infecções.

Dentre os TLRs, o TLR10 tem despertado interesse por seu possível papel

modulador da resposta inflamatória. Esse receptor é expresso em órgãos como linfonodos, baço, timo, pulmões e em células do sistema imune, incluindo macrófagos e neutrófilos (Chuang e Ulevitch, 2001). O mRNA do TLR10 é detectável durante o desenvolvimento inicial de linfócitos B, sendo sua tradução observada principalmente durante a diferenciação (Bourke et al., 2003).

Portanto, investigar a expressão de genes relacionados à ativação imunológica e à inflamação, como quimiocinas e TLRs, pode ajudar a identificar marcadores genéticos associados à resistência à babesiose e à anaplasiose em bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parasitismo por carrapatos

No Brasil, o carrapato *Rhipicephalus microplus* e as hemoparasitoses representam grandes fontes de prejuízos para os pecuaristas. Os parasitas do gênero *Babesia* são transmitidos exclusivamente pelo carrapato bovino (Bock et al., 2004). Portanto, a babesiose bovina é considerada endêmica em regiões onde a presença do carrapato é constante. Os fatores associados aos surtos de babesiose incluem o desenvolvimento crescente da resistência aos pesticidas, a disseminação de carrapatos infectados e o aumento da temperatura ambiental em áreas anteriormente livres desses hemoparasitas (Waal e Combrick, 2006).

Os carrapatos são os principais ectoparasitas que causam prejuízos à pecuária em todo o mundo, com perdas econômicas significativas. No Brasil, em 2019, essas infestações resultaram em perdas estimadas em cerca de 3,5 milhões de dólares na produção bovina (Mendes, 2019). Além do carrapato, as babesioses estão entre as principais enfermidades que afetam os rebanhos bovinos taurinos e são responsáveis por causar importantes perdas econômicas na indústria pecuária de regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barros et al., 2005, Rodriguez-Vivas et al., 2018).

Os impactos das hemoparasitoses incluem mortalidade, abortos, perda de peso, queda na produtividade, custos de controle, impacto no comércio internacional de bovinos, entre outros (Kocan et al., 2003; Bock et al., 2004; Barros et al., 2005). A anemia acentuada causada pelas hemoparasitoses é o aspecto mais relevante da patogenicidade destes parasitas podendo levar à alta porcentagem de mortalidade em rebanhos não imunes (Mccosker, 1981; Kessler e Schenk, 1998; Kocan et al., 2003).

A *B. bovis* é considerada a mais patogênica das duas espécies, podendo causar disfunções ou falhas cerebrais, renais e pulmonares, sendo fatal em animais suscetíveis (Wright e Goodger, 1988; Clark e Jacobson, 1998; Schetters e Eling, 1999; Brown et al., 2006).

Do ponto de vista epidemiológico, as regiões onde a presença do carrapato e, conseqüentemente, das hemoparasitoses são constantes, são classificadas como áreas de estabilidade endêmica (Mahoney, 1962; Mahoney e Ross, 1972). Nessas regiões, os carrapatos inoculam constantemente as hemoparasitoses nos bovinos, que desenvolvem imunidade. Contudo, em regiões de instabilidade endêmica, onde a presença do carrapato é sazonal ou manejo sanitário inadequado leva à redução na população de carrapatos vetores, a estabilidade endêmica pode ser convertida em instabilidade, aumentando o impacto das hemoparasitoses nos rebanhos (Guglielmone, 1995).

Segundo Waal e Combrick (2006), o controle dos carrapatos em áreas endêmicas é mais difícil. Os autores afirmam que as doenças transmitidas por carrapatos podem ser controladas pela sua erradicação ou manutenção de baixos níveis de infestação. No entanto, estudos recentes têm mostrado que a variação dos níveis de infecção por hemoparasitas não depende diretamente dos níveis de infestação de carrapatos nos bovinos (Giglioti et al., 2016; 2018).

2.2 Babesiose e Anaplasmosse

O ciclo de infecção da babesiose inicia-se quando os carrapatos inoculam a fase de esporozoítos na corrente sanguínea do bovino. Esses esporozoítos invadem as hemácias, transformando-se em trofozoítos, que se dividem em merozoítos. Esse processo provoca a lise celular e a liberação de hemoglobina (Santos, 2013; Ferreira, 2019). No hospedeiro bovino, os merozoítos invadem novas hemácias, enquanto alguns são ingeridos pelo carrapato durante a alimentação, chegando ao intestino do vetor, onde se diferenciam em gametócitos.

No carrapato, ocorre a fusão dos gametas, formando um zigoto que evolui para um cineto móvel. Esse cineto infecta as células intestinais do carrapato e migra para as glândulas salivares, sendo liberado nos bovinos durante a alimentação. O ciclo se repete com a multiplicação dos parasitas (Santos, 2013; Ferreira, 2019).

A *B. bovis* é transmitida apenas pela fase de larvas, enquanto que a *B. bigemina*

pode ser transmitida por ninfas e adultos de *R. Microplus* (Trindade et al., 2011; Santos, 2013). O período de incubação da babesiose varia de sete a vinte dias. Após a infecção, os protozoários começam a se multiplicar: *Babesia bigemina* prefere vasos periféricos, enquanto *Babesia bovis* se concentra em vasos viscerais como o baço, rins, fígado, coração, pulmões, cérebro, cerebelo e meninges, com pouca afinidade pela circulação periférica e essa multiplicação resulta na destruição das hemácias, causando os sinais clínicos da doença (Ferreira, 2019).

Durante o pico da multiplicação, há hemólise que pode ser clinicamente detectada, levando ao desenvolvimento de anemia severa, icterícia e hemoglobinúria, com evolução potencial para morte devido à anoxia e anemia (Kikugawa, 2009). Após a infecção eritrocitária, há um aumento no número de hemácias parasitadas, que passam a apresentar alterações na superfície, sendo fagocitadas por macrófagos e células do sistema reticuloendotelial, principalmente no baço, o que resulta em anemia (Kikugawa, 2009; Santos, 2013). Dessa forma, ocorre uma queda no hematócrito e aumento da temperatura corporal.

Esse processo está associado à produção de anticorpos das classes IgM e IgG, que bloqueiam os sítios de ligação e penetração dos parasitas nos eritrócitos, promovendo a lise dos corpúsculos iniciais e citotoxicidade celular (Kikugawa, 2009). No entanto, a imunidade humoral não protege contra a reinfecção, e a imunidade celular específica não age diretamente, uma vez que os eritrócitos dos bovinos não apresentam o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (Kikugawa, 2009). Após sobreviver à infecção aguda, os animais infectados podem desenvolver uma infecção persistente devido a variações antigênicas (Kikugawa, 2009).

A anaplasmose bovina tem como agente causador a *riquétsia Anaplasma marginale* (Kocan et al., 2010), que pode ser transmitida biologicamente por carrapatos, mecanicamente por artrópodes hematófagos (como moscas e mosquitos) e por fômites contaminados, além de também poder ser transmitida de forma transplacentária (Silva e Fonseca, 2014), sendo que no Brasil o principal transmissor é *R. microplus* (Araújo et al., 1998).

A anaplasmose é uma doença endêmica nas regiões tropicais e subtropicais (Kocan et al., 2010; Fernandes et al., 2019). Entre as espécies do gênero, *Anaplasma marginale* (Família *Anaplasmataceae*) é considerada a mais patogênica e de maior

importância para os bovinos (Vidotto e Marana, 2001; Marana et al., 2009). A transmissão desse agente pelos carrapatos pode ocorrer de diferentes formas. No vetor, há a transmissão transestadial, quando o carrapato adquire o patógeno em um estágio de desenvolvimento (como larva ou ninfa) e o transmite no estágio seguinte (ninfa ou adulto). Também pode ocorrer a transmissão transovariana, na qual a fêmea infectada transmite o agente para sua prole por meio dos ovos (Browman, 2006). Além disso, machos de carrapatos podem atuar como transmissores, adquirindo a infecção em um animal portador e disseminando-a para outro hospedeiro suscetível durante o processo de alimentação (Kessler, 2001).

A distribuição da anaplasmose bovina, assim como da babesiose, varia conforme as condições ambientais e a presença de vetores. De acordo com Vidotto e Marana (2001), podem ser identificadas três situações epidemiológicas: áreas livres, onde as condições climáticas não favorecem a sobrevivência e reprodução dos vetores; áreas de instabilidade enzoótica, nas quais o ambiente apresenta condições apenas parcialmente favoráveis ao desenvolvimento dos vetores, podendo ocorrer surtos sazonais em determinados períodos do ano; e áreas de estabilidade enzoótica, caracterizadas por condições climáticas adequadas à manutenção dos vetores durante todo o ano, permitindo a circulação contínua dos agentes entre os animais.

Nas áreas de estabilidade enzoótica, a infecção por *Anaplasma marginale* ocorre geralmente nos primeiros dias de vida dos bezerros, pois os vetores estão presentes de forma constante durante todo o ano. Nesses casos, os animais tendem a desenvolver maior resistência à doença devido à transferência de anticorpos maternos por meio do colostro (Vidotto e Marana, 2001). *A. marginale* é uma riquetsia intraeritrocitária capaz de infectar uma grande proporção das hemácias dos bovinos, podendo variar de 10% a 90% das células (Kieser et al., 1990). O período de incubação, ou fase pré-patente, apresenta ampla variação, entre 7 e 60 dias, com média de aproximadamente 28 dias. Após a infecção das hemácias, observa-se um aumento progressivo na quantidade de células parasitadas (Kocan et al., 2010), podendo alcançar até 10^9 hemácias infectadas por mililitro de sangue (Scoles et al., 2005). Essas hemácias parasitadas são posteriormente fagocitadas pelas células do sistema reticuloendotelial, o que leva ao desenvolvimento de anemia e icterícia, sem a presença de hemoglobinemia ou hemoglobinúria (Kocan et al., 2010).

2.3 Carrapato *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus possui ciclo de vida monoxeno, ou seja, desenvolve todo o seu ciclo biológico em um único hospedeiro. Este carrapato possui dois ciclos de vida, sendo que um ocorre no hospedeiro (ciclo de vida parasitário) e outro em vida livre (ciclo de vida livre) (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

A fase parasitária inicia-se com a fixação da larva infestante ao animal, que inicialmente alimentam-se de linfa, seu corpo se dilata, sofre uma muda metamórfica chamada de metalarva (octópode), e por ruptura de suas paredes do abdome, é liberada a ninfa, em torno do oitavo dia após a fixação. Neste estágio já começa a se alimentar de sangue (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

A ninfa se alimenta, sofre outra muda e libera a metaninfa, e a partir desta fase, os instares sofrem a diferenciação sexual. Os machos jovens são denominados neandros e ao se tornarem adultos gonandros (15° dia após a fixação). Os machos são menores que as fêmeas, e percorrem o corpo do animal, alimentando-se de sangue e fecundando várias fêmeas (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

A fêmea jovem é denominada neógina e ao redor do 18° dia, denomina-se partenógina, quando apresenta maturidade sexual. Após a fecundação, a fêmea continua seu repasto sanguíneo ingurgitando-se totalmente ao fim do período parasitário, quando passa a ser denominada teleógina (ao redor do 21° dia, quando se desprende do animal) (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

A teleógina cai no solo para iniciar a postura. A fase de vida livre inicia-se quando a teleógina se desprende do hospedeiro e cai ao solo, e em seguida, procuram áreas protegidas dos raios solares diretos, com temperatura e umidade favoráveis, para iniciar a postura (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

No solo, inicia-se o período de pré-postura, que dura entre 2 e 3 dias. Ao final deste período, inicia-se o período de postura, dura cerca de 15 dias, sendo que o 5° dia é aquele onde ocorre a maior produção de ovos. A eclosão das larvas (hexápode) inicia-se ao redor do 7° dia após o final do período de postura e se completa em mais sete dias quando se tornam infestantes, aptas a se fixarem nos bovinos e iniciarem novamente o ciclo de vida parasitário (Gonzales, 1993; Pereira et al., 2008).

A fase de vida livre do carrapato pode variar, podendo ser mais curta ou mais longa, dependendo da temperatura e umidade do ambiente. No período de outubro a

março, meses considerados mais quentes e chuvosos, o desenvolvimento dos ovos é mais rápido, quando comparado aos meses de abril a setembro, cujas temperaturas são mais secas e frias. Aproximadamente 95% da população de carrapatos está presente no ambiente (na fase de vida livre), seja como larvas infestantes e ovos, ou fêmeas em período de pré-postura e postura (Kohek Junior, 2015).

2.4 As raças Angus e Ultrablack

A raça Aberdeen Angus se destaca por sua elevada fertilidade, baixo peso ao nascer, baixa mortalidade de terneiros, precocidade de puberdade, facilidade de parto, habilidade materna e excelente qualidade de carne e carcaça (ABA, 2020, Fraser, 1959; Williams, 1967; Santiago, 1975).

Originária de um grupo relacionado às raças mochas locais do nordeste e centro da Escócia, a Aberdeen Angus desenvolveu-se em condições climáticas rigorosas, o que favoreceu sua rusticidade e vigor produtivo (Fraser, 1959; Williams, 1967; Felius, 1985).

Apesar de ser adaptada principalmente a regiões de clima temperado, em ambientes tropicais sua utilização ocorre predominantemente por meio de cruzamentos com raças zebuínas, buscando maior adaptação ambiental sem comprometer o desempenho produtivo e a qualidade da carne (Santiago, 1975). A raça também apresenta forte prepotência em cruzamentos, garantindo transmissão consistente de características desejáveis à progênie (ABA, 2020).

A raça Ultrablack apresenta elevada proporção de genética Angus (aproximadamente 80%), conforme estabelecido nos regulamentos de registro genealógico da Associação Brasileira de Angus (ABA, 2020). Originária da Austrália, trata-se de uma raça sintética resultante do cruzamento entre animais da raça Angus e zebuínos, mantendo no mínimo essa proporção de sangue Angus (ABA, 2020). Os exemplares apresentam aptidão para corte, sendo caracterizados por serem mochos, de pelagem lisa, preta ou vermelha, além de apresentarem temperamento dócil, boa habilidade materna e baixo peso ao nascer.

Essa composição genética combina características produtivas e reprodutivas desejáveis de raças taurinas com a adaptabilidade dos zebuínos, resultando em animais com bom desempenho produtivo e reprodutivo. De acordo com a International Brangus Breeders Association (IBBA), a raça Ultrablack associa a adaptabilidade

ambiental e a excelência materna do Brangus ao elevado marmoreio, facilidade de parto e reconhecimento da raça Angus.

O vigor híbrido em bovinos de corte está relacionado a melhorias no desempenho produtivo e reprodutivo, incluindo maior taxa de prenhez, melhor desempenho ao desmame, maior capacidade de serviço dos touros, aumento do perímetro escrotal e maior produção espermática, além de ganhos em crescimento e qualidade de carcaça, especialmente em sistemas de cruzamento entre raças taurinas e compostas (Battistelli et al., 2013).

2.5 Resposta imune inata e adaptativa de bovinos

A resistência dos bovinos às infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* resulta da interação entre mecanismos da imunidade inata e adaptativa, bem como da influenciada idade, de fatores genéticos e fisiológicos. A imunidade inata atua como primeira linha de defesa, desencadeando respostas rápidas mediadas por macrófagos, neutrófilos e células NK, que produzem citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , e metabólitos tóxicos, incluindo os intermediários reativos de nitrogênio (RNI) e oxigênio (ROI), fundamentais para limitar a replicação inicial dos hemoparasitas (Bock et al., 2004; Brown et al., 2006).

Nos casos de infecção por *Babesia spp.*, macrófagos esplênicos ativados por IFN- γ desempenham papel central na destruição de eritrócitos parasitados por meio da liberação de óxido nítrico (NO), cuja ação é dose-dependente e inibitória sobre *B. bovis* (Shoda et al., 2000; Goff et al., 2002). Em bezerros jovens, essa resposta ocorre de forma precoce, com rápida expressão de IL-12, IL-18, IFN- γ e NO, explicando sua maior resistência clínica à babesiose severa. Em contraste, bovinos adultos apresentam resposta tardia e modulada por IL-10, o que favorece quadros clínicos mais graves (Brown et al., 1996; Shoda et al., 2000).

A imunidade adaptativa também contribui significativamente para a resistência frente às babesioses. A ativação de linfócitos T CD4+ induz perfis Th1, com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, que promovem ativação de macrófagos e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Os anticorpos produzidos atuam como opsoninas, favorecendo a fagocitose e auxiliando na resolução da parasitemia (Mahoney et al., 1979). A manutenção de infecção persistente, com baixa parasitemia não clínica,

caracteriza a imunidade concomitante, responsável por conferir proteção duradoura contra manifestações clínicas mesmo na presença de infecção contínua (Brown et al., 2006).

Do ponto de vista genético, há evidências consistentes de que bovinos *Bos taurus indicus* apresentam maior resistência às babesioses que bovinos *Bos taurus taurus* (Johnston e Sinclair, 1980; Bock et al., 1997, 1999). Zebuínos apresentam menor parasitemia, menor gravidade clínica e melhor capacidade de controlar o parasita, enquanto animais europeus ou mestiços demonstram maior suscetibilidade, resultando em maior necessidade de vacinação e manejo preventivo (Jonsson et al., 2008).

Nos estudos realizados por Giglioti et al. (2018) foram observadas repetibilidades das infecções por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* de 0,35; 0,32 e 0,48, respectivamente, sugerindo que há variabilidade individual na resistência e que esta pode ser utilizada como critério de seleção dentro de programas de melhoramento genético.

Quanto à anaplasmoze bovina, embora os mecanismos imunológicos sejam menos elucidados, sabe-se que animais infectados podem controlar a fase aguda, porém desenvolvem infecções persistentes associadas à variação antigênica de proteínas de superfície (MSP-1, MSP-2 e MSP-3), o que dificulta a completa eliminação do patógeno (French et al., 1998; 1999). A resposta adaptativa nesse caso depende de células T CD4+ de memória, que reconhecem epítopos conservados dessas proteínas e produzem IFN- γ e TNF- α , contribuindo para o controle parcial da infecção (Brown et al., 1998a; 1998b).

3. REFERÊNCIAS

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** 124:783–801.

Al-Khedery B, Allred DR (2006) Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family within a bidirectional locus of active transcription. **Molecular Microbiology** 59:402–414.

Andreotti R, Barros J, Valerio GM, Rodrigues SV, Higa L, Duarte OP et al (2018) Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. **Semina** 39:1099–1115.

Araújo FR, Madruga CR, Leal CRB, Bastos PAS, Marques APC (1998) **Frequência de anticorpos anti-Anaplasma marginale em rebanhos leiteiros da Bahia**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 50:243–246.

Associação Brasileira de Angus (2020) **Regulamento do serviço de registro genealógico**. Porto Alegre, RS, 2020. 27 p. [Aprovada pelo MAPA em 21 de setembro de 2020].

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadière C, Farber JM, Graham GJ et al (2014) Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacological Reviews** 66:1–79.

Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, Almeida MA, Melo EPS, Kessler RH (2005) **Serological survey of Babesia bovis, Babesia bigemina and Anaplasma marginale antibodies in cattle from the semi-arid region of Bahia, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100:613–617.

Battistelli JVF et al (2013) **Desempenho de novilhos cruzados e Nelore durante a terminação em confinamento**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 10., 2013, Uberaba. Anais [...]. Viçosa: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2013.

Benavides MV, Sá GL, Sacco AMS (2006) Resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia bovis*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa 60:32.
Bock R, Jackson L, De Vos AJ, Jorgensen W (2004) **Babesiosis of cattle**. **Parasitology** 129:247–269.

Bock RE, De Vos AJ, Kingston TG, McLellan DJ (1997) Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal** 75:337–340.

Bock RE, Kingston TG, De Vos AJ (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.**, v.77, n.7, p.461-464.

Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A (2003) The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. **Blood**, 102(3), 956-963.

Browman DD (2006) Artrópodes. In: **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Barueri, SP: Manole, 2006. cap. 1, p. 1-81.

Brown WC, McElwain TF, Ruef BJ, Suarez CE, Shkap V, Chitko-McKown CG et al (1996) *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle. **Infection and Immunity** 64:3341–3350.

Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH (1998a) CD4+ T-lymphocyte and IgG2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity** 66:5406–5413.

Brown WC, Zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH (1998b) Antigens recognized by CD4+ T-lymphocyte clones in *Anaplasma marginale* infection. **Infection and Immunity** 66:5414–5422.

Brown W, Norimine J, Knowles D, Goff W (2006) Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology** 138:75–87.

Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L (2009) Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Vet Res.** 40(2): 37.

Chuang T, Ulevitch RJ (2001) Identification of hTLR10: A novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene* **13 Structure and Expression**, 1518(1-2), 157-161.

Clark IA, Jacobson LS (1998) Do babesiosis and malaria share a common disease process? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 483-488.

Felius M. Genus Bos: cattle breeds of the world. [S.I.]: MSD AGVET; 1985. p.4-5.
Ferreira TAA (2019) **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de Anaplasma marginale e Babesia bovis**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia.

Fernandes SJ et al (2019) Diversity of *Anaplasma* species in cattle in Mozambique. **Ticks and Tick-borne Diseases** 10:651–664.

Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC (1997) Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 139:1349–1360.

Fraser A (1959) Beef cattle husbandry. **Crosby Lockwood e Son**.

Fraser, A. Beef cattle husbandry. [S.I.]: **Crosby Lockwood e Son**, 1959. p.62-79.

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

French DM, Brown, WC, Palmer GH. (1999) Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and immunity**, 67(11), 5834-5840.

Giglioti R, Oliveira HN, Bilhassi TB, Portilho AI, Okino CH, Marcondes CR, Oliveira MCS (2018) Estimates of repeatability of hemoparasite infection levels. **Veterinary Parasitology** 250:78–84.

- Giglioti R, Oliveira HN, Santana CH, Ibelli AMG et al (2016) *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7:657–662.
- Goff WL, Wagner GG, Craig TM, Long RF (1982) The bovine immune response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology** 11:109–120.
- Gonzales JC (1993) O controle do carrapato do boi. **Edição do Autor**, 80 p.
- Grisi L, Leite RC, Martins J RS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150–156.
- Guglielmone AA (1995) Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology** 57:109–119.
- Herrera AN (2019) **Anaplasmosis bovina hiperaguda**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Ibelli AMG et al (2012) Resistance 14 of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, 186(1-2), 425-430.
- Johnston L, Sinclair DF (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 Johnston LAY, e Cooper MG Australian Veterinary Association, Artarmon.
- Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK (2008) Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses 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.
- Kessler, RH (2001) Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179.
- Kessler RH, Schenk MAM (1998) **Tristeza parasitária dos bovinos: conceito, Etiologia, Transmissão, Epidemiologia, Diagnóstico e Controle**. In: Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. EMBRAPA Gado de Corte, p. 47-68.
- Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH (1990) Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection. **Infection and Immunity** 58:1117–1119.
- Kohek Junior I (2015) **Por que o tratamento contra o carrapato pode estar falhando?** Informativo Técnico do DDA.

Kocan KM, De La Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD (2003) Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale*. **Clinical Microbiology Reviews** 16:698–712.

Kocan KM, Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA (2010) The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology** 167:95–107.

Luster AD (1998) Chemokines and inflammation. **New England Journal of Medicine** 338:436–445.

Mahoney DF (1962) Bovine babesiosis diagnosis. **Australian Veterinary Journal** 38:48–52.

Mahoney DF, Ross DR (1972) The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **International Journal for Parasitology**, 9(4), 297–306.

Mahoney DF, Kerr JD, Goodger BV, Wright IG (1979) Immune response of cattle to *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology** 9:297–306.

Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P (2001) **Decoy receptors. Trends in Immunology** 22:328–336.

Marana ERM, Dias JA, Freire RL, Vicentini JC, Vidotto MC, Vidotto O (2009) Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26.

Mccosker PJ (1981) The global importance of babesiosis. In: Babesiosis. **Academic Press**, p. 1–19.

Mendes NS (2019) **Ocorrência e diversidade genética de *Babesia bovis***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista.

Oliveira MCS et al (2013) Resistance of beef cattle to ectoparasites. **Veterinary Parasitology** 197:168–175.

Parker CM et al (1990) Extrathymic changes in the T cell receptor repertoire. **Journal of Experimental Medicine** 171:1597–1612.

Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM (2008) *Rhipicephalus microplus*: biologia, controle e resistência. **Medvet**.

Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C (2018) Strategies for control of *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research** 117:3–29.

Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA (2014) The CXCL8/IL-8 chemokine family. **Expert Review of Clinical Immunology** 10:593–619.

Santiago AA (1975) **Os cruzamentos na pecuária bovina**. Instituto de Zootecnia.

Santos GB (2013) **Estudo epidemiológico da tristeza parasitária bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Santos GB, Gomes IMM, Silveira JAG, Pires LCSR et al (2017) Tristeza parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37:1–7.

Santos R (1999) Os cruzamentos na pecuária moderna. **Editora Agropecuária Tropical**.

Schettters TP, Eling WM (1999) Babesia infections as a model for cerebral malaria. **Parasitology Today** 15:492–497.

Shoda LK, Palmer GH, Florin-Christensen J et al (2000) *Babesia bovis*-stimulated macrophages. **Infection and Immunity** 68:5139–5145.

Silva JB, Fonseca AH (2014) Risk factors for anaplasmosis. **Tropical Animal Health and Production** 46:461–465.

Silva JB, Fonseca AH (2014) Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.46, n.2, p.461-465.

Silva Junior JR et al (2018) Tristeza parasitária em bovino Girolando. **Anais do Congresso de Iniciação Científica da Fundação Educacional de Ituverava**.

Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH (2005) Transmission of *Anaplasma marginale*. **Journal of Medical Entomology** 42:668–675.

Takeda K, Takeuchi O, Akira S (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research** 8:459–463.

Tizard IR (1998) A defesa do corpo. In: **Imunologia Veterinária**. Roca.

Trindade HI, Almeida KS, Freitas FLC (2011) Tristeza parasitária bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** 16:1–21.

Tucker TR, Aly SS, Maas J, Davy JS, Foley JE (2016) *Anaplasma marginale* seroprevalence. **Veterinary Medicine International** 2016:1768624.

Tuo W, Estes DM, Brown WC (1999) Cytokine responses of bovine CD4+ T cells. **Journal of Interferon and Cytokine Research** 19:741–749.

Turruella YF, Pompa GY, Rodríguez ET (2020) Anaplasmosis en bovinos Siboney. **Revista Granmense de Desarrollo** 4:469–477.

Utech KBW, Wharton RH, Kerr JD (1978) Resistance to *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Agricultural Research** 29:885.

Vidotto O, Marana ERM (2001) Diagnóstico em anaplasnose bovina. **Ciência Rural** 31:361–368.

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

Willians DW (1967) **Produção de gado de corte no sul dos EUA**. USAID.

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

Zygner W, Gójska-Zygner O, Norbury LJ (2023) Pathogenesis of anemia in canine babesiosis. **Pathogens** 12:166.

CHAPTER 2 - Expression patterns of chemokine mediators and TLR10 in natural bovine babesiosis and anaplasmosis infections ¹

ABSTRACT– Cattle tick fever, caused by the protozoa *Babesia bovis* and *B. bigemina* and the rickettsial bacterium *Anaplasma marginale*, represents a significant constraint to livestock productivity worldwide. Taurine cattle are considered more susceptible to these hemoparasites than zebuine breeds. Chemokines and Toll-like Receptors (TLRs) play key roles in immune processes such as chemotaxis and inflammation, primarily through interactions with respective receptors. This study assessed the relationship between the expression of four chemokine-related genes (*ccr3*, *cxcl12*, *cxcl8*, and *cxcr1*) and one TLR (*tlr10*) with the infection levels of *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale* in 24 naturally infected calves from two genetic groups (Angus [*n* = 13; 100% taurine] and Ultrablack [*n* = 11; 82% Angus, 18% zebuine]). Blood samples were collected every 30 days over six time points (Nov 2021–Apr 2022). DNA was used to quantify hemoparasite loads by qPCR (log DNA copy number, CNlog), while RNA was used for RT-qPCR-based gene expression analysis. A mixed model was used to assess associations between gene expression and infection levels, controlling for evaluation, sex, genetic group, and their interactions. All genes, except *cxcl12*, showed significant associations with at least one hemoparasite. Higher *B. bovis* and *B. bigemina* CNlog values were linked to reduced expression of most genes, whereas *A. marginale* infection was associated with increased gene expression. These findings highlight distinct immune modulation strategies by hemoparasites and underscore the need for species-specific interventions. Further studies are required to explore the mechanisms by which these mediators influence susceptibility or resistance in cattle.

Key-words: Chemokines, TLRs, tick fever, immune modulation, gene expression.

1. INTRODUCTION

Cattle tick fever is a disease complex involving infections by the protozoa *Babesia bovis* and/or *B. bigemina*, as well as the rickettsial bacterium *Anaplasma marginale* (Guglielmone and Robbins, 2023). In Brazil, the tick *Rhipicephalus microplus* is the primary vector of bovine babesiosis and anaplasmosis. Tick fever is

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 16, n. 6, p. 102546, 2025.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2025.102546>

considered one of the most significant parasitic diseases affecting cattle, causing substantial economic losses in the Brazilian livestock industry. According to Grisi et al. (2014), parasitic infestations in cattle result in annual economic losses of approximately US\$13.96 billion in Brazil, with *R. microplus* alone responsible for about US\$3.24 billion.

These infections may occur asynchronously or manifest simultaneously in the same animal. Babesiosis parasitizes erythrocytes, causing intravascular hemolytic anemia, which is the primary clinical sign (Bock et al., 2004). In contrast, anaplasmosis leads to anemia and extensive hemolysis (Kocan et al., 2010; Tucker et al., 2016). The economic impacts of babesiosis and bovine anaplasmosis extend beyond mortality and include morbidity, abortions, reduced meat and milk production, increased veterinary costs, and restrictions on international trade of cattle products (Kocan et al., 2003; Bock et al., 2004). Both diseases have high morbidity and mortality rates, particularly in areas of enzootic instability (McCosker, 1981).

Zebu breeds are widely used in tropical regions due to their greater resistance to ticks and tick-borne diseases. Crossbreeding taurine and zebu breeds is a strategy aimed at increasing productivity and has attracted interest among Brazilian producers seeking to improve herd efficiency (Ibelli et al., 2012). However, productivity gains from the introduction of taurine breeds and their crosses into beef cattle systems are often limited by losses caused by hemoparasite infections and tick infestations (Oliveira et al., 2013). It has been observed that Zebu cattle (*Bos taurus indicus*) show greater resistance to *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale* infections than European cattle (*Bos taurus*) (Parker et al., 1990; Bock et al., 1997).

Chemokines are small molecules initially described as chemotactic cytokines (Luster, 1998), playing a fundamental role in both innate and adaptive immunity. These proteins regulate the activation and recruitment of leukocytes and other cell types, guiding their migration during inflammation and under basal conditions (Bachelier et al., 2014; Foxman et al., 1997; Mantovani et al., 2001; Russo et al., 2014). Severe babesiosis is also considered an immune-mediated disease, characterized by an excessive inflammatory response, particularly the overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines.

Pro-inflammatory cytokines and chemokines, particularly tumor necrosis factor-

alpha (TNF α), interferon-gamma (IFN- γ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, also known as CCL2), keratinocyte-derived chemokine (KC, or CXCL1), interferon gamma-induced protein 10 (IP-10, or CXCL10), interleukin-6 (IL-6), IL-8 (CXCL8), IL-12, IL-18, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, or CSF-2), and high-mobility group box 1 protein (HMGB-1), play roles in the development of these complications (Zygner et al., 2023).

Galán et al. (2018) evaluated immune response mediators in dogs infected with *Babesia canis* and found negative correlations between IL-8 and packed cell volume, suggesting that increased IL-8 concentrations occur in parallel with hemolysis. In a five-year follow-up of a human patient infected with *Babesia venatorum*, Zhao et al. (2020) observed that serum cytokine and chemokine concentrations correlated with symptom severity. Additionally, transcriptome analysis and extensive protein profiling revealed previously unreported cytokines involved in the course of babesiosis, including IL-13, IL-15, IL-17A, CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL8, CXCL2, CXCL3, and GM-CSF.

Genes encoding Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in the innate immune response, recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and activate downstream immune signaling (Takeda et al., 2003). TLRs are found in a wide range of organisms (Akira et al., 2006) and function as cell surface signaling molecules essential for initiating defense against infections. TLR10 is expressed in organs such as the lymph nodes, spleen, thymus, and lungs, and in immune cells including macrophages and neutrophils (Chuang and Ulevitch, 2001). The mRNA of *tlr10* is detectable during early B cell development, with translation occurring mainly during differentiation (Bourke et al., 2003).

Therefore, investigating the expression of genes related to immune activation and inflammation, such as chemokines and TLRs, may help identify genetic markers associated with resistance to babesiosis and anaplasmosis in cattle.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental animals and blood collections

One hundred RNA samples were obtained from 24 calves. The calves originated from the municipality of José Bonifácio (São Paulo, Brazil; coordinates 21 2

' 23 " S, 49 ° 41 ' 28 " W) and belonged to two breeds: Angus (n = 13; 10 females and 3 males) and Ultrablack (n = 11; 5 females and 6 males). At the beginning of the experiment, the average ages of the calves from the Angus and Ultrablack genetic groups were 2.8 ± 1.6 months and 2.1 ± 1.3 months, respectively. For the Angus group, ages ranged from 13 to 150 days, while for the Ultrablack group, ages ranged from 13 to 137 days. According to breeder records, the Ultrablack breed was produced by crossing Brangus cattle (3/8 Zebu and 5/8 Angus), resulting in a zebuine genetic composition of approximately 18%, which corresponds to half the zebuine proportion present in the Brangus parent breed. Six sampling events were conducted at average intervals of 30 days between 10 November 2021 and 19 April 2022 (1st to 6th: 24-Nov-21, 21-Dec-21, 19-Jan-22, 15-Feb-22, 16-Mar-22, 19-Apr-22). This resulted in a total of 100 observations, considering that each animal was present in at least three evaluations. Some evaluations did not allow for the collection of samples suitable for obtaining RNA of acceptable integrity.

Previous studies have shown that the region under study is endemic for *R. microplus* infestations, which also favors the occurrence of babesiosis and anaplasmosis (Giglioti et al., 2016; Frabetti et al., 2023; Azevedo et al., 2024). During the experimental period, the animals were constantly exposed to natural infestation by the tick vector *R. microplus*. At all evaluations, the animals had a tick infestation score ≥ 1 (mean of 1.82 ± 0.19 , corresponding to approximately 60 ticks) (Frabetti et al., 2023). The calves were kept in rotated paddocks comprising coast-cross grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). Tick controls were performed every 21 days by applying of fipronil pour-on (Topline®). Hemoparasite controls were performed when animals showed clinical signs. Throughout the study, all animals were closely monitored and showed no clinical signs of other diseases.

Blood samples from each animal at each evaluation were collected using vacuum tubes with EDTA anticoagulant and submitted for RNA and DNA extraction.

2.2 DNA extraction and qPCR

Blood samples containing EDTA were processed for DNA extraction using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit, following the manufacturer's protocol for isolating genomic DNA from 300 μ L of whole blood (Promega®, Madison, USA). The purity and concentration of the extracted DNA were assessed using a BioDrop

spectrophotometer (Bio Drop uLITE, Biochrom Ltd., UK). The DNA was then diluted in TE buffer (Tris-EDTA, pH 7.8) to a concentration of 20 ng/ μ L and stored at 20 until further analysis.

Absolute quantification of copy numbers of *B. bovis* (CN_{log}^{bo}) and *B. bigemina* (CN_{log}^{big}) was performed by quantitative PCR (qPCR) as described by Okino et al. (2018), using primers and probes targeting the mitochondrial cytochrome b (*mt-cyB*) gene, generating 98 bp amplicons. qPCR assays for quantifying *A. marginale* (CN_{log}^{an}) infection levels were performed according to Giglioti et al. (2019), using primers and probes targeting a 119-nucleotide fragment of the major surface protein 1b (*mSP1b*) gene.

The PCR assays were carried out using the CFX™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA), with a total reaction volume of 10 μ L. Each reaction contained 2 μ L of 5 \times HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 0.5 μ L of each primer (10 μ M), 0.5 μ L of probe (2.5 μ M), 4.0 μ L of nuclease-free water, and 2.0 μ L of DNA template. The thermal cycling protocol included an initial step of 10 min at 95° C, followed by 40 cycles of denaturation at 95° and annealing/extension at 60° C for 15 s C for 1 min. All samples were analyzed in duplicate, alongside positive and negative controls. For each hemoparasite, a calibration curve was generated using synthetic gBlocks® gene fragments (IDT, IA, USA). These gBlocks® fragments, representing the target sequences of *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale*, were serially diluted 10-fold to establish the standard curve.

2.3 RNA extraction and cDNA synthesis

RNA was extracted from whole blood samples from each animal following the methodology described by Giglioti et al. (2022). The extraction was performed within 24 h after blood collection. RNA concentration and purity were measured using a BioDrop spectrophotometer (BioDrop). RNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The RNA samples were then treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, CA, USA), following the manufacturer's protocol and using Oligo(dT) primers (IDT). To ensure the reliability of the qPCR results, RNA

integrity was confirmed by gel electrophoresis (Supplementary information 1).

2.4 Relative gene expression

Primers for the target genes were designed using PrimerQuest software (IDT). Their specificity and quality were evaluated using Net Primer, OligoAnalyzer (IDT), NCBI BLAST, and Primer-BLAST. Details of the primer sets for the target genes are provided in Table 1. RT-qPCR reactions were performed using a CFX96 system (Bio-Rad) in a final volume of 10 μ L, containing 2 μ L of 5 \times HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne), 0.3 μ L (10 μ M) of each primer, 2.4 μ L of ultrapure water (Sigma-Aldrich), and 2 μ L of cDNA (approximately 50 ng). One initial cycle of enzymatic activation at 95°C for 12 min was followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 63°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. After amplification, melting curve analysis was performed by increasing the temperature from 60°C to 95°C in 0.5°C increments, with a 5-second hold at each step.

The reference genes used for normalization were those previously described by Giglioti et al. (2022): beta-actin (*actb*), beta-2-microglobulin (*b2m*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), peptidylprolyl isomerase A (*ppia*), and tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (*ywhaz*). The algorithms used to identify the most stable genes were geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), and BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Additionally, a final ranking of the most stable genes was obtained using the RankAggregated tool, which applies a Monte Carlo cross-entropy algorithm (Pihur et al., 2007).

Relative gene expression was calculated using the 2 $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). The *b2m* and *ppia* genes were identified as the most stable and were used to normalize the quantification cycle (Cq) values (Supplementary information 2). The Cq values were normalized using the geometric mean of *ppia* and *b2m*, and fold changes in gene expression were calculated using the 2 $\Delta\Delta$ Ct method. Fold change values for each target gene, along with DNA copy number (CN_{log}), were used as covariates in the mixed model regression. Melting peaks were examined to assess amplification specificity, confirming the presence of a single product for each reaction (Supplementary information 3).

Table 1. Sequences of oligonucleotides used in the RT-qPCR assays. Primer

sequences (forward [F] and reverse [R]) for amplifying target genes, along with their corresponding GenBank accession IDs, gene symbols, amplicon sizes (base pairs, bp), and 5'→3' nucleotide sequences.

GenBank ID	Gene	Sequence 5' - 3'	Size (pb)
GU936961.1	<i>ccr3</i>	F: CCAACATCTACCTGCTCAAC R: CCACTCGTTCCACCTAACA	92
NM_001113174.1	<i>cxcl12</i>	F: GCCGATTCTTTGAGAGCCA R: GCACACTTGCCTATTGTTGTTC	119
KX013247.1	<i>cxcl8</i>	F: GCTGGCTGTTGCTCTCTT R: GGTGGAAGGTGTGGAATGT	125
JQ410019.1	<i>cxcr1</i>	F: GCTGTTCTGCTACGGATTCA R: CGAGCACGACAGCAAAGAT	95
AM086210.1	<i>tlr10</i>	F: GCCCAAGGATAGGCGTAAAT R: CAGAACCTCCAAACCCTTCAT	134

2.5 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using SAS PROC MIXED in SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), employing the Restricted Maximum Likelihood (REML) method to estimate variance components.

Prior to the main analyses, all evaluated variables were pre-corrected for the animals age effect at each evaluation, using a model that included the fixed effects of genetic group and sex. For each analysis, a dependent variable (fold change values *ccr3*, *cxcl12*, *cxcl8*, *cxcr1*, or *tlr10* genes) was used in the model. This model included fixed effects for the factors: evaluation, sex, and genetic group, as well as the interactions between sex and genetic group and between genetic group and evaluation. The covariates $CN_{\log^{big}}$, $CN_{\log^{bo}}$, and $CN_{\log^{an}}$ were included in the model with regression coefficients that quantified their influence on the response variable (expression of each target gene). The animal effect was included as a random factor, and repeated measures from the same animal were used. The assumed covariance matrix model was a first-order autoregressive ($AR(1)$) structure. The significance of effects was assessed using the F-test ($\alpha = 0.05$). The model equation is described below:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + B. C_{jk} + C. A_{ki} + \beta_1 D_1 + \beta_2 E_m + G_p + e_{ijklm}$$

where:

Y_{ijklm} dependent variable (target genes - *ccr3*, *cxcl12*, *cxcl8*, *cxcr1*, or *tlr10*)

μ mean

A_i Fixed effect of evaluation

B_j Fixed effect of sex

C_k Fixed effect of genetic group

$B.C_{jk}$ Fixed interaction effect between sex and genetic group

$C.A_{ki}$ Interaction between genetic group and evaluation

$\beta_1 D_l$ Effect of the CNlog bi covariate

$\beta_2 E_m$ Effect of the CNlog bo covariate

$\beta_3 F_n$ Effect of the CNlog an covariate

$G_p \sim N(0, \sigma^2_G)$ Random effect of the animal

$e_{ijklm} \sim N(0, \sigma^2)$ Residual error.

3. RESULTS

The mean values of untransformed DNA copy numbers (copies/ μ L), followed by the frequencies of positives for infections with *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale*, were 35.0 (log = 1.54; 88.0%, $n = 88$), 791.0 (log = 2.90; 98.0%, $n = 98$), and 20,326 (log = 4.33; 100%, $n = 100$), respectively (Supplementary information 4).

Data analysis revealed no significant effects ($p > 0.05$) of the studied genes regarding genetic group, sex, or their interactions. Only the evaluation effect was significant ($p < 0.05$). Furthermore, gene expression levels varied across the six evaluations, corresponding to fluctuations in the DNA copy number of hemoparasites (Fig. 1).

Except for *cxc112*, all genes showed significant associations (positive or negative) with at least two hemoparasite species (Table 2). This association indicates that for each unit increase in CN_{log}, there is a decrease (when negative) or an increase (when positive) in the estimated gene expression value. For example, the estimated value for the relationship between *ccr3* and CN_{log}^{bi}g shows that, for each unit of CN_{log}^{bi}g, there is a decrease of 0.43 in *ccr3* gene expression (Table 2). Similarly, the positive estimated value between *tlr10* and CN_{log}^{an} shows that, for each unit of CN_{log}^{an}, there is an increase of 0.60 in *tlr10* gene expression (Table 2).

All estimated values for each target gene associated with the CN_{log} of each hemoparasite species are shown in Fig. 1. It was observed that for all significant CN_{log}

values of *B. bovis* and *B. bigemina*, gene expression decreased, whereas for *A. marginale*, the relationship was inverse (Fig. 1).

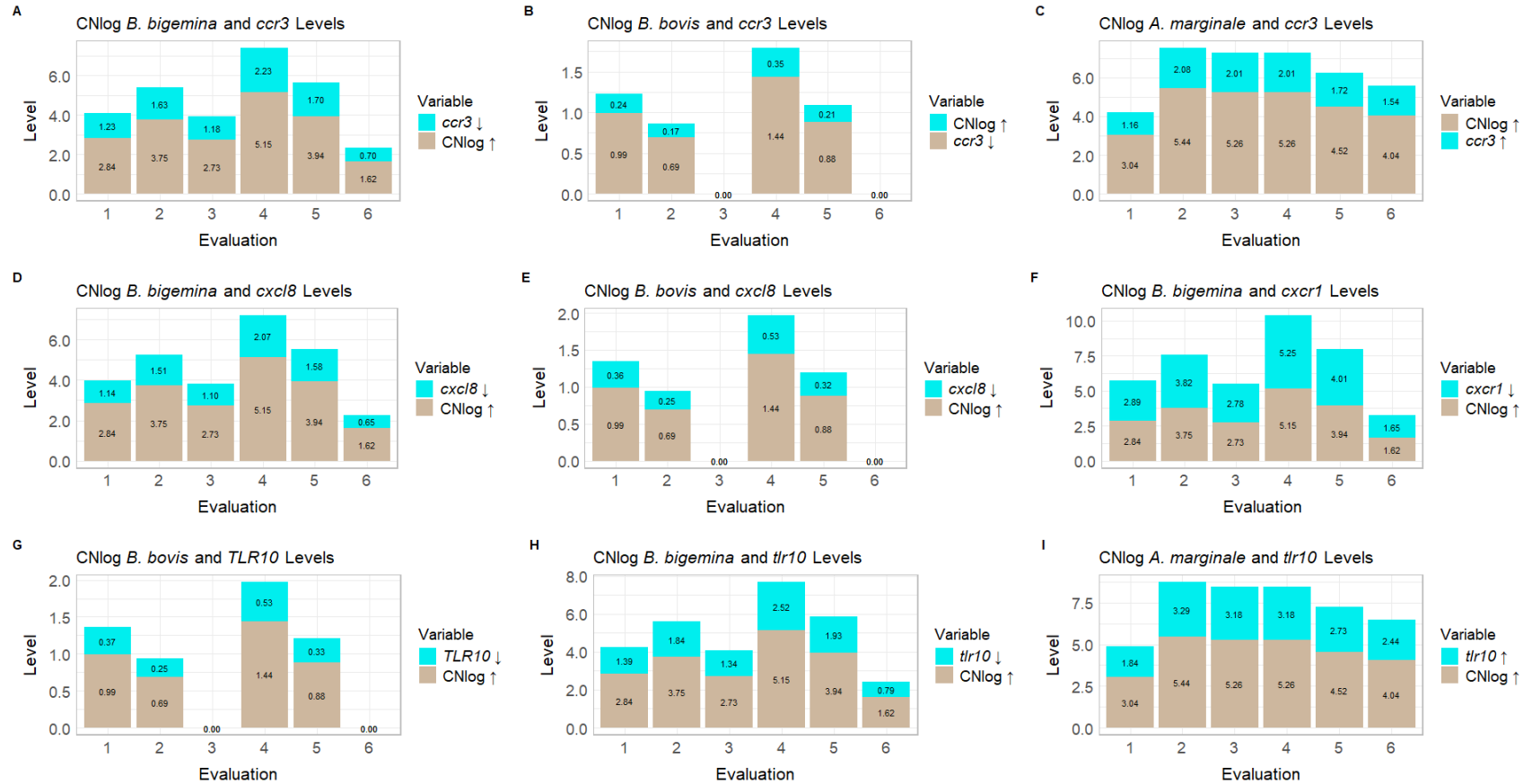


Fig. 1. Relationship between DNA copy number (CNlog, copies/ μ L) and estimated gene expression (fold change) levels. Bars represent the regression estimates (solution for fixed effects) for the genes *CCR3*, *CXCL8*, *CXCR1*, and *TLR10* across six evaluations. The genes *CCR3*, *CXCL8*, and *CXCR1* are chemokines, while *TLR10* is a Toll-like receptor. Panels A, D, F, and H show CNlog for *B. bigemina*; panels B, E, and G show CNlog for *B. bovis*; and panels C and I show CNlog for *A. marginale*. Arrows indicate the relationship between CNlog and gene expression: arrows in opposite directions (cyan and beige bars) suggest an inverse relationship (i.e., increased CNlog associated with decreased gene expression), while arrows in the same direction (beige bars) indicate a positive relationship (i.e., both CNlog and gene expression increase). Evaluations: 1st to 6th (24-Nov-21, 21-Dec-21, 19-Jan-22, 15-Feb-22, 16-Mar-22, 19-Apr-22).

Table 2 Estimated effects of the association between DNA copy number (CN_{log}) and gene expression levels. Negative effect values indicate an inverse relationship, where increased CN_{log} is associated with decreased gene expression. Positive values indicate a direct relationship, where both CN_{log} and gene expression increase. CN_{log}^{big} = CN_{log} *B. bigemina*; CN_{log}^{bov} = CN_{log} *B. bovis*; CN_{log}^{ana} = CN_{log} *A. Marginale*.

DNA _{log} copy number	Expression gene levels									
	<i>ccr3</i>		<i>cxcl8</i>		<i>cxcl12</i>		<i>cxcr1</i>		<i>tlr10</i>	
	effect	P value	effect	P value	effect	P value	effect	P value	effect	P value
CN_{log}^{big}	-0.43	0.006**	-0.40	0.046**	.	ns	-0.88	0.009**	-0.49	0.015
CN_{log}^{bov}	-0.24	0.037**	-0.35	0.073*	.	ns	.	ns	-0.37	0.056*
CN_{log}^{ana}	0.38	0.003**	.	ns	.	ns	-	ns	0.60	0.004

4. DISCUSSION

The results of this study demonstrate distinct patterns of gene expression in response to different hemoparasite infections in cattle. The observed downregulation of chemokine genes (*ccr3*, *cxcl8*, and *cxcr1*) during *Babesia bovis* and *B. bigemina* infections suggests a potential mechanism of immune modulation or suppression by these protozoan parasites. This finding aligns with previous reports that *Babesia* species interfere with host immune responses to establish persistent infections. Goff et al. (1998) provided evidence that *B. bovis* infection induces the production of interleukin-10 (IL-10), which can downregulate the expression of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide, thereby aiding parasite persistence. According to Brown et al. (2006), *B. bovis* typically induces severe, potentially lethal infections in mature cattle. Following recovery, animals develop persistent infections without clinical signs. These persistently infected cattle acquire resistance to subsequent infections by similar parasite strains, a phenomenon known as concomitant immunity.

This immunosuppressive profile is further supported by the functional roles of the downregulated chemokines. The receptor CXCR1 (also known as IL-8RA, IL-8R-I, or IL-8R) interacts with chemokines such as CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, and CXCL8, and is expressed in polymorphonuclear granulocytes, monocytes, astrocytes, endothelial cells, and mast cells. Meanwhile, the CCR3 receptor (also

known as CXCR3, CC CKR3, EotR, or CMKBR3) binds to CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL24, and CCL26, acting on eosinophils, basophils, T cells (Th2 >Th1), dendritic cells, platelets, and mast cells. Additionally, CXCL8 (IL-8/NAP-1), an inflammatory chemokine, primarily induces chemotaxis in neutrophils, but also in T cells, basophils, and endothelial cells (Le et al., 2004; Palomino and Marti, 2015). The suppression of these pathways during *Babesia* infection may therefore reflect a parasite strategy to dampen inflammatory and adaptive immune responses, facilitating chronicity.

The negative correlation between parasite load and chemokine expression suggests an evolutionary adaptation of parasites to evade host defenses through the suppression of inflammatory responses. In contrast, the positive correlation between *A. marginale* infection levels and the upregulation of *ccr3* and *tlr10* suggests a distinct immune strategy against this rickettsial pathogen. Elevated expression of *ccr3*, which, as previously mentioned, interacts with chemokines and play crucial roles in immune signaling, could enhance chemokine production and the recruitment of immune cells. This response may be directly influenced by the increasing parasitic burden of *A. marginale*. The upregulation of these genes could indicate an active inflammatory response, as TLR10 has been implicated in recognizing bacterial components and initiating innate immune defenses (Hasan et al., 2005). Extensive studies on TLR2 have demonstrated that its association with TLR1 and TLR6 is essential for efficient ligand binding, enabling the discrimination between triacylated and diacylated bacterial lipopeptides (Takeda et al., 2002). Thus, according to Hasan et al. (2005), TLR10 may potentially act as a coreceptor for these TLRs and therefore recognize similar ligands. This differential response between protozoan and bacterial infections highlights the complexity of host–pathogen interactions in co-infection scenarios.

The lack of significant differences in chemokine and TLR10 gene expression between Angus (100% taurine) and Ultrablack (82% taurine/ 18% zebuine) cattle aligns with Azevedo et al. (2024), who studied the same herd and found that the low percentage of zebu ancestry in Ultrablack animals did not confer measurable resistance to *Babesia spp.* According to these authors, due to Mendelian segregation and crossing-over processes, the estimated proportion of zebu genetics resulting from Ultrablack mating may differ from the actual proportion (~18%).

Temporal variations in gene expression across the six sampling periods underscore the dynamic nature of host-parasite interactions. The significant effect of evaluation time on gene expression levels, independent of genetic group or sex, suggests that environmental factors or infection progression may play a substantial role in modulating immune responses. This variability may reflect natural fluctuations in parasite load or the cyclical activation of the immune system during persistent infections (Bock et al., 2004), emphasizing the importance of longitudinal studies for understanding the immunology of hemoparasitic diseases. As noted by Brown et al. (2001, 2006), evolutionary pressure favors parasites that establish persistent infections through immune modulation rather than causing host mortality, with parasitemia often cycling unnoticed in infected but otherwise clinically healthy animals. This typically involves the induction of host responses that limit pathogen proliferation without achieving complete clearance (Brown et al., 2006). Therefore, the use of repeated measures and mixed models in this study effectively captured these temporal dynamics, providing a robust analysis of the complex relationship between parasite load and gene expression.

The contrasting relationships between gene expression and different parasite species have important implications for understanding disease pathogenesis and developing control strategies. The negative associations between *Babesia* infections and chemokine expression suggest that these parasites may actively suppress host immune responses, potentially contributing to their ability to establish chronic infections. This finding is consistent with studies showing that *Babesia can* modulate host cytokine production (Zygner et al., 2023). According to Zygner et al. (2023), the immune response to the infection by *B. canis* is driven by pro-inflammatory cytokines and chemokines, especially IFN- γ , TNF α , IL-6, and IL-8. Their findings further indicate that disease pathogenesis, including the development of anemia, results from a disrupted equilibrium between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine networks.

In contrast, the positive association between *A. marginale* infection and immune gene expression suggests that the host mounts a more pronounced inflammatory response to this bacterial pathogen. This immune profile differs from that observed in babesiosis and may help explain variations in clinical manifestations and

disease outcomes between the two infections. Under the conditions of the present study, these findings indicate that therapeutic or preventive strategies may need to be tailored accordingly. Currently, there are no specific studies directly investigate the *ccr3* and *tlr10* genes in cattle infected with *A. marginale*. Ahlawat et al. (2023) demonstrated that *A. marginale* infection significantly alters the expression of multiple cytokines and chemokines, including CXCL2 and CXCL8, which signal through CXCR1. However, in our study, a significant association between *cxcr1* gene expression and *A. marginale* infection was not observed. Müller et al. (2021) investigated the immune response of murine neutrophils to *Anaplasma phagocytophilum* infection and noted that TLR7, TLR9, and the TRIF pathway play significant roles in the production of pro-inflammatory cytokines such as MIP-1 α , TNF, and IL-6. Although TLR10 was not directly studied, these findings highlight the importance of Toll-like receptors in the immune response to Anaplasma infections. Our results reinforce the hypothesis of an active inflammatory response during *A. marginale* infection and provide insight into the mechanisms by which this pathogen interacts with the bovine immune system. Consequently, immunomodulatory strategies that harness or regulate this response could enhance disease control.

While our study did not find statistically significant associations between hemoparasite species and *cxcl12* gene expression, CXCL12 plays a crucial and multifaceted biological role in immune regulation, cellular trafficking, and even general cell proliferation. Known as SDF-1 CXCL12 and its receptor CXCR4 are fundamental for leukocyte trafficking and the retention and mobilization of hematopoietic cells, including neutrophils, within the bone marrow (Pello et al., 2006; Siberski-Cooper et al., 2024). Beyond immunity, CXCL12 also influences broader cellular dynamics, including cell growth and proliferation (Zhang et al., 2019). Given its role in general cell proliferation (Zhang et al., 2019) and the dynamic host-pathogen interactions in persistent infections, the lack of statistical significance here does not preclude CXCL12 from playing a crucial, albeit indirect, role in the host response or parasite persistence mechanisms. In the context of persistent infections, which are hallmarks of *A. marginale* that evade clearance through mechanisms such as antigenic variation despite antimicrobial treatment (Curtis et al., 2021; Mauri Pablo et al., 2025), our findings of *ccr3* and *tlr10* upregulation suggest a sustained inflammatory response,

contrasting with the immunosuppression observed in *Babesia*.

These findings provide an additional foundation for future research aimed at clarifying the specific mechanisms through which hemoparasites influence host gene expression. Further studies will be essential to advance our understanding of host-pathogen interactions and to support the development of targeted control strategies.

5. CONCLUSION

Our study elucidates the roles of chemokines and Toll-like receptors in bovine immune responses to infections with *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *Anaplasma marginale*. The observed downregulation of *ccr3*, *cxcl8*, and *cxcr1* in response to *Babesia spp.* suggests a parasite-driven immune evasion strategy that may contribute to chronic infection. Conversely, the upregulation of *ccr3* and *tlr10* during *A. marginale* infection indicates a more pronounced pro-inflammatory response, which may contribute to the elimination or reduction of the infection. The absence of significant differences between Angus and Ultrablack cattle underscores the complexity of genetic resistance, suggesting that a higher proportion of zebuine ancestry may be necessary to produce detectable phenotypic effects. Our findings contribute to a better understanding of host-pathogen dynamics in tick-borne diseases and emphasize the importance of species-specific immunomodulatory approaches.

Ethical approval

This experiment adhered to the ethical principles of animal experimentation of the Instituto de Zootecnia Ethics Committee on Animal Experimentation (Protocol Nr. 328–2021).

Funding

This project was supported by grants from the São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) (Grant #2019/22675–6, #2022/16262–3) and the Institute of Animal Science (APTA-SAA).

6. REFERENCES

Ahlawat S, Bharti PK, Arora R, Kishore A (2023) Unraveling the genetic mechanisms governing the host response to bovine anaplasmosis. **Gene** 877, 147532.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity.

Cell 124 (4), 783–801.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.** 64 (15), 5245–5250.

Azevedo BT, Oliveira HN, Katiki LM, Vercesi Filho AE, Domingos, AG, Antunes S, Okino CH, Oliveira MCS, 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.* **Vet. Parasitol.** 328, 110165.

Bachelierie, F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadière C, Farber JM, Graham GJ, Zlotnik A (2014) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol. Rev.** 66 (1), 1–79.

Bilhassi TB, Oliveira HN, Ibelli AMG, Giglioti R, Regitano LCA, Oliveira STCG, Bressani FA, Malago W, Resende FD, Oliveira MCS (2014) Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks Tick-Borne Dis.** 5 (3), 234–238.

Bock RE, De Vos AJ, Kingston TG, McLellan DJ (1997) Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Aust. Vet. J.** 75 (5), 337–340.

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

Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A (2003) The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. **Blood** 102 (3), 956–963.

Brown WC (2001) Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. **Vet. Parasitol.** 101 (3–4), 233–248.

Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF (2006) Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. **Parasite Immunol.** 28 (7), 315–327.

Chuang T, Ulevitch RJ (2001) Identification of hTLR10: a novel human toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gene Struct. Expr.* 1518 (1–2), 157–161.

Curtis AK, Kleinhenz MD, Anantatat T, Martin M, Magnin GC, Coetzee, JF, Reif KE, (2021) Failure to eliminate persistent anaplasma marginale infection from cattle using labeled doses of chlortetracycline and oxytetracycline antimicrobials. **Vet. Sci.** 8 (11),

283.

Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC (1997) Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J. Cell Biol.* 139 (5), 1349–1360.

Frabetti AF, Katiki, LM, Caetano L, Sarti MB, Falasca TM, Polli H, Verissimo CJ, Vercesi Filho AE, Oliveira HN, Oliveira MCS, Giglioti R (2023) Natural levels of rhipicephalus microplus infestation and anaplasma marginale infection in Angus and Ultrablack calves. *Exp. Appl. Acarol.* 89 (1–2), 131–140.

Galán A, Mayer I, Rafaj RB, Bendelja K, Sušić V, Cerón JJ, Mrljak V (2018) MCP 1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by *Babesia canis*. *Plos One* 13 (1), e0190474.

Giglioti R, Azevedo BT, Oliveira HN, Katiki LM, Vercesi Filho AE, Oliveira MCS, Okino C (2022) How long does the mRNA remains stable in untreated whole bovine blood? *Mol. Biol. Rep.* 49 (1), 789–795.

Giglioti R, Bassetto CC, Okino CH, de Oliveira HN, de Sena Oliveira MC (2019) Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of anaplasma marginale. *Exp. Appl. Acarol.* 77 (1), 65–72.

Giglioti R, Oliveira HN, Santana CH, Ibelli AMG, Néo TA, Bilhassi TB, Rabelo MD, Machado RZ, Brito LG, Oliveira MCS (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.

Goff WL, Johnson WC, Cluff CW (1998) *Babesia bovis* immunity: in vitro and in vivo evidence for IL-10 regulation of IFN- γ and iNOS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849, 161–180.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Villela HS, (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23 (2), 150–156. <https://doi.org/10.1590/S198429612014042>.

Guglielmone AA, Robbins RG (2023) Hard ticks (Acari: ixodida: ixodidae) parasitizing domestic animals and humans in Africa, Latin America, and the Caribbean. *Exp. Appl. Acarol.* 89 (1–2), 1–45.

Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Bates EE (2005) Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* 174 (5), 2942–2950.

Ibelli AMG, Ribeiro ARB, Giglioti R, Regitano LCA, Alencar MM, Chagas ACS, Paço AL, Oliveira HN, Duarte JMS, Oliveira MCS (2012) Resistance of cattle of various genetic groups to the tick rhipicephalus microplus and the relationship with coat traits. *Vet. Parasitol.* 186 (1–2), 425–430.

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA (2010) The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.** 167 (2–4), 95–107.

Kocan, KM, de la Fuente J, Guglielmono AA, Meléndez RD (2003) Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Microbiol. Rev.** 16 (4), 698–712.

Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang JM (2004) Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cell. Mol. Immunol.** 1 (2), 95–118.

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

Luster AD (1998) Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.** 338 (7), 436–445.

Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P (2001) Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. **Trends Immunol.** 22 (6), 328–336.

Mauri Pablo JD, Del Solar JJC, Hinojosa Enciso ET, Polveiro RC, Vieira DdS, Ramos SEM, Bardales EW, Maicelo QJL, Lopez LRM (2025) Anaplasmosis in the Amazon: diagnostic challenges, persistence, and control of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Front. Vet. Sci.** 12, 1571694.

McCosker PJ (1981) The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier JP (Eds.), **Babesiosis. Academic Press**, pp. 1–24.

Müller BJ, Westheider A, Birkner K, Seelig B, Kirschnek S, Bogdan C, von Loewenich FD (2021) *Anaplasma phagocytophilum* induces TLR- and MyD88- dependent signaling in in vitro generated murine neutrophils. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 11, 627630.

Okino CH, Giglioti R, Silva PC, Oliveira HN, Oliveira MCS (2018) Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. **Mol. Biol. Rep.** 45 (6), 2671–2680.

Oliveira MCS, Alencar MM, Giglioti R, Beraldo MCD, Aníbal FF, Correia RO, Boschini L, Chagas ACS, Bilhassi TB, Oliveira HN (2013) Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.** 197 (1–2), 168–175.

Palomino DCT, Marti LC (2015) Chemokines and immunity. **Einstein** (São Paulo), 13 (3), 469–473.

Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, Brenner MB (1990) Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. **J.**

Exp. Med. 171 (5), 1597–1612.

Pello OM, Moreno-Ortiz MDC, Rodríguez-Frade JM, Martínez-Muñoz L, Lucas D, Gómez L, Lucas P, Samper E, Aracil M, Martínez-A C, Bernad A, Mellado M (2006) SOCS up-regulation mobilizes autologous stem cells through CXCR4 blockade. **Blood**, 108 (12), 3928–3937.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol. Lett.** 26 (6), 509–515.

Pihur, V., Datta, S., Datta, S., 2007. Weighted rank aggregation of cluster validation measures: a Monte Carlo cross-entropy approach. *Bioinformatics* 23 (13), 1607–1615.

Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA (2014) The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 10 (5), 593–619.

Siberski-Cooper CJ, Mayes MS, Gorden PJ, Kramer L, Bhatia V, Koltjes, JE (2024) The genetic architecture of complete blood counts in lactating Holstein dairy cows. *Front. Genet.* 15, 1360295.

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.

Takeda K, Takeuchi O, Akira S (2002) Recognition of lipopeptides by toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 8 (6), 459–463.

Tucker TR, Aly SS, Maas J, Davy JS, Foley JE (2016) Investigation of anaplasma marginale seroprevalence in a traditionally managed large California beef herd. **Vet. Med. Int.** 2016, 1768624.

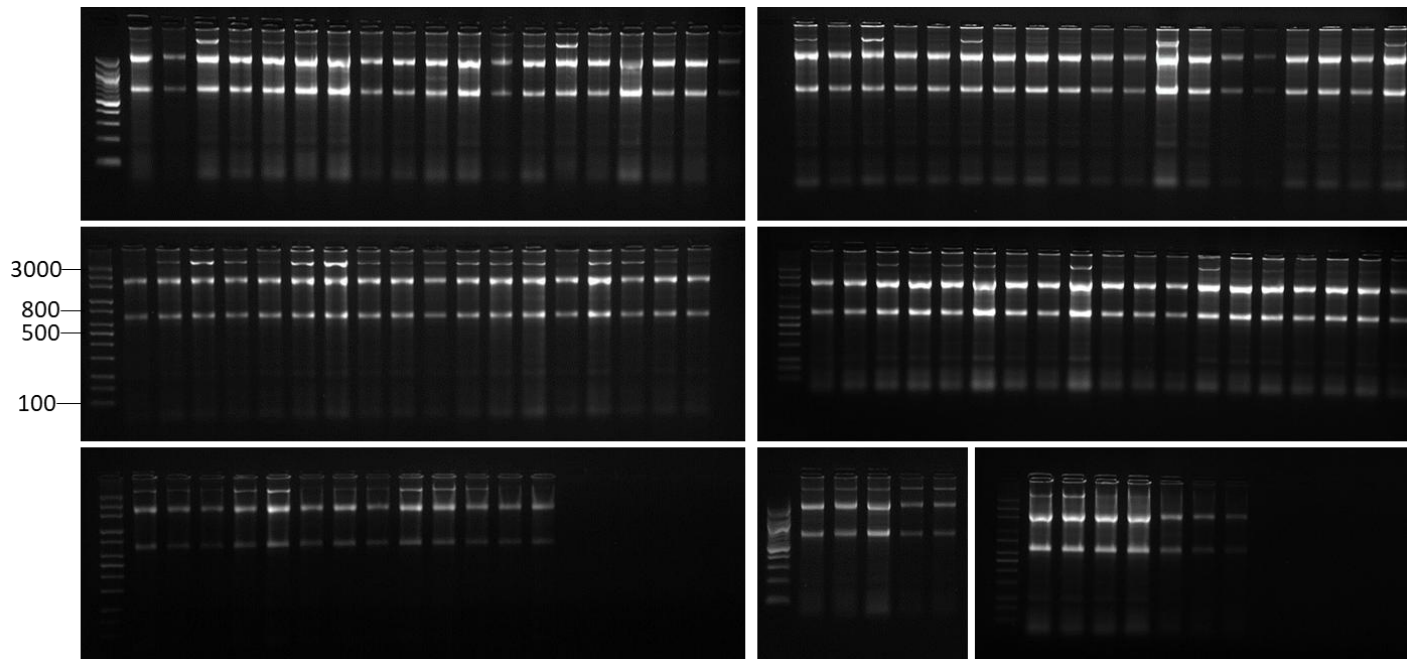
Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3 (7).

Zhang M, Cao TT, Wei ZG, Zhang YQ (2019) Silk sericin hydrolysate is a potential candidate as a serum-substitute in the culture of Chinese hamster ovary and Henrietta lacks cells. *J. Insect Sci.* 19 (1), 10.

Zhao L, Jiang R, Jia N, Ning N, Zheng Y, Huo Q, Cao W (2020) Human case infected with Babesia venatorum: a 5-year follow-up study. **Open Forum Infect. Dis.** 7 (3), ofaa062.

Zygner W, Gójska-Zygner O, Norbury LJ (2023) Pathogenesis of anemia in canine babesiosis: possible contribution of pro-inflammatory cytokines and chemokines - a review. **Pathogens** 12 (2), 166.

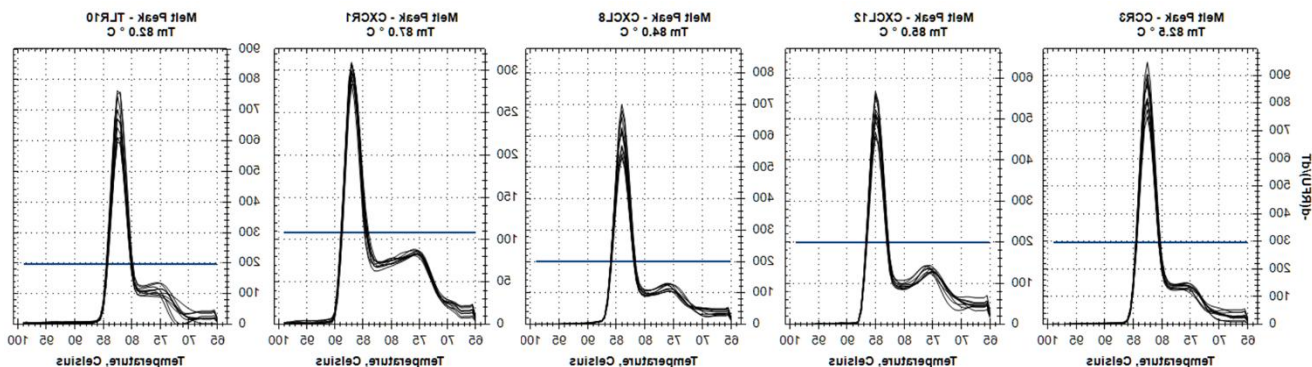
Supplementary information 1. Evaluation of the RNA integrity was performed by gel electrophoresis. All the individual results were presented below (n= 100).



Supplementary information 2. Gene classification based on the stability values and ranking of the three algorithms used and the general rank obtained by RankAggreg.

Gene	BestKeeper (power of the gene)	geNorm (M- value)	Norm-Finder (S- value)	RankAgree
PPIA	0.41 (1)	0.39 (1)	0.45 (2)	2
B2M	0.41 (2)	0.39 (1)	0.42 (1)	1
GAPDH	0.61 (3)	0.97 (4)	0.91 (5)	4
YWHAZ	0.89 (4)	0.75 (2)	0.78 (3)	3
ACTB	0.92 (5)	0.89 (3)	0.83 (4)	5

Supplementary information 3. Melting curves for the target genes (*ccr3*, *cxcl12*, *cxcl8*, *cxcr1*, and *tlr10*) obtained by real-time PCR. Each peak represents the specific dissociation temperature (T_m) of the amplified product, demonstrating amplification specificity. The x-axis indicates temperature ($^{\circ}\text{C}$) while the y-axis shows the negative derivative of fluorescence ($-\text{dF}/\text{dT}$).



Supplementary information 4. Mean DNAlog copy number (lines, left y-axis) and frequency of positives (bars, right y-axis) for *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* across six consecutive evaluations (1st to 6th: 24-Nov-21, 21-Dec-21, 19-Jan-22, 15-Feb-22, 16-Mar-22, 19-Apr-22). Lines represent mean DNAlog copy numbers for each hemoparasite, while bars indicate the corresponding percentage of positive.

