

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

**ESTUDO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR *Babesia bovis* E *Babesia
bigemina* EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM NATURALMENTE
INFESTADOS COM O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

**Talita Barban Bilhassi
Zootecnista**

2016

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

**ESTUDO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR *Babesia* bovis E *Babesia*
bigemina EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM NATURALMENTE
INFESTADOS COM O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Talita Barban Bilhassi

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de
Jaboticabal-SP, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutora em
Genética e Melhoramento Animal**

2016

Bilhassi, Talita Barban
B595e Estudo do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Canchim naturalmente infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Talita Barban Bilhassi. -- Jaboticabal, 2016
xvi, 113 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Henrique Nunes de Oliveira

Co-orientadora: Márcia Cristina de Sena Oliveira

Banca examinadora: Marcos Rogério André, Janete Aparecida Desidério, Wilson Malagó Júnior, Fernanda Aníbal de Freitas

Bibliografia

1. *Babesia bigemina*. 2. *Babesia bovis*. 3. Citocinas. 4. qPCR. 5. RT-qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

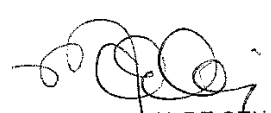
TÍTULO DA TESE: ESTUDO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM NATURALMENTE INFESTADOS COM O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

AUTORA: TALITA BARBAN BILHASSI

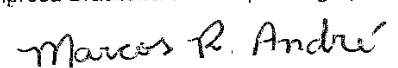
ORIENTADOR: HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA

COORIENTADORA: MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA

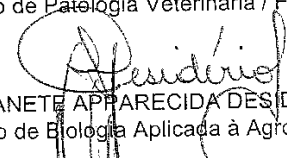
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP



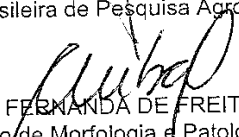
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Analista WILSON MALAGO JUNIOR
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP



Prof. Adjunto FERNANDA DE FREITAS ANIBAL
Departamento de Morfologia e Patologia / UFSCAR / São Carlos/SP

Jaboticabal, 29 de fevereiro de 2016

CEUA - Prot. 03 /2014

Nome do projeto: "Critérios de seleção não convencionais aplicados em raças compostas de gado de corte adaptadas aos trópicos"

PARECER DO RELATOR 1

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: os experimentos previstos no projeto realmente se enquadram no Grau de Invasividade GI1, ou seja, causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse. Serão realizadas coletas mensais de sangue e fezes, contagens mensais de carrapatos e coletas anuais de sêmen. Também ocorrerão medidas de ultrassom transversalmente do músculo *Longissimus dorsi* e abate humanitário em abatedouro credenciado. A frequência das coletas/medidas e a quantidade das amostras é perfeitamente adequada e utilizam técnicas recomendadas cientificamente e comuns a essa área de pesquisa.

Nome: Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Assinatura: Ana Carolina Chagas

Data: 05/12/2014

PARECER DO RELATOR 2

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: Aprovo a realização do projeto, pois considero que ele será executado de maneira a garantir o bem estar animal e evitar o sofrimento (atividades com grau de invasividade 1), utilizando metodologias experimentais adequadas. As atividades experimentais que foram avaliadas por mim e aprovadas referem-se exclusivamente às que serão realizadas nos bovinos da raça Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste em, cerca de, 240 animais/ano nas avaliações ultrassonográficas do músculo *Longissimus dorsi*; 48 animais para avaliação de carne e carcaça após abate; 230 animais/ano para avaliações de temperamento; 50 animais para análises de emissão de metano e eficiência alimentar; 60 touros e tourinhos/ano para avaliações reprodutivas; e 50 animais para contagem de carrapatos, exame de OPG e avaliação de volume globular.

Nome: Dra. Simone Cristina Méo Niciura

Assinatura: Simone Cristina Méo Niciura

Data: 05/12/2014

PARECER DA CEUA da Embrapa Pecuária Sudeste

APROVADO (X) APROVADO COM RESTRIÇÕES () REPROVADO ()

Justificativa: Os estudos atendem aos requisitos de bem estar e de condução ética na experimentação animal. Ficam endossados os pareceres acima.

Nome: Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira

Assinatura da Presidente da Comissão: Márcia Cristina de Sena Oliveira

Data: 05/12/2014



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado: "Critérios de seleção não convencionais aplicados em raças compostas de gado de corte adaptadas aos trópicos" que utiliza bovinos da raça Canchim (*Bos taurus*, *Bos indicus*), sob responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Cíntia Righetti Marcondes, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: "Unconventional selection criteria applied to composite beef cattle adapted to tropics", utilizing Canchim animals of the bovine (*Bos taurus*, *Bos indicus*) species, under the responsibility of the scientific researcher Dra. Cíntia Righetti Marcondes, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 05 de dezembro de 2014.

Dra. Márcia Cristina de Seta Oliveira
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411-56100 - Fax (16) 3361-5754

DADOS CURRILARES DA AUTORA

TALITA BARBAN BILHASSI - Filha de Josoel Antônio Bilhassi e Cláudia Maria Barban Bilhassi, nascida em 7 de maio de 1984, natural de Ribeirão Preto-SP. Zootecnista, graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, em dezembro de 2008. Nos dois últimos anos da graduação, foi estagiária do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) situado na própria cidade universitária, onde desenvolveu seu projeto de Iniciação Científica na área de Produção Animal, sendo bolsista FAPESP durante este período. O estágio de conclusão de curso foi realizado na área de Nutrição de Cães e Gatos, junto à empresa Royal Canin do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Descalvado-SP. Em agosto de 2009, ingressou no curso de Mestrado do programa de Genética e Melhoramento Animal (GMA), da mesma instituição de ensino. Realizou a parte experimental do projeto de Mestrado no Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa de São Carlos-SP. Inicialmente, recebeu apoio financeiro da CAPES e posteriormente, se tornou bolsista FAPESP até a conclusão deste curso. Em setembro de 2011, obteve o título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal. Em março de 2012 ingressou no curso de Doutorado do programa de Genética e Melhoramento Animal (GMA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP. Realizou a parte experimental do projeto de Doutorado na mesma empresa de pesquisa agropecuária, localizada em São Carlos-SP. No início do curso, recebeu apoio financeiro da CAPES e posteriormente, se tornou bolsista FAPESP até a conclusão do Doutorado. Em fevereiro de 2016, obteve o título de Doutora em Genética e Melhoramento Animal.

Aos meus pais amados Josoel Antônio e Cláudia Maria, pelo incentivo nesta longa estrada de minha vida acadêmica. Agradeço por estarem sempre ao meu lado e por sonharem meus sonhos.

As minhas queridas irmãs Tatiana e Taioma, pelo amor, carinho e amizade que nos une.

Ao meu noivo querido Marcelo Rodrigo, que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis, me aconselhando. Agradeço pelo companheirismo, compreensão e paciência.

As minhas sobrinhas amadas Gabrielle, Victória, Isabelle e Danielle, pelos momentos de alegria e ternura.

Ao meu filho do coração, Marcelo Rodrigo Filho com quem aprendi o verdadeiro significado do “amor incondicional”. Juntos, celebramos o sentimento mais puro e verdadeiro que existe, a amizade.

Aos meus “anjos de patas”, Preta, Lathifa, Clara, Beatriz, Flor de Lis e Pérola, pelo “amor eterno”, além do companheirismo e lealdade. Agradeço imensamente pelos momentos de felicidade e descontração ao lado delas, as maiores riquezas da minha vida.

COM TODO MEU AMOR E CARINHO, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Pai Eterno, a Mãe Maria Santíssima e ao meu Anjo de Guarda, por iluminarem meus passos e me fortalecerem nos momentos de angústia.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP e aos docentes do programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, pelo aprendizado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo, na qual permitiu a realização deste projeto de pesquisa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo no início deste curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, por compartilhar todo o seu conhecimento durante o tempo em que fui sua orientada. Agradeço pelas críticas construtivas e inestimável contribuição para o desenvolvimento deste trabalho de tese.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, por quem tenho grande admiração, respeito e exemplo de pesquisadora a ser seguido. Agradeço pelos ensinamentos, amizade e intensa dedicação ao meu trabalho de tese.

Ao coordenador do programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, Prof. Dr. Danísio Prado Munari, pela amizade, compreensão e conselhos sempre que solicitados.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, por participar como membro titular da banca examinadora tanto da qualificação como da defesa. Além da amizade, agradeço pelas sugestões e correções ao meu trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André, por participar como membro titular da banca examinadora tanto da qualificação como da defesa de minha tese de Doutorado.

Ao Dr. Wilson Malagó Júnior, por participar como membro titular da banca examinadora da defesa, além da intensa dedicação ao meu trabalho de tese, o qual forneceu todo o seu conhecimento e sabedoria.

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal, por participar como membro titular da banca examinadora da defesa. Além da amizade agradeço, principalmente, a inestimável contribuição durante as correções do meu trabalho de tese.

À Dra. Adriana Ibelli, pela inestimável contribuição ao meu trabalho de tese. Obrigada pelas sugestões valiosas com relação às análises moleculares.

À Profa. Dra. Luciana Gatto Brito, pelo conhecimento compartilhado e sugestões ao meu trabalho de tese.

Aos pesquisadores, analistas, técnicos dos laboratórios, equipe de campo e colaboradores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa de São Carlos-SP, pelo respeito, carinho, amizade e aprendizado.

Aos amigos do laboratório de Sanidade Animal (LSA), pela convivência agradável, amizade, carinho, respeito e ajuda em todas as etapas deste trabalho de tese.

E de todos os amigos e familiares, que embora distantes, contribuíram de alguma maneira com este trabalho de tese.

A TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADA.

***“Se temos de esperar, que seja para colher a
semente boa que lançamos hoje no solo da vida.
Se for para semear, então que seja para produzir
milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade”***

Cora Coralina

***“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”***

Cora Coralina

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. A Raça Canchim	19
2.1.1 Histórico	19
2.1.2. Formação da raça	20
2.1.3. Utilização da raça Canchim em cruzamentos industriais	23
2.2. As Babesioses Bovinas	25
2.2.1. História	25
2.2.2. Ciclo biológico	26
2.2.3. Sinais clínicos e patogenia	28
2.2.4. Epidemiologia	29
2.2.5. Diagnóstico laboratorial das babesioses bovinas	31
2.2.6. Imunidade dos bovinos às babesioses	35
2.2.7. Citocinas.....	39
2.2.8. Influência da subespécie bovina na resistência ao R. (B.)	41
microplus	41
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. Geral.....	45
3.2. Específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Características da Região de São Carlos-SP e Coleta dos Dados Meteorológicos	46
4.2. Manejo Sanitário e Alimentar dos Animais Experimentais	46
4.3. Pesagem dos Animais, Contagem de Carrapatos e Colheita das	47
Amostras de Sangue para Extração do DNA	47
4.4. Laboratórios	48
4.5. Extração de DNA.....	48
4.6. Avaliação da Qualidade e Concentração das Amostras de DNA Extraídas	49

4.7. Quantificação do DNA de <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> por meio da.....	49
Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	49
4.8. Otimização da qPCR para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	50
4.9. Clonagem dos Produtos Purificados de qPCR para a.....	51
Construção da Curva de Calibração para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	51
4.10. Construção da Curva de Calibração para qPCR de <i>B. bovis</i> e	52
<i>B. bigemina</i>	52
4.11. Determinação do Número de Cópias (NC) dos Fragmentos dos	52
Genes mt-cyt B, Específicos para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	52
4.12. Cálculo de Eficiência (E) da qPCR para a Quantificação de	53
<i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	53
5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	55
5.1. Escolha de Animais Resistentes e Suscetíveis	55
5.2. Colheita de Amostras de Sangue para Extração de RNA	55
5.3. Extração de RNA.....	55
5.4. Avaliação da Concentração, Qualidade e Integridade das Amostras de RNA Total.....	57
5.5. Síntese de cDNA.....	57
5.6. Genes Alvos Para Análise de Expressão Gênica.....	58
5.7. Otimização da RT-qPCR para os Genes Alvos e de Referência.....	59
para Análise de Expressão Gênica	59
5.8. Escolha dos Genes de Referência	60
5.9. Avaliação da Eficiência (E) dos Genes de Referência e Genes.....	61
Alvos	61
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	63
6.1. Quantificação Relativa da Análise de Expressão Gênica pela RT-qPCR	63
7. RESULTADOS.....	65
7.1. Análise do DNA	65
7.1.1. Avaliação da concentração e pureza das amostras de DNA.....	65
7.1.3. Sensibilidade de quantificação de <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> pela qPCR	70
7.1.4. Quantificação absoluta de <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> e contagem de R. (B.) microplus nos animais experimentais.....	70
7.1.5. Estimativa do coeficiente de correlação entre o número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos de <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> e entre as contagens de R. (B.) microplus com o número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies... 73	73

7.2. Influência das Condições Climáticas na Infestação por R. (B.) microplus	74
7.3. Análise de Expressão Gênica	77
7.3.1. Avaliação das amostras de RNA total	77
expressão dos genes alvos	79
7.3.3. Análise de expressão gênica pela RT-qPCR	80
8. DISCUSSÃO	83
9. CONCLUSÕES.....	99
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Esquema de cruzamentos alternados avaliados para a formação da raça Canchim	22
Tabela 2. Avaliação da concentração e pureza das amostras de sangue avaliadas em Nano-Drop ND-1000, de acordo com as colheitas realizadas....	65
Tabela 3. Porcentagem de animais considerados negativos pela técnica de qPCR separados de acordo com a colheita, espécie e número total de amostras avaliadas por colheita.....	66
Tabela 4. Valores da eficiência da reação (E), <i>slope</i> e coeficiente de determinação (r^2) para cada placa analisada no experimento por qPCR.....	69
Tabela 5. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B de <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> e da contagem de <i>R. (B.) microplus</i> de acordo com a estação do ano, considerando os respectivos desvio-padrão.....	73
Tabela 6. Correlação estimada entre o NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> e entre a contagem de <i>R. (B.) microplus</i> com o NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies, durante as estações do ano.....	74
Tabela 7. Avaliação em Nano-Drop ND-1000 das amostras purificadas de RNA total dos animais dos extremos de resistência e suscetibilidade, realizadas nas diferentes estações do ano.....	78
Tabela 8. Classificação dos genes de referência de acordo com a ordem de <i>ranking</i> determinada pela ferramenta RefFinder.....	79

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Data das colheitas realizadas na Fazenda Canchim, São Carlos-SP, conforme a estação do ano	47
Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para a quantificação do DNA de <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> e o tamanho dos produtos de amplificação.	50
Quadro 3. Perfil térmico adotado na qPCR para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	50
Quadro 4. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR para análise dos genes alvos, tamanho dos produtos de amplificação e, as respectivas localizações nos genes	59
Quadro 5. Perfil térmico adotado na RT-qPCR para análise de expressão gênica.....	60
Quadro 6. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR para análise dos genes referência, tamanho dos produtos de amplificação e, as respectivas localizações nos genes.	61
Quadro 7. Valores de eficiência da reação (E) da RT-qPCR para os genes de referência e genes alvos avaliados no estudo de expressão gênica.....	80

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) para <i>B. bovis</i> obtida pela qPCR.....	67
Figura 2. Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) para <i>B. bigemina</i> obtida pela qPCR	67
Figura 3. Distribuição das médias do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> e contagem de <i>R. (B.) microplus</i> durante os meses (estação/ano) das avaliações.....	71
Figura 4. Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm) em São Carlos-SP.....	75
Figura 5. Distribuição da contagem de <i>R. (B.) microplus</i> e precipitação pluviométrica (mm) durante os meses (estação/ano) das avaliações.....	76
Figura 6. Distribuição das contagens de <i>R. (B.) microplus</i> e umidade (%) durante os meses (estação/ano) das avaliações.....	77
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras de RNA total, referente às colheitas realizadas no verão e outono de 2015, visualizadas em transiluminador.....	78
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras de RNA total, referente às colheitas realizadas no inverno e primavera de 2015 visualizadas, em transiluminador.....	79
Figura 9. Estabilidade dos genes de referência avaliados no estudo de expressão gênica, seguido dos valores das médias geométricas para YWAHZ, GAPDH e β -Actina.....	80
Figura 10. Perfil de citocinas avaliadas no estudo de expressão gênica: IL-10 (a), IL-12B (b), IFN- γ (c) e TNF- α (d), de acordo com a estação do ano, e grupos de animais classificados como resistentes e suscetíveis as babesioses bovinas.....	82

ESTUDO DO NÍVEL DE INFECÇÃO POR *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM NATURALMENTE INFESTADOS COM O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

RESUMO - Entre as principais causas de perdas produtivas em bovinos criados nos trópicos está a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e, conseqüentemente, dos hemoparasitas transmitidos por ele. A resistência dos zebuínos e de animais cruzados com raças taurinas à infestação por esse ácaro é amplamente conhecida. Entretanto, no que se refere à suscetibilidade às babesioses bovinas, existem evidências de que o grupo genético também pode interferir na resistência, seguindo o mesmo padrão observado para o carrapato vetor, com os taurinos apresentando maior sensibilidade. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a parasitemia por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em 50 novilhas da raça Canchim (5% Charolês + 3% Zebu) naturalmente infestadas pelo *R. (B.) microplus* nas quatro estações do ano durante 24 meses, além de caracterizar o perfil de citocinas que podem estar associados ao fenótipo de resistência e suscetibilidade aos hemoparasitas do gênero *Babesia* spp. Foram realizadas contagens de fêmeas adultas de carrapatos com tamanho igual ou superior a 4,5 mm de diâmetro, presentes no lado esquerdo de cada bovino. As amostras de DNA extraídas foram submetidas à amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), utilizando iniciadores que flanqueiam fragmentos dos genes mitocondriais do citocromo b (mt-cyt B), específicos para *B. bovis* e *B. bigemina*. O RNA extraído do sangue, foi usado para sintetizar o DNA complementar (cDNA) para análise de expressão dos genes do IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12B por meio da quantificação relativa (RT-qPCR). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os meses das avaliações para a contagem de carrapatos. Entretanto, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) nas colheitas realizadas entre novembro de 2013 a janeiro de 2014 e entre os meses janeiro e fevereiro de 2015. A frequência da parasitemia no rebanho foi de 98%. Dentre as amostras de DNA que puderam ser quantificadas pela qPCR, 98% e 95,4% foram positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Com relação ao número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) para ambas as espécies e interação das mesmas com as colheitas realizadas nas diferentes estações do ano. A análise do nível de expressão de mRNA do IFN- γ , TNF- α e IL-12B revelou que houve um efeito significativo ($P < 0,05$) da interação entre animais dos extremos de resistência/suscetibilidade e estações do ano, exceto para IL-10. Conclui-se que, a qPCR apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das babesioses bovinas em amostras de sangue e que a oscilação na carga parasitária nas diferentes estações do ano pode estar associada com o perfil de expressão de citocinas apresentada pelos animais do rebanho Canchim durante o período experimental.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, citocinas, qPCR, RT-qPCR

**STUDY BY INFECTION LEVEL *Babesia bovis* AND *Babesia bigemina* IN
CATTLE BREED CANCHIM NATURALLY INFESTED WITH TICK
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

ABSTRACT - Among the main causes of production losses in cattle is in the tropics infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, and consequently the hemoparasites transmitted by it. The resistance of zebu and crossbred with European breeds to infestation by this mite is widely known. However, as regards susceptibility to bovine babesiosis, there is evidence that genetic group can also interfere in resistance following the same pattern observed in the tick vector, with the taurine presenting greater sensitivity. This study aimed to evaluate parasitaemia by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in 50 heifers Canchim (5% Charolais + 3% Zebu) naturally infested by *R. (B.) microplus* in four seasons for 24 months, and characterize the profile of cytokines that may be associated with phenotype resistance and susceptibility by gender hemoparasites *Babesia* spp. Adult female ticks counts with size equal to or greater than 4.5 mm in diameter, present in the left side of each calf were performed. The extracted DNA samples were subjected to amplification by Reaction Polymerase Chain Quantitative Real Time (qPCR), using primers flanking fragments of mitochondrial gene cytochrome B (mt-cyt B) specific for *B. bovis* and *B. bigemina*. The RNA extracted from the blood was used to synthesize complementary DNA (cDNA) for expression analysis of genes IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-12B by relative quantification (RT-qPCR). Significant differences were observed ($P < 0.05$) between the months of reviews for the tick count. However, there was no significant effect ($P > 0.05$) in samples taken between november 2013 and january 2014 and between the months january and february 2015. The frequency of parasitaemia in the herd was 98%. Among the samples of DNA that could be quantified by qPCR, 98% and 95.4% were positive for *B. bovis* and *B. bigemina*, respectively. Regarding the number of copies (NC) of fragments of genes mt-cyt B, specific to *B. bovis* and *B. bigemina* significant effects were observed ($P < 0.05$) for both species and interaction between those harvests in different seasons. Analysis of the mRNA expression level of IFN- γ , TNF- α and IL-12B showed that there was a significant effect ($P < 0.05$) interaction between the animal extreme resistance/susceptibility and seasons, except for IL-10. It is concluded that the qPCR has high sensitivity and specificity for the diagnosis of bovine babesiosis in blood samples and that the fluctuation in the parasitic load in the different seasons of the year may be associated with the profile of cytokine expression presented by herd animals Canchim during the experimental period.

KEYWORDS: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, cytokines, qPCR, RT-qPCR

1. INTRODUÇÃO

A eficiência produtiva da atividade pecuária é dependente de vários fatores, dentre os quais a capacidade de adaptação às condições adversas do ambiente e a constituição genética da população são de extrema importância.

A utilização de animais de elevado mérito genético consiste em uma das estratégias utilizada pelos criadores para elevar a produtividade, a rentabilidade e a sustentabilidade da indústria pecuária, a qual tem aumentado nos últimos anos no Brasil.

Entre os fatores ambientais, as infestações pelo carrapato *R. (B.) microplus* e as infecções por hemoparasitas do gênero *Babesia* spp. se destacam como aqueles que mais afetam a produção animal nos trópicos. *R. (B.) microplus* encontra-se amplamente disseminado, estando quase todo o território brasileiro inserido em sua área de distribuição. Este carrapato é o único vetor biológico conhecido da *B. bovis* e *B. bigemina* no país, as quais provocam reduções drásticas na produtividade dos rebanhos mesmo que não se considere os gastos com acaricidas. Estima-se, que as perdas econômicas devido ao *R. (B.) microplus*, relativa à redução da produção de leite e da carne bovina no Brasil ultrapassem a ordem de US\$ 3 milhões (GRISI et al., 2014).

Nos bovinos, as babesias se multiplicam exclusivamente no interior dos eritrócitos sanguíneos de bovinos infectados, sendo estes, os principais hospedeiros vertebrados. Os animais apresentam sinais clínicos de hemólise intravascular com anemia, icterícia, hemoglobinúria, hipertermia, prostração e perda de peso gradativa. Entretanto, a gravidade da parasitemia está intimamente relacionada à virulência dos isolados geográficos de *B. bovis* e *B. bigemina*, estado imune dos animais, nível de desafio pelos carrapatos, estresse (TAYLOR et al. 2010), grupo genético e categoria animal (ALONSO et al., 1992).

As babesioses bovinas são controladas nos rebanhos por meio do combate ao vetor da doença, ou seja, *R. (B.) microplus*. Sabe-se que o uso indiscriminado de carrapaticidas pelos criadores como ferramenta exclusiva de controle, tem impulsionado a resistência de populações de carrapatos aos principais pesticidas químicos utilizados, reduzindo sua eficácia. Este fato acarreta um enorme impacto sobre a indústria pecuária devido à presença de

resíduos na carne e no leite, o que inviabiliza a comercialização dos produtos de origem animal, incluindo a contaminação do ambiente. Além disso, vacinas eficazes contra os carrapatos e babesias não estão ainda disponíveis no mercado. No entanto, tem sido sugerido que as respostas imunológicas dos bovinos a diversas infecções parasitárias são determinadas pelo padrão de resposta das células Th1 e Th2, as quais são responsáveis pela síntese de citocinas específicas que podem influenciar na resistência e suscetibilidade dos animais aos parasitas.

Tradicionalmente, o diagnóstico da parasitemia é realizado por meio do exame microscópico de esfregaços sanguíneos colhidos de vasos periféricos, sendo considerada uma técnica de baixo custo, porém de baixa sensibilidade. Os métodos indiretos de diagnóstico consistem nos testes sorológicos, tais como o de aglutinação rápida, o de imunofluorescência indireta (RIFI) e, o ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), os quais permitem a detecção de anticorpos contra os hemoparasitas. Com o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), baseada na quantificação do DNA do parasita em amostras de sangue de bovinos infectados permitiu, além de diagnosticar, estimar o nível de parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina*, sendo de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (KE et al., 2006). Acrescenta-se às vantagens, a possibilidade de avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, por meio da quantificação da expressão de mRNA (RT-qPCR).

Mediante as perdas econômicas e a limitação no controle do *R. (B.) microplus* e dos hemoparasitas do gênero *Babesia* spp., a aplicação de novas abordagens se faz necessária. Para tanto, a caracterização dos mecanismos imunológicos relacionados à resistência e a suscetibilidade dos bovinos às enfermidades parasitárias, bem como a identificação e seleção de animais naturalmente resistentes são essenciais para o avanço na produção de carne. Como existem evidências da ocorrência de animais e grupos genéticos resistentes às babesias e aos carrapatos, o melhoramento genético poderia ser utilizado como uma ferramenta alternativa para o controle desses parasitas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Raça Canchim

2.1.1 Histórico

Na região dos trópicos, animais provenientes da subespécie *Bos taurus indicus* tem servido como alicerce na formação de novas raças, devido a sua grande rusticidade e capacidade de aclimação no ambiente em que são manejados.

Segundo Alencar (1988), o cruzamento entre raças consiste em uma das ferramentas do melhoramento genético mais utilizadas, a qual possibilita elevar a produtividade dos rebanhos devido aos efeitos da heterose e seleção de vantagens individuais de cada grupo genético para a produção de gado comercial, além da formação de novas raças.

Assim, várias raças foram desenvolvidas, como por exemplo, a Santa Gertrudis no Texas (EUA) proveniente do cruzamento entre rebanhos de origem zebuína (Brahma) e européia (Shortorn), cuja contribuição foi bastante significativa para a pecuária de corte dos Estados Unidos. Na Jamaica, a formação do Jamaica Hope, originado pelo cruzamento do gado zebuino com animais da raça Jersey, trouxe grandes benefícios à pecuária leiteira da América Central, devido a sua adaptabilidade aos trópicos (MOTTA, 1981).

Apesar da rusticidade e simplicidade de manejo, o gado zebuino é inferior aos animais da subespécie *Bos taurus taurus* quanto ao desenvolvimento, precocidade sexual e de terminação, rendimento de carcaça e qualidade de carne. Por outro lado, os taurinos embora altamente produtivos em regiões de clima temperado, não expressam todo o seu potencial genético quando manejados em países de clima tropical, uma vez que a baixa qualidade nutricional das forragens, a alta suscetibilidade às enfermidades parasitárias, atreladas às dificuldades em se adaptar ao ambiente, limitam a sua produtividade.

Além disso, o complexo carrapato-tristeza parasitária no Brasil é considerado um fator limitante para o aumento da produtividade dos rebanhos de corte que poderia ser obtido por meio da criação do gado taurino. Como a

resistência dos bovinos zebuínos aos carrapatos é amplamente conhecida (OLIVEIRA et al., 1989; JONSSON et al., 2000), a grande maioria dos pecuaristas optam por criar esses animais, ainda que sejam considerados potencialmente menos produtivos que os de origem européia.

Quanto à suscetibilidade às babesioses bovinas, há evidências de que o grupo genético também interfira na parasitemia por *Babesia* spp., de acordo com o mesmo padrão observado para a infestação pelo *R. (B.) microplus* (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997, 1999; JONSSON et al., 2000).

Esta enfermidade parasitária é responsável por sérios prejuízos à indústria pecuária mundial (BOCK et al., 2004). As perdas são decorrentes do menor ganho de peso e conversão alimentar dos animais infectados, redução na produção de leite, baixa eficiência reprodutiva de touros e matrizes, além de ser responsável pela elevada taxa de mortalidade em rebanhos suscetíveis (ANTONIASSI et al., 2009).

Neste contexto, o Brasil buscou alternativas para melhorar geneticamente a população bovina, visando abastecer de forma sustentável a crescente demanda do mercado por alimentos de origem animal. Com a finalidade de se obter animais que incorporassem a rusticidade do gado zebuíno, somado às características produtivas e reprodutivas dos bovinos de origem européia, a raça sintética Canchim (5% Charolês + 3% Zebu) foi desenvolvida e introduzida no rebanho nacional (VIANNA et al., 1978).

Contudo, os cruzamentos entre *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* têm possibilitado elevar a eficiência produtiva da atividade pecuária, por meio da complementaridade entre raças.

2.1.2. Formação da raça

A raça européia utilizada para a formação do Canchim foi a Charolês. De acordo com Vianna et al. (1978), o gado Charolês (*Bos taurus taurus*) foi escolhido pelo seu elevado rendimento, além de ser a única dentre as raças taurinas especializadas para corte, a que mais se aclimatou ao ambiente tropical do Brasil Central, desde a importação do rebanho em 1922 pelo Ministério da Agricultura. Nesta época os animais foram confinados em Urutaí-GO, onde permaneceram até 1936, quando foram transferidos para a extinta

Unidade de Pesquisa de Âmbito Estadual de São Carlos (UEPAE), atual Embrapa Pecuária Sudeste, de onde saíram os primeiros reprodutores da raça utilizados nos programas de cruzamentos.

A raça Charolês foi desenvolvida no século XVIII, sendo originária das províncias Francesas de Charolais e Brionais, Departamento de Saône-et-Loire, no Distrito de Charolles. Apresenta boa conversão alimentar, ótimo ganho de peso e rendimento de carcaça, produzindo carne de excelente qualidade, devido à elevada proporção de gordura de marmoreio, embora seus depósitos superficiais de gordura sejam escassos. A raça apresenta também elevada capacidade de adaptação em qualquer ambiente na qual é criada e versatilidade em termos de alimentação, manejo de campo e cruzamentos com bovinos de outros grupos genéticos. As avaliações genéticas e melhoramento da raça realizados ao longo dos anos permitiram que o Charolês atual fornecesse genética de altíssima qualidade para características de interesse econômico bastante procurado pelos pecuaristas, o que justifica a utilização desta raça nos programas de cruzamentos.

As raças zebuínas utilizadas na formação do Canchim foram a Indubrasil, Guzerá e Nelore. No entanto, a Indubrasil foi a mais usada, devido à facilidade de aquisição (VIANNA, 1949-1950). Atualmente, a raça Nelore é a que mais contribui para a formação do gado Canchim.

Em 1940, iniciaram-se os trabalhos de cruzamentos pelo Médico Veterinário e Zootecnista Dr. Antônio Teixeira Vianna, que resultaram na reconhecida raça Canchim, na fazenda experimental em São Carlos-SP. Os diferentes graus de mestiçagem entre bovinos Charolês e Zebu foram avaliados durante muitos anos de pesquisa, objetivando definir o melhor esquema de acasalamento para a formação da raça: de um lado, mestiços $\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu (esquema I) e, de outro, animais $\frac{3}{8}$ Charolês + $\frac{5}{8}$ Zebu (esquema II), como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de cruzamentos alternados avaliados para a formação da raça Canchim.

ESQUEMA I		ESQUEMA II	
TOURO	VACA	TOURO	VACA
Charolês	Zebu	Charolês	Zebu
Zebu	$\frac{1}{2}$ Charolês + $\frac{1}{2}$ Zebu	Charolês	$\frac{1}{2}$ Charolês + $\frac{1}{2}$ Zebu
Charolês	$\frac{1}{4}$ Charolês + $\frac{3}{4}$ Zebu	Zebu	$\frac{3}{4}$ Charolês + $\frac{1}{4}$ Zebu
$\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu	$\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu	$\frac{3}{8}$ Charolês + $\frac{5}{8}$ Zebu	$\frac{3}{8}$ Charolês + $\frac{5}{8}$ Zebu
	$\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu (Canchim)		$\frac{3}{8}$ Charolês + $\frac{5}{8}$ Zebu

De acordo com Vianna et al. (1978), o esquema de cruzamento ideal seria aquele que resultasse em bovinos altamente produtivos, precoces, com ótima conformação para corte, elevada rusticidade e que apresentasse uniformidade de pelagem. Devido ao melhor desempenho, o esquema I de acasalamento (alternado) foi escolhido pela maior uniformidade e produtividade dos bimestiços, sendo que os primeiros exemplares da raça nasceram em 1953. O nome Canchim foi dado em homenagem à espécie de uma árvore comum na região de São Carlos-SP, onde as pesquisas para a formação da raça se desenvolveram (ALENCAR et al., 1981).

A pesquisa contou inicialmente com 53 touros da raça Charolêsa, 8 Indubrasil, 4 Guzerá e 127 vacas Indubrasil, 9 Guzerá e 9 Nelore para a formação do rebanho bimestiço ($\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu) (ALENCAR et al., 1981). Hoje, a raça Nelore, maioria absoluta do rebanho de corte brasileiro, domina totalmente como raça zebuína na formação do Canchim. No que se refere à raça taurina, vários criadores tem optado pelo Charolês americano, que, embora de porte menor do que o europeu, é mais rústico e fértil, além de ser mais adaptado ao regime exclusivo de pasto.

Em Novembro de 1971 foi criada a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Canchim (ABCBCAN), hoje Associação Brasileira de Criadores de Canchim (ABCCAN), com sede no Parque Fernando Costa em São Paulo-SP.

Após obtenção dos dados zootécnicos da raça Canchim, vários criadores iniciaram a formação dos seus próprios rebanhos. Atualmente,

existem plantéis com constituição genética distinta, o que possibilita uma maior variabilidade genética da raça. Adicionalmente, os criadores dedicados a esta raça estão distribuídos de Norte a Sul do Brasil, mostrando que, além de ser uma grande produtora de carne, o Canchim possui o diferencial de ser adaptado às diversas condições de manejo e de ambiente.

A ABCCAN admite, no entanto, três métodos de cruzamentos para obtenção do gado Canchim, sendo estes aprovados pelo Ministério da Agricultura: I Alternado, II Absorvente e III Cruzado e Absorvente. De acordo com Alencar (1988), os três sistemas produzem bovinos com proporção genética semelhantes, contudo, a pressão de seleção exercida nos cruzamentos é o mais importante, na qual a utilização de animais de elevado mérito genético deve ser empregada para obtenção do Canchim.

2.1.3. Utilização da raça Canchim em cruzamentos industriais

A pecuária de corte brasileira é um dos principais destaques no agronegócio mundial. O Brasil detém o título de segundo maior produtor de carne bovina, na qual os Estados Unidos é o líder no ranking (LIVESTOCK, 2013).

O país possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, possuindo o maior plantel comercial, com aproximadamente 211,28 milhões de cabeças de gado, seguido da China, Estados Unidos e União Européia, perdendo apenas para a Índia (LIVESTOCK, 2013).

Tendo em vista a importância econômica e social da atividade pecuária no cenário nacional e internacional, o cruzamento industrial constitui-se em uma ferramenta indispensável aos criadores, que visam, principalmente, a lucratividade e agilidade no retorno financeiro. Esta ferramenta, realizada entre animais de grupos genéticos diferentes, tem a finalidade de elevar a produtividade dos rebanhos, devido aos efeitos da heterose.

Como o rebanho de corte brasileiro é composto em sua maioria por matrizes Nelores ou Aneloradas, a utilização do touro e/ou sêmen Canchim no cruzamento industrial é uma boa opção para os pecuaristas de corte. Além disso, os avanços nos últimos anos dos programas de Inseminação Artificial (IA), principalmente da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF),

impulsionaram a utilização desta ferramenta no rebanho bovino brasileiro (ABCCAN, 2015).

Neste contexto, o Canchim tem sido largamente utilizado no cruzamento industrial, pois foi desenvolvido exclusivamente para produção de carne, em condições naturais dos trópicos. Assim, esta raça conseguiu reunir em sua constituição biológica algumas qualidades de rusticidade e versatilidade do Zebu, com as características de precocidade em termos de ganho de peso, fertilidade, maturidade sexual, acabamento de carcaça e qualidade de carne do gado europeu.

Pode-se salientar que existem na literatura diversos trabalhos de pesquisa que permitem avaliar o desempenho de bovinos cruzados $\frac{1}{2}$ Canchim + $\frac{1}{2}$ Nelore, com relação às características produtivas e reprodutivas. Estudos realizados por Barbosa e Silveira (1979), Alencar et al. (1992), Alencar et al. (1995a), Alencar et al. (1997) mostram a superioridade dos animais cruzados Canchim x Nelore em relação aos animais puros Nelores para características de peso.

Alencar (1995b) estudou a habilidade materna de fêmeas cruzadas Canchim x Nelore e verificou que elas produzem quantidade suficiente de leite, desmamando bezerros bem desenvolvidos, além de apresentarem boa eficiência reprodutiva, podendo ser utilizadas como matrizes em sistemas de cruzamentos.

Em experimentos realizados por Luchiari Filho et al. (1989), Esteves et al. (1993), Cruz et al. (1996), com a finalidade de avaliar as características de carcaça, os pesquisadores observaram que animais cruzados $\frac{1}{2}$ Canchim + $\frac{1}{2}$ Nelore apresentaram carcaças de excelente qualidade.

Quanto à resistência do Canchim e de seus cruzamentos aos parasitas e enfermidades parasitárias, pouco é conhecido. Contudo, admite-se que o Canchim esteja adaptado a qualquer região do Brasil, por apresentar índices produtivos satisfatórios. De acordo com dados da literatura (OLIVEIRA e ALENCAR., 1989; OLIVEIRA et al., 1987), a raça Canchim apresenta média resistência à infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Com relação à babesiose bovina, Oliveira et al. (2008), utilizando a técnica qualitativa de Nested PCR (nPCR), não encontraram diferenças significativas entre as taxas de infecção por *B. bigemina* observadas em animais mestiços Canchim x

Nelore, Angus x Nelore, e Simental x Nelore, sugerindo, portanto, sua utilização em algum tipo de sistema de acasalamentos.

2.2. As Babesioses Bovinas

2.2.1. História

As babesioses bovinas constituem-se em um dos mais graves problemas sanitários da pecuária brasileira, sendo enfermidades transmitidas pelo carrapato *R. (B.) microplus*. *B. bovis* e *B. bigemina* ocorrem em regiões geográficas situadas entre os paralelos 40° N e 32° S, favoráveis ao desenvolvimento do carrapato vetor (McCOSKER, 1981), tendo o bovino como o principal hospedeiro vertebrado (BOCK et al., 2004).

As babesias são protozoários que parasitam obrigatoriamente as células vermelhas do sangue dos animais. Pertencem ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmida, família Babesiidae e ao gênero *Babesia* spp. (LEVINE, 1971).

A ocorrência de hemoparasitas do gênero *Babesia* spp. no sangue de bovinos e ovinos foi descrita, primariamente, por Babes em 1888 e 1892 e sua equipe de pesquisadores na Romênia. Foram Smith e Kilborne (1893) que observaram que estes protozoários eram também os responsáveis pela “Febre do Texas” no Sul dos Estados Unidos. As perdas ocasionadas por esta doença levaram ao desenvolvimento de pesquisas que culminaram com a descoberta do envolvimento do carrapato presente na América do Norte, o *Boophilus annulatus* na transmissão destes protozoários. Esta descoberta possibilitou a erradicação da babesiose bovina nos Estados Unidos, a partir da erradicação do vetor da doença, o *Boophilus annulatus* (KREIER, 1977).

Posteriormente, Starcovici (1893), analisando as semelhanças entre os micro-organismos descritos por Babes em 1888 (*Haematococcus bovis*) e por Smith e Kilborne em 1893 (*Pyrosoma bigeminum*) propôs a inclusão de ambos, em um novo gênero denominado de *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno Victor Babes (UILENBERG, 2006).

Contudo, as babesias foram descobertas em vários países do mundo, após a publicação destes trabalhos de pesquisas (BOCK et al., 2004). O pioneiro na descrição da ocorrência das babesioses bovinas no Brasil foi

Francisco Fajardo, que em 1901 encontrou os hemoparasitas em esfregaços sanguíneos de animais importados, com auxílio de microscópio de luz (FONSECA e BRAGA, 1924). A erradicação do carrapato no país, no entanto, não é uma alternativa viável e desse modo, o conhecimento da relação parasita hospedeiro e o conhecimento da epidemiologia da doença torna-se primordial para que novas técnicas de controle possam ser desenvolvidas. Acrescenta-se a isso, o fato de que a imunidade dos animais contra os agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é mantida, mediante a presença do carrapato vetor no rebanho (SAUERESSIG, 2006).

2.2.2. Ciclo biológico

As babesias são hemoparasitas heteroxenos, portanto precisam de dois hospedeiros, um invertebrado (carrapato) e outro vertebrado (bovino), para completar o seu ciclo evolutivo, servindo este último, como reservatório da doença devido à manutenção da parasitemia. Os diversos ínstares do *R. (B.) microplus* infectado por *Babesia* spp. são responsáveis pela inoculação dos esporozoítas (formas infectantes presentes nas glândulas salivares dos carrapatos) durante o repasto sanguíneo (UILENBERG, 2006; RADOSTITS et al., 2008). Assim, a inoculação de *B. bovis* é realizada somente pelas larvas do *R. (B.) microplus* (MAHONEY; MIRRE, 1974), enquanto que a *B. bigemina* é inoculada tanto pelas ninfas, como pelos adultos deste artrópode (CALLOW; HOYTE, 1961).

No interior das hemácias do bovino, as formas infectantes permanecem em contato direto com o conteúdo citoplasmático, alimentam-se e desenvolvem-se rapidamente, sendo denominados trofozoítas. Posteriormente, estas formas evolutivas se multiplicam assexuadamente por divisão binária, originando os merozoítas, que rompem os eritrócitos, possibilitando que outras células íntegras do hospedeiro vertebrado sejam parasitadas, dando continuidade ao ciclo biológico (QUINTÃO-SILVA et al., 2003).

De acordo com Kakoma e Melhorn (1994), a penetração das babesias no interior das hemácias é um processo ativo, que envolve cinco fases distintas: contato entre os eritrócitos sanguíneos e os esporozoítas; orientação do complexo apical na direção das células parasitadas; fusão entre as membranas do eritrócito e do protozoário; liberação do conteúdo das roptrias

(organela responsável pela invasão do eritrócito); e formação do vacúolo parasitóforo. A desintegração do vacúolo promove a liberação dos trofozoítos, que após se alimentarem, sofrem divisão binária, produzindo dois merozoítas, que invadem outros eritrócitos dando continuidade à multiplicação dos agentes da doença. O desenvolvimento do ciclo assexuado persiste no bovino até que ocorra a sua morte ou a eliminação dos hemoparasitas pelo sistema imune (HODGSON, 1992).

No hospedeiro invertebrado, a infecção por *Babesia* spp. pode ocorrer por duas vias diferentes: a alimentar devido a ingestão de sangue infectado com merozoítas de babesias pelas fêmeas maduras do carrapato e a vertical por meio da transmissão transovariana acarretando na infecção da progênie destas teleóginas (HODGSON, 1992).

A infecção das fêmeas maduras ocorre nas últimas horas da fase de vida parasitária sobre o bovino (MELHORN; SCHEIN, 1984). No intestino do *R. (B.) microplus*, ocorre o ciclo sexuado das babesias, do qual os merozoítas intraeritrocitários sofrem alterações morfológicas adquirindo forma de estrela. Posteriormente, estes corpúsculos deixam as hemácias parasitadas, dando origem aos agregados multinucleados. Estes, por sua vez, se desfazem, promovendo a liberação de corpos estrelados isolados que são os gametas. Por meio de projeções citoplasmáticas, os gametas se fundem, originando os zigotos ou oocinetos de menor tamanho, que penetram nas células digestivas do carrapato e se multiplicam para invadir células vitelogênicas. Nestas células, os zigotos se multiplicam por sucessivos ciclos de fissão múltipla, ou esporogonia, promovendo o rompimento das células e originando os esporocinetos, ou vermículos de maior tamanho, que são liberados na hemolinfa (MELHORN; SCHEIN, 1984).

Na hemolinfa, os esporocinetos se disseminam em diversos órgãos, inclusive nos ovários da teleógina, onde sofrem novos ciclos de esporogonia. Segundo Hodgson (1992), os sucessivos ciclos de esporogonia persistem até a morte da teleógina, após a postura dos ovos.

A disseminação de esporocinetos nas células ovarianas infecta os ovos, embriões e vários órgãos dos estágios de desenvolvimento da progênie da teleógina, devido aos sucessivos ciclos de fissão múltipla, estabelecendo desta maneira, a transmissão transovariana das babesias. De acordo com Riek

(1964), esta via de transmissão no hospedeiro invertebrado é essencial para manutenção da endemia nos rebanhos bovinos.

As formas infectantes (esporozoítas) de *B. bovis* estarão presentes nas glândulas salivares cerca de dois a três dias, após a fixação das larvas do carrapato no bovino, enquanto que a *B. bigemina* será inoculada após nove dias da fixação das ninfas e estágios adultos deste ácaro, finalizando assim o ciclo de esporogonia (RIEK, 1964, 1966; RADOSTITS et al., 2008).

2.2.3. Sinais clínicos e patogenicia

Bovinos infectados por *Babesia* spp. podem apresentar hipertermia, anemia severa e hemoglobinúria como sinais clínicos da doença. Como consequência, se tornam anoréxicos, desidratados, icterícos e possuem a pelagem áspera.

Geralmente, a *B. bovis* é considerada a mais patogênica dentre as espécies que infectam bovinos (TAYLOR et al., 2010), sendo que a patogenicidade pode ainda variar de acordo com a amostra e tamanho do inóculo (FARIAS, 1995). Além disso, este hemoparasita possui predileção por capilares viscerais, ocasionando a obstrução do fluxo sanguíneo para órgãos vitais, tais como rins e cérebro (WRIGHT et al., 1989). Desta maneira, a anóxia nos órgãos ocorre com frequência. A sintomatologia nervosa é característica de animais infectados por *B. bovis*, podendo levá-los à morte em poucos dias. Quadros de incoordenação motora, agressividade, excitação, convulsões e depressão são, na maioria dos casos, fatais (TAYLOR et al., 2010).

Bovinos infectados por *B. bigemina* apresentam febre alta com temperatura retal ao redor de 41,5°C, inquietação, atonia ruminal, dispnéia e taquicardia (TAYLOR et al., 2010). Além disso, a parasitemia acarreta hemólise progressiva das hemácias, sendo necessário um maior número de dias para causar o óbito de animais infectados. A hemoglobinúria é típica da infecção por *B. bigemina*, pois a hemoglobina liberada de forma gradativa em decorrência da ruptura das células vermelhas é filtrada pelos rins deixando a urina com coloração vermelho-escura (FARIAS, 1995). A mortalidade de animais acometidos por esta espécie é bastante variável, sendo que na ausência de fatores estressantes, a taxa de sobrevivência pode ser elevada (TAYLOR et al., 2010).

2.2.4. Epidemiologia

O conhecimento da interação entre o vetor, os agentes etiológicos das enfermidades parasitárias e o hospedeiro vertebrado é de extrema importância para que sejam adotadas medidas profiláticas adequadas em uma determinada região, reduzindo desta maneira, as perdas. Para tanto, é necessário a avaliação da prevalência da infecção ou do nível imunitário dos rebanhos para se predizer a situação epidemiológica do local.

A ocorrência das babesioses bovinas em um determinado local é dependente, primariamente, da dinâmica populacional do carrapato vetor ao longo do ano, que necessita de condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento. Desta forma, classificam-se as áreas como livres, de estabilidade e de instabilidade endêmica (MAHONEY; ROSS, 1972).

As áreas livres são caracterizadas pela inexistência do carrapato, onde as condições ambientais adversas impedem o desenvolvimento das fases de vida livre deste artrópode, como é o caso do extremo Sul do Brasil e da Argentina ou devido a sua erradicação, como ocorreu na América do Norte (FARIAS, 1995). Com isso, os bovinos criados nessas áreas não são infectados apresentando elevada suscetibilidade aos hemoparasitas que ele transmite.

A estabilidade endêmica é a situação em que a transmissão da doença ocorre com frequência, pois o carrapato vetor está presente em todos os meses do ano. Entretanto, a exposição precoce às babesias durante o período em que os animais são muito jovens, permite o desenvolvimento da imunidade aos agentes infecciosos (CORRIER et al., 1978). Nesta fase, os bovinos estão protegidos pela imunidade passiva, que é transmitida via colostro de vacas imunes e por fatores não específicos, como a presença de timo e hemoglobina fetal. Nestas áreas, estima-se que 75% dos bezerros com idade entre seis a nove meses estejam infectados por *Babesia* spp., sendo que a parasitemia ocorre em níveis baixos (MAHONEY et al., 1973), com sinais clínicos moderados. No entanto, os casos isolados em bovinos adultos podem estar associados à queda da resistência individual ou à entrada na propriedade de animais oriundos de outras regiões, portadores de amostras exóticas de babesias (FARIAS, 1995) ou provenientes de áreas de instabilidade enzoótica.

Segundo Montenegro-James et al. (1995), os anticorpos colostrais persistem por aproximadamente três meses no organismo dos bezerros, sendo que estes animais apresentam resquícios de hemoglobina fetal até os nove meses, a qual prejudica o desenvolvimento dos hemoparasitas (FARIAS, 1995). Nestas circunstâncias, não existe a necessidade de se utilizar métodos específicos de controle, uma vez que a imunidade passiva é naturalmente reforçada a campo, por meio das sucessivas inoculações das babesias pelo *R. (B.) microplus* (TAYLOR et al., 2010).

No entanto, bovinos que sobrevivem à infecção inicial desenvolvem sólida imunidade convertendo-se em portadores sadios da doença, atuando como fonte de infecção para os carrapatos vetores e contribuindo para a manutenção da endemia (TAYLOR et al., 2010).

As áreas de instabilidade endêmica são caracterizadas pela elevada incidência de casos clínicos da doença, sobretudo de curso agudo e com elevados índices de mortalidade (UILEMBERG, 1995). Isto ocorre porque os bezerros não se infectam por um prolongado período após o nascimento, e a imunidade ativa dos adultos não sofre reforços, reduzindo os níveis de desafio frente ao inóculo. Assim, os rebanhos ficam sujeitos às novas infestações apenas na época favorável ao desenvolvimento do carrapato, promovendo uma oscilação nos títulos de anticorpos anti-babesias, muitas vezes insuficientes para estimular respostas imunes protetoras nos animais.

De acordo com Kessler et al. (1983), o Brasil é uma área de estabilidade enzoótica para as babesioses bovinas, permitindo que os animais estejam naturalmente imunizados contra *B. bovis* e *B. bigemina*. Entretanto, uma área de estabilidade enzoótica pode se tornar instável em termos epidemiológicos, por adoção de práticas de manejo inadequadas pelos criadores que visam o controle excessivo do carrapato vetor (D'ANDREA et al., 2006), sendo responsável pela redução na taxa de inoculação de *Babesia* spp. e, conseqüentemente, pela queda na imunidade dos animais.

Contudo, a situação epidemiológica é ainda mais grave quando animais provenientes de regiões livres do *R. (B.) microplus* são introduzidos em áreas de endemia estável, ocasionando surtos da doença, limitando, desta maneira, o desenvolvimento da atividade pecuária em várias partes do mundo (TAYLOR et al., 2010).

2.2.5. Diagnóstico laboratorial das babesioses bovinas

Bovinos que se recuperam da infecção primária tornam-se portadores crônicos e a detecção dos hemoparasitas por meio do exame microscópico de esfregaços sanguíneos torna-se difícil, devido à baixa sensibilidade desta técnica. Embora o exame microscópico seja considerado o método padrão para o diagnóstico das babesioses bovinas, só apresenta bons resultados quando se examina bovinos clinicamente afetados. Para estudos epidemiológicos, que requerem a identificação de animais sintomáticos e assintomáticos ou em estágios iniciais da doença, o exame direto não pode ser utilizado (COSTA-JUNIOR et al., 2006).

Sabe-se que bovinos de origem taurina podem ser portadores de *B. bovis* por toda a vida (MAHONEY et al., 1973), entretanto os zebuínos se mantêm infectados por um período médio de três anos (JOHNSTON et al., 1978). Para *B. bigemina* esta situação pode variar entre 5-22 meses (RIEK, 1968) até 48 meses (MAHONEY et al., 1973), alternativamente, os animais podem eliminar o hemoparasita no período de um ano (JOHNSTON et al., 1978).

Mediante as dificuldades para o diagnóstico dos parasitas pelo método direto, estudos epidemiológicos são rotineiramente realizados por meio de investigação sorológica. Entre os métodos indiretos de diagnóstico, o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) é o mais utilizado, no qual permite a detecção de anticorpos específicos anti-babesia, provido de sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade (MACHADO et al., 1997). Assim, a situação epidemiológica em uma determinada região pode ser definida por meio do “status imunológico” dos animais (MAHONEY et al., 1973), possibilitando a indicação de medidas eficazes de controle, e evitando desta forma, surtos das babesioses bovinas. Apesar de detectarem os animais portadores em um determinado rebanho, as técnicas sorológicas apresentam limitação, porque a indicação da exposição prévia aos agentes não permite caracterizar a evolução das enfermidades parasitárias (WAGNER et al., 1992).

O desenvolvimento de técnicas moleculares, como por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) resolveu parte dos problemas relacionados à detecção de animais portadores nos rebanhos, possibilitando a determinação rápida dos riscos de ocorrência de surtos, colaborando em

estudos epidemiológicos (FIGUEROA et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008; BRITO et al., 2013), além de apresentar alta sensibilidade e especificidade. Tais métodos se baseiam na detecção do DNA de parasitas em amostras de sangue e, vêm demonstrando algumas vantagens sobre os métodos convencionais de diagnóstico, sendo cada vez mais utilizados no auxílio do controle de doenças infecciosas (AZAMBUJA et al., 1994).

A PCR consiste em uma reação enzimática que permite amplificar “in Vitro”, regiões específicas do genoma de qualquer organismo de interesse. Possui a vantagem de sintetizar, em poucas horas, bilhões de cópias do fragmento de interesse, por meio da utilização de uma solução tampão contendo íons de magnésio (Mg), desoxirribonucleotídeos trifosfatos livres (dNTPs), sequências iniciadoras complementares à região do DNA que flanqueiam a região que se deseja reproduzir, sendo a reação catalisada por uma enzima termoestável, a Taq DNA Polimerase, que permitiu a automação da técnica (SAIKI et al., 1988).

Tem sido verificado que as técnicas de amplificação do DNA dos parasitas possibilitam detectar a presença de babesias em um número significativamente maior de animais, quando comparadas ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos. A PCR como método de diagnóstico possui uma sensibilidade 100 vezes maior, quando comparada com o limite de detecção da técnica padrão (BOSE et al., 1995; FAHRIMAL et al., 1992). Em adição, este método permite detectar 10 pg do DNA dos hemoparasitas em amostras de sangue de animais parasitados (BOSE et al., 1995). Além disso, a sensibilidade do teste pode ser elevada mediante a utilização da técnica de Nested PCR (nPCR) (COSTA - JÚNIOR et al., 2006).

Oliveira et al. (2005) e Oliveira-Sequeira et al. (2005), utilizando a técnica de PCR e a Nested PCR (nPCR) mostraram que, em bovinos cruzados (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), as taxas de infecção por *B. bovis* e por *B. bigemina* não diferiram e que ambas eram também semelhantes em bezerros e vacas.

Brito et al. (2013) utilizaram as técnicas de PCR convencional e Nested-PCR (nPCR) para avaliar a prevalência da infecção causada por *B. bovis* em animais jovens com idades entre 4 a 12 meses, manejados em diferentes

microrregiões nos estados de Rondônia e no Acre. Mediante a análise dos resultados de amplificação do DNA do parasita, o grupo de pesquisa observou que 95% (272/286) e 96,1% (195/203) das amostras oriundas de Rondônia e no Acre, respectivamente, foram positivas para este hemoparasita. A alta prevalência da doença permitiu classificar essas microrregiões como sendo de estabilidade endêmica.

No entanto, a PCR convencional e suas variações permitem apenas avaliar de maneira qualitativa a infecção dos animais. Em contraste, a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) foi desenvolvida a partir da PCR convencional e tem sido amplamente utilizada, principalmente, em decorrência de suas vantagens. A alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade desta técnica molecular permitiu substituir métodos de diagnóstico que demonstram alta especificidade, porém de menor sensibilidade como o exame microscópico de esfregaços sanguíneos (OURA et al., 2004).

Oliveira et al. (2014) evidenciaram que a qPCR possibilitou diagnosticar um maior número de animais positivos para *B. bovis* (98%) e *B. bigemina* (100%), quando comparada com o exame direto de esfregaços sanguíneos (5,3%). Nesse estudo foram observados apenas seis animais que apresentaram merozoítas de *B. bigemina* pelo exame direto confirmando achados de estudos anteriores que demonstraram a baixa sensibilidade deste método de diagnóstico.

A qPCR consiste em uma metodologia que utiliza um sistema fechado, onde durante a amplificação da reação ocorre a detecção de fluorescência, tornando desnecessários procedimentos pós-amplificação, e evitando dessa forma, risco de contaminação cruzada (HEID et al., 1996; FARRUGIA et al., 2011).

Com o desenvolvimento desta técnica molecular foi possível, além de diagnosticar, quantificar o DNA oriundo de *Babesia* spp. presente em amostras de sangue de bovinos parasitados, apresentando-se como um método extremamente sensível, confiável e de elevada reprodutibilidade (KE et al., 2006). Assim, a qPCR pode ser utilizada na quantificação de hemoparasitas (BILHASSI et al., 2014), em estudos de expressão gênica (FOLLO et al., 2006) e na discriminação alélica (BEST, 2005), dentre outros.

Ramos et al. (2011) observaram que a quantificação absoluta por meio da qPCR possibilitou diagnosticar um maior número de animais positivos, quando comparada com a PCR convencional, mas não diferiram estatisticamente do ELISA em estudos relacionados à ocorrência da *B. bovis* em área considerada estável enzooticamente (Juiz de Fora-MG).

Resultados semelhantes foram observados por Shebish et al. (2012) que avaliaram a prevalência dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em animais de diferentes grupos genéticos na província de Puntarenas, Costa Rica, por meio do ELISA e da qPCR. Este grupo de pesquisa, além de detectar a presença dos parasitas na região estudada, observou que a técnica sorológica possibilitou o diagnóstico de um maior número de animais positivos para *Anaplasma marginale* e *Babesia* spp. quando comparada com a técnica molecular.

Estes achados, no entanto, diferem daqueles observados por Giglioti (2013), em que a técnica de qPCR possibilitou o diagnóstico da infecção por *B. bovis* em todos os bovinos avaliados (100%), enquanto que nos ensaios do ELISA-teste, apenas 74,39% deles foram considerados positivos.

Bilhassi et al. (2014), utilizando a qPCR como método de diagnóstico, evidenciaram diferenças significativas na prevalência da doença em animais jovens e adultos de grupos genéticos diferentes criados em regiões consideradas endêmicas para as babesioses bovinas do estado de São Paulo. Neste estudo, 98% dos bovinos avaliados (147/150) foram diagnosticados como positivos para *B. bovis* por meio da qPCR. Estes resultados corroboram com aqueles observados por Giglioti et al. (2016) que utilizaram a mesma técnica molecular para quantificar o DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* em animais de origem taurina, os quais observaram alta prevalência da doença neste grupo genético.

Li et al. (2015), com a finalidade de detectar várias espécies de *Babesia* spp. em uma única reação, utilizaram a PCR em tempo real baseada no uso de sondas de hibridização, denominada de FRET-qPCR (energia de ressonância transferida por fluorescência) em amostras de sangue de ruminantes e asininos. Após análise dos resultados, os pesquisadores observaram que 70% dos animais avaliados (525/752) das cinco ilhas do Caribe foram positivos para este gênero.

2.2.6. Imunidade dos bovinos às babesioses

O sistema imunológico tem como principal função a manutenção da homeostase do organismo, pois é capaz de controlar a invasão de agentes agressores e controlar as alterações do próprio, como o desenvolvimento do câncer e doenças autoimunes. Para responder de maneira eficiente, os mamíferos desenvolveram ao longo de sua evolução um complexo mecanismo de defesa. Assim, a resposta imune dos bovinos às infecções por hemoparasitas do gênero *Babesia* spp. é dependente das características individuais, na qual vários genes influenciam a resposta imune e seus alelos podem determinar maior ou menor resistência a parasitemia. Os mecanismos protetores estão intimamente relacionados à categoria animal, ao grupo genético, ao tipo de resposta imune de envolvida pelo hospedeiro, à virulência das espécies (isolados geográficos das babesias), além da carga parasitária inoculada pelo carrapato (BENAVIDES et al., 2006).

Em relação à imunidade, o sistema imunológico dos bovinos parece ser o principal responsável por regular a característica de resistência, frente às infecções por *Babesia* spp. e aos carrapatos (MATTIOLI et al., 2000). A imunidade dos bovinos tanto para *B. bovis* como *B. bigemina* envolvem mecanismos inatos e adaptativos, como perfil de células imunes contra babesias, anticorpos específicos e subtipos de células CD4⁺ T "helper" (Th).

No entanto, independente do agente infeccioso os animais podem controlar a infecção devido à imunidade inata constitutiva desses bovinos, como o que ocorre em muitos casos de babesioses. Assim, a resposta imunológica contra *Babesia* spp. é primariamente mediada por células constituintes do sistema imune inato, como as fagocíticas, exterminadoras naturais (NK) e macrófagos. Enquanto a resposta imune adaptativa é mediada por células de reconhecimento específico, como T CD4⁺ e T CD8⁺, que promovem resposta celular efetora, síntese de citocinas e favorecem células de memória e ativam células B. A ativação das células B diferencia os plasmócitos, responsáveis pela produção de resposta humoral por meio da secreção de anticorpos (BROWN, 2001).

A resposta adaptativa para fins didáticos é subdividida em imunidade celular e humoral (TIZARD, 1998). A imunidade celular é uma das primeiras linhas de defesa da imunidade inata, sendo mediada, principalmente, por

macrófagos, células NK e linfócitos T. Essas células são responsáveis pela síntese de citocinas, como Interferon-gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e outras Interleucinas que podem estimular ou dificultar a resposta imune protetora às babesias, por interferirem diretamente no ciclo biológico dos hemoparasitas (BENAVIDES et al., 2006). A imunidade humoral é a principal resposta específica do sistema imune. Esse tipo de resposta conta com a participação de células altamente especializadas como linfócitos T CD4⁺, células dendríticas e os linfócitos B ativados, conhecidos por plasmócitos, sendo as únicas células capazes de produzir moléculas de anticorpos. Dessa forma, essas duas respostas do sistema imune contribuem de maneira indireta e direta para o controle da parasitemia nos bovinos.

A babesiose é uma doença hematológica que promove diferentes respostas nos organismos parasitados. A parasitemia sendo eritrocitária favorece que o baço, um importante órgão linfóide secundário, seja o principal local de ativação para a resposta imune contra as babesias. Assim, a resposta imune dos bovinos à doença é dependente, principalmente, da imunidade celular oriunda do baço, pelo fato de ser um órgão rico em células imunes que promovem a ativação específica contra os agentes infecciosos. Estudos mostram que animais esplenectomizados desenvolvem maior parasitemia, quando comparados com bovinos primo-infectados. O controle da parasitemia pelo baço possivelmente ocorre pela grande concentração de células apresentadoras de antígenos (APCs) presentes neste órgão que participam efetivamente da ativação da resposta imune humoral, assim como aumentar a atividade microbiana dos macrófagos residentes. E, a ativação desses macrófagos esplênicos pode controlar a infecção mediante a destruição de hemácias parasitadas (BROWN; PALMER, 1999; BROWN, 2001). De acordo com Allred e Al-Khedery (2004), o controle da parasitemia causada por *B. bovis* é mediada pela destruição de eritrócitos parasitados por meio da ativação de macrófagos esplênicos. Além da ativação dos macrófagos efetores no controle da carga parasitária, os anticorpos circulantes promovem a direcionada contra merozoítos extracelulares e antígenos variáveis existentes na superfície de eritrócitos infectados denominados de VESA 1 (Variant Erythrocyte Surface Antigen-1). Estas observações indicam que o baço desempenha papel importante na resposta imune celular contra as babesias (BOCK et al., 2004).

Os principais perfis de resposta que mediam a imunidade contra as babesias podem ser caracterizados em respostas imunes Th1 e Th2. No entanto, o que determina esses tipos de resposta são as citocinas que esses linfócitos T CD4⁺ secretam. As citocinas que caracterizam o perfil de resposta imune Th1 são IL-12, IFN- γ e IL-2. As citocinas que caracterizam perfil de resposta imune Th2 são IL-4, IL-5 e IL-13. Porém, outras citocinas como TNF- α , considerado importante citocina pró-inflamatória e a IL-10, importante citocina regulatória também contribui para a resposta imune em modelos de infecção (ABBAS et al., 2015)

Deve-se salientar que todos os mecanismos de defesa do organismo são estimulados, funcionando de forma complementar e integrada, maximizando a capacidade do sistema imunológico do animal em combater os microorganismos patogênicos (ABBAS et al., 2015). Assim, quando os esporozoítas invadem as hemácias, ocorre a ativação de macrófagos que fagocitam as células parasitadas e os merozoítas livres na circulação sanguínea do bovino. Como os eritrócitos sanguíneos são células desprovidas de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), os macrófagos desempenham o papel de células apresentadoras de antígenos (APCs) de babesias para ativação das células T CD4⁺. Assim, as células T CD4⁺ que respondem aos antígenos, é o elo entre a resposta imune inata e adaptativa (BROWN; PALMER, 1999; BROWN, 2001), promovendo a formação de uma resposta efetora específica.

Dependendo do estímulo durante o processo de apresentação de antígenos, as células T CD4⁺ efetoras se diferenciam originando células do tipo Th1, Th2 ou Th17 responsáveis pela síntese de conjuntos distintos de citocinas, que provocam diversas reações no organismo, estando envolvidas em diferentes processos imunológicos. Como já mencionado, as células com perfil Th1 produzem principalmente o Interferon-gama (IFN- γ) e IL-12, contribuindo para a ativação de macrófagos, além estimular indiretamente a produção de imunoglobulinas G (IgG), que pode proteger o hospedeiro contra micro-organismos intraeritrocitários. No entanto, as células exterminadoras naturais (NK) e T CD8⁺ também são responsáveis pela síntese de IFN- γ , sendo dependentes das reações imunológicas, inatas ou adaptativas. Na imunidade inata, as células NK sintetizam o IFN- γ em resposta a IL-12 e pela ativação de

ligantes na superfície de células parasitadas. No contexto da imunidade adaptativa, as células T são as responsáveis pela síntese do IFN- γ desencadeada pela presença do antígeno, sendo potencializada pela IL-12 e IL-18 (ABBAS et al., 2015). Desta forma, as citocinas consistem nas principais moléculas envolvidas na comunicação entre as células T, macrófagos e outras células do sistema imunológico, responsáveis pela modulação da resposta imune frente às infecções (BELARDELI, 1995).

Bittar et al. (2004) identificaram diferentes perfis fenotípicos de linfócitos T periféricos no sangue de bovinos de origem europeia, que os permitiram concluir que as baixas concentrações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, podem estar associadas à suscetibilidade destes animais às infecções por *Babesia* spp. Além de estimularem a produção de anticorpos específicos, as células T CD4⁺ são importantes também na ativação de macrófagos que produzem óxido nítrico (NO) e outras moléculas tóxicas para os hemoparasitas (NORIMINE et al., 2002; SHODA et al., 2000).

Os macrófagos ativados também são capazes de sintetizar outras citocinas, como por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e a Interleucina-10 (IL-10). O TNF- α em associação com o IFN- γ , são responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos expostos a merozoítas de *B. bovis*, sendo que a interleucina-10 (IL-10) desempenha um papel importante na modulação da resposta imune contra *B. bovis*, porque inibe a síntese de IFN- γ , TNF- α e a produção de NO pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (SHODA et al., 2000; GOFF et al., 2002) presente no citoplasma dos macrófagos e de outras células nucleadas como hepatócitos, que sintetizam NO quando estimulados pelo IFN- γ (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO por sua vez inibe a replicação dos hemoparasitas, tendo como consequência, a degeneração de *B. bovis* de maneira dose-dependente (SHODA et al., 2000). Assim, a síntese de NO pelos macrófagos em bovinos, pode ter efeito babesicida nas hemácias parasitadas, induzindo a morte, devido ao aumento da produção da iNOS (STICH et al., 1998). Desta forma, o óxido nítrico apresenta um papel fundamental como mediador citotóxico de células imunes ativadas, capaz de eliminar os parasitas.

Para alguns pesquisadores (WANDURSKA-NOWAK, 2004), a síntese de citocinas pró-inflamatórias estimula o aumento da síntese de NO, que mediam

a resposta imune do hospedeiro, por meio da eliminação do parasita ou por inibirem o seu crescimento. Enquanto outros preconizam que a super produção de óxido nítrico(NO), IFN- γ e TNF- α podem estar relacionados ao agravamento da infecção, impossibilitando a recuperação dos bovinos frente à parasitemia (STICH et al., 1998).

A modulação da resposta imune contra os agentes patogênicos é dependente também da ação de outras citocinas, como por exemplo a IL-12. Esta interleucina 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 IFN- γ , potencializando a proliferação e a citotoxicidade das células T e 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.

Nas infecções por babesias, estudos realizados por Tuo, Estes e Brown (1999) já demonstraram a importância do IFN- γ , sintetizados por linfócitos T ativados. No entanto, durante a fase aguda da doença, a resposta imune inata apresentada pelos animais parasitados é imprescindível e requer a produção de IL-12 e IL-18, sendo responsáveis pela síntese de IFN- γ (SHODA et al., 2000). Entretanto, vários grupos de pesquisas (BOCK et al., 2004; AL-KHEDERY, ALLRED, 2006; CHAUVIN et al., 2009) admitem que nas infecções causadas por *B. bovis* a excessiva produção de citocinas e de outras substâncias relacionadas à resposta imune podem contribuir para o agravamento da doença, inclusive com a ocorrência de lesões no sistema nervoso central dos hospedeiros.

2.2.7. Citocinas

As citocinas são hormônios protéicos produzidos em respostas a agentes patogênicos e antígenos. Entretanto, a característica de resistência e suscetibilidade às infecções parasitárias é dependente do padrão de resposta, envolvendo subconjuntos de células T CD4⁺ (Th1 e Th2), as quais produzem citocinas capazes de estimularem o sistema imune dos hospedeiros aos diferentes parasitas. Estas citocinas desempenham várias funções no comportamento das células, possibilitando a divisão da célula-alvo, a diferenciação e a síntese de novos produtos protéicos ou de novos receptores de membrana. Desta forma, verdadeiras cascatas imunológicas ocorrem após

essa ativação. Simultaneamente, estas citocinas podem agir de maneira antagônica, inibindo estes efeitos. Acrescenta-se a isso, o fato de que as citocinas possuem algumas propriedades, permitindo que atuem nas células-alvo de maneira sinérgica, pleiotrópica e redundante (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2015). Abaixo estão descritas as citocinas utilizadas no presente estudo.

- Interferon- γ (IFN- γ)

O IFN- γ exerce funções críticas tanto na imunidade inata como na adaptativa, mediada por células contra agentes infecciosos intracelulares. Além disso, atua nas células B, T e exterminadoras naturais (NK), sendo a principal citocina ativadora de macrófagos (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2015). Além das células Th1, esta citocina também é sintetizada pelas células NK e por linfócitos T CD8⁺. Como uma das funções é de agir sobre as células B, o IFN- γ possibilita a mudança para certas subclasses de IgG auxiliando nas respostas específicas mediadas por anticorpos por meio da eliminação dos agentes infecciosos, juntamente com a ação dos macrófagos ativados por esta citocina (ESTES; BROWN, 2002). Todavia, o IFN- γ produzido por células Th1 inibe a síntese de IL-4 pelas células Th2, o qual atua de maneira antagônica controlando a ativação da resposta imune Th2.

- Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias e pode atuar tanto na resposta imune celular como na humoral (BROWN et al., 2006). Atua na proliferação e diferenciação celular, além de promover a morte das células tumorais por indução da apoptose. Desempenha funções relacionadas à modulação da produção e ativação funcional de diversos tipos celulares, sendo produzida, principalmente, por macrófagos ativados. No entanto, pode ser sintetizada por células B, fibroblastos, células Th1 e algumas células Th2, além de agir em quase todas as células nucleadas (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2015).

- Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina regulatória secretada por células Th0, algumas células B, macrófagos e, principalmente, por células Th2, que regulam a resposta imune (GOFF; JOHNSON; CLUFF, 1998; GOFF et al., 2002). Células B, Th1, exterminadoras naturais (NK) e macrófagos são seus alvos principais. No entanto, a IL-10 sintetizada pelas células Th2 inibe a ativação das células Th1 e das células NK. Além disso, suprime a secreção de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β e de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, e também inibe a expressão de moléculas co-estimuladoras e do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de Classe II (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2015).

- Interleucina-12

IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata (Th1) a micro-organismos intracelulares e desempenha papel fundamental na imunidade mediada por células, a resposta imune adquirida (BROWN et al., 2006). É uma citocina heterodimérica sintetizada por células dendríticas e células B, principalmente, por macrófagos ativados. A IL-12 exerce efeitos imunoregulatórios sobre as células T e exterminadoras naturais (NK) e induz a diferenciação de células Th0 para tornar-se Th1 (BROWN et al., 1996). Todavia, promove a atividade da célula Th1, por meio da indução da secreção de IL-2 e de IFN- γ , além de potencializar as funções citotóxicas das células T CD8⁺ e NK. Como efeito secundário, reduz a produção de IgE, devido a supressão que exerce sobre a síntese de IL4 (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2015), favorecendo a regulação da resposta Th2.

2.2.8. Influência da subespécie bovina na resistência ao R. (B.) microplus

As diferenças nas direções e pressões de seleção durante o processo evolutivo dos zebuínos e dos taurinos são as responsáveis pelas divergências nas características morfológicas, fisiológicas, e zootécnicas destes animais (BARBOSA, 1995). Entre as divergências, pode-se mencionar o tipo racial, adaptabilidade ao ambiente, características produtivas e reprodutivas.

Os zebuínos se destacam pela rusticidade, caracterizada pela resistência aos parasitas e elevada capacidade de termorregulação, decorrente da maior dissipação do calor (HANSEN, 2004). Os animais de origem taurina, por sua vez, apresentam baixa tolerância ao calor, quando expostos à intensa radiação solar e elevada suscetibilidade aos parasitas. Provavelmente, o intenso parasitismo em animais desta subespécie é decorrente de algumas características, tais como pele espessa e recoberta de longos pêlos, que impedem a eliminação do calor. Desta forma, a aclimação do *Bos taurus indicus* nos trópicos, pode ser atribuída à capacidade de manterem a homeostase orgânica, mesmo quando submetidos a situações de estresse térmico. Isso é resultado da presença de glândulas sudoríparas maiores, menores taxas metabólicas e características na pelagem que diminuem a absorção da radiação solar (HANSEN, 2004).

Com relação à característica de resistência, as subespécies demonstram certa divergência com relação à suscetibilidade ao *R. (B.) microplus*. A resistência entre grupos genéticos foi observada, inicialmente, por Johnston et al. (1918), sendo que os primeiros trabalhos foram desenvolvidos por Villares (1941), evidenciando, entre raças nacionais, européias e indianas, valores diferentes de resistência à infestação pelo carrapato. Trabalhos experimentais mostram que, em geral, os zebuínos são considerados mais resistentes às infestações por carrapatos, quando comparados com animais de origem taurina (VILLARES, 1941; UTECH et al., 1978; OLIVEIRA et al., 1989; SILVA et al., 2007, 2010), enquanto que os animais cruzados ocupam posição intermediária (DOUBE; WHARTON, 1980). A resistência deste último grupo genético pode ser explicada, devido à alta proporção no genoma de *Bos taurus indicus* (OLIVEIRA et al., 1989).

O mecanismo de resistência dos bovinos ao *R. (B.) microplus*, além de ser um fenômeno complexo, ainda é pouco compreendido. Riek (1962) descreveu a ocorrência dos mecanismos de resistência dos bovinos ao carrapato, classificando-os como inato e adaptativo. O primeiro, já existe no animal quando ocorre o contato com o artrópode e o segundo é observado após infestações sucessivas. Vários pesquisadores já descreveram este segundo mecanismo de defesa dos animais (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1975), cujos resultados demonstram que a resistência ao carrapato é maior

após infestações sucessivas, quando comparados com o nível da primeira infestação.

A grande resistência conferida ao gado indiano também pode ser explicada pelo simples fato destes animais terem convivido milhares de anos com o *R. (B.) microplus*. Sendo assim, esta subespécie passou por um longo processo de seleção, no qual os mais sensíveis foram eliminados naturalmente do ambiente, tendo persistido somente aqueles geneticamente resistentes (LEMOS, 1986). Além das características fisiológicas, a alta suscetibilidade dos taurinos frente ao intenso parasitismo, provavelmente decorre do contato restrito que estes animais possuíram com o carrapato, fato este que os tornaram altamente vulneráveis.

De acordo dados da literatura (MORAES; COSTA; WOELZ, 1986; VERÍSSIMO, 1991), a maior eficiência no comportamento de autolimpeza via lambadura dos zebuínos contribui para o equilíbrio parasita-hospedeiro nestes animais. Este fato pode explicar a elevada suscetibilidade dos taurinos aos carrapatos, sendo evidenciado pela incapacidade deste grupo genético em controlar a infestação.

Estudos realizados no intuito de avaliar a resistência dos *Bos taurus taurus* frente às infestações por *R. (B.) microplus* (WAMBURA et al., 1998; MATTIOLI et al., 2000) verificaram que, apesar de desenvolverem certa imunidade, estes bovinos não conseguem controlar as infestações com a mesma eficiência que os zebuínos.

Byford, Colditz e Sibbick (1976), após avaliarem a resistência entre taurinos e animais oriundos do cruzamento com *Bos taurus indicus* observaram que, bovinos cruzados demonstraram uma resistência promissora, considerada de moderada a alta. É por essa razão que o interesse entre os criadores por animais cruzados no Brasil tem crescido, em virtude da possibilidade de elevar a eficiência produtiva dos rebanhos. Além disso, os mestiços são adaptados aos diversos sistemas de produção utilizados no país, sendo uma alternativa a utilização de animais de origem indiana.

LEMOS et al. (1985) realizaram um estudo que objetivava avaliar a resistência ao carrapato em novilhas de diferentes grupos genéticos, sendo que a composição genética dos animais experimentais variava entre $\frac{1}{4}$ Holandês + Zebu, até Holandês “puro por cruza”. Os resultados mostraram que

a suscetibilidade dos animais à infestação por *R. (B.) microplus* aumentava, conforme o percentual genético de *Bos taurus taurus* nos cruzamentos também aumentava, demonstrando a suscetibilidade dos animais de origem européia.

Segundo Madruga et al. (1987), o grau de infestação em animais da raça Nelore é considerado menor do que o limiar econômico de controle, sendo adequado para manter o equilíbrio enzoótico da Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Os pesquisadores observaram que, quanto maior o percentual genético de raças européias na composição genética dos bovinos, maior foi o grau de infestação pelo *R. (B.) microplus*.

Oliveira e Alencar (1987) desenvolveram um estudo que tinha por finalidade avaliar o grau de resistência de animais das raças Canchim e Nelore à infestação artificial por *R. (B.) microplus*. Os pesquisadores observaram que os zebuínos são mais resistentes à infestação quando comparados com o Canchim, atribuindo este efeito às diferentes reações imunológicas existentes entre os grupos genéticos avaliados.

Veríssimo et al. (2002), após avaliarem a característica de resistência em vacas das raças Holandesa e Gir e, daquelas provenientes de seus cruzamentos à infestação por carrapatos, observaram que o primeiro grupo genético apresentou maior suscetibilidade, enquanto que o segundo maior resistência.

Em experimentos realizados com o objetivo de avaliar a intensidade de parasitismo pelo carrapato em fêmeas bovinas de diferentes grupos genéticos, Silva et al. (2007) observaram que animais cruzados Angus x Nelore e Simental x Nelore apresentaram uma maior taxa de infestação quando comparados com animais puros Nelore, enquanto que bovinos Canchim x Nelore apresentaram uma infestação intermediária. Resultados semelhantes foram observados por Wambura et al. (1998) e Singh e Ghosh (2003), os quais relataram os mesmos padrões de resistência.

Contudo, a identificação e seleção de bovinos resistentes às enfermidades parasitárias pode ser importante para o desenvolvimento de métodos mais efetivos de controle, e também para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando aumentar a resistência genética nos rebanhos, elevando a produtividade na bovinocultura de corte por meio da minimização das perdas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Os objetivos deste estudo foram avaliar, durante as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), a parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* e a prevalência das babesioses bovinas em novilhas da raça de corte Canchim naturalmente infestadas com o carrapato *R. (B.) microplus* por meio da qPCR, além de caracterizar o perfil de citocinas que pode estar associado ao fenótipo de resistência/suscetibilidade às parasitoses sob estudo.

3.2. Específicos

- 1) Estimar, por meio da quantificação absoluta (qPCR), a parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue de novilhas da raça Canchim;
- 2) Avaliar o grau de infestação pelo carrapato *R. (B.) microplus* mediante contagens realizadas nas diferentes estações do ano;
- 3) Avaliar os níveis de mRNA dos genes codificadores do IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12B envolvidos na resposta imune a *Babesia* spp. em sangue de bovinos submetidos a infestação natural pelo *R. (B.) microplus*, por meio da quantificação relativa (RT-qPCR) ;
- 4) Estimar as correlações entre a quantificação absoluta de babesias com os graus de infestação pelo carrapato e a correlação entre espécies de hemoparasitas ao longo do período experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características da Região de São Carlos-SP e Coleta dos Dados Meteorológicos

A cidade de São Carlos está localizada a 22° 0' 55" de latitude sul e 47° 53' 28" de longitude oeste. O clima da região é definido como subtropical com inverno seco e verão chuvoso (tipo Aw, segundo a classificação de Köppen), em que o período de seca estende-se de abril a setembro e o período das águas estende-se de outubro a março. Os dados meteorológicos foram coletados na estação climatológica do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, São Carlos-SP, com objetivo de caracterizar o clima da região durante o período experimental.

4.2. Manejo Sanitário e Alimentar dos Animais Experimentais

As 50 novilhas da raça Canchim ($\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu) integravam o rebanho experimental do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, localizada em São Carlos, interior do estado de São Paulo, região considerada endêmica para as babesioses bovinas. O experimento foi iniciado após o desmame dos animais, aos oito meses de idade, sendo o rebanho monitorado até os 32 meses (Protocolo de Comissão de Ética do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), Embrapa nº 03/2014).

No manejo sanitário estavam inclusos exames semestrais, para o diagnóstico da tuberculose utilizando a tuberculina PPD bovina (derivado protéico purificado) e sorologia para a brucelose (soroaglutinação rápida). A fazenda seguia um calendário anual de vacinação, na qual foram aplicadas vacinas contra febre aftosa (semestralmente), brucelose (fêmeas de 3-8 meses), clostridioses, pasteureloses, salmoneloses e raiva (anualmente).

O controle do carrapato era feito por meio de banhos regulares de pulverização com medicamentos à base de cipermetrina, clorpirifós e citronelal (Colosso®). Visando obter a infestação natural por *R. (B.) microplus*, concomitante à possível interferência do carrapaticida na análise dos dados, os

bovinos eram banhados após as colheitas mensais quando a avaliação visual do grau de infestação (acima de 50 teleóginas/animal) indicava sua necessidade, com a finalidade de impedir a expoliação exagerada. Os bovinos que apresentaram os sinais clínicos da doença foram tratados com medicamentos à base de Diaceturato de Diminazene (Ganaseg® 7%) e retirados no experimento durante o período de tratamento.

Com relação ao manejo alimentar, os bovinos foram mantidos em pastagens de capim Tanzânia (*Panicum maximum*), recebendo água e sal mineral “*ad libitum*”.

4.3. Pesagem dos Animais, Contagem de Carrapatos e Colheita das Amostras de Sangue para Extração do DNA

Durante o período de agosto de 2013 a julho de 2015 foram realizadas as contagens de carrapatos e as colheitas das amostras de sangue dos animais experimentais para extração de DNA, sendo duas em cada estação do ano (primavera, verão, outono e inverno), totalizando dezesseis observações, em um período de 24 meses, conforme descrito no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1. Data das colheitas realizadas na Fazenda Canchim, São Carlos-SP, conforme a estação do ano.

Data da Colheita	Estação do Ano	Colheita
Outubro e Novembro/13	Primavera	3º e 4º
Outubro e Novembro/14		15º e 16º
Janeiro e Fevereiro/14	Verão	6º e 7º
Janeiro e Fevereiro/15		18º e 19º
Abril e Maio/14	Outono	9º e 10º
Abril e Maio/15		21º e 22º
Julho e Agosto/14	Inverno	12º e 13º
Junho e Julho/15		23º e 24º

Os bovinos foram pesados em balança eletrônica instalada no brete da fazenda. As colheitas de sangue e as contagens de carrapatos foram executadas com os animais imobilizados individualmente em tronco de contenção. As amostras foram colhidas da veia jugular com auxílio de sistema

a vácuo contendo o anticoagulante EDTA, identificadas, acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, São Carlos-SP, onde foram processadas.

Todas as fêmeas de carrapatos com tamanho superior ou igual a 4,5 mm (UTECH et al., 1978; HERMANS et al., 1994) presentes no lado esquerdo de cada animal foram contadas. Os dados foram tabulados em planilhas para posterior análise.

4.4. Laboratórios

A extração de DNA e do RNA das amostras de sangue dos bovinos, a síntese de cDNA e as reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, São Carlos-SP.

4.5. Extração de DNA

O DNA das 50 amostras de sangue de cada colheita foi extraído com o uso do Kit Easy DNA (Invitrogen, EUA) conforme protocolo proposto pelo fabricante com modificações, como descrito a seguir: inicialmente, os tubos foram invertidos até a perfeita homogeneização do sangue. Em seguida, foram pipetados 300 µL de sangue e adicionados 400 µL de solução A, misturando-os por inversão por várias vezes colocando-os em microtubos de 2,0 mL. Os tubos foram identificados e incubados a 65°C, durante 6 minutos. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio, agitando-se em vórtex vigorosamente, até que apresentassem coloração marrom escura. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de solução B, sendo as amostras novamente homogeneizadas até que elas se tornassem viscosas. Elas foram centrifugadas à velocidade máxima de 20.817 xg em microcentrífuga por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). A fase aquosa de cada amostra foi transferida para tubos de 2,0 mL limpos e devidamente identificadas. Logo após, o DNA foi precipitado adicionando-se 1 mL de etanol 100% gelado, misturando-se por inversão até que se formasse um precipitado. As amostras foram

aconditionadas em freezer à -20°C, por um período de 24 horas e, no dia seguinte, foram novamente centrifugadas a mesma velocidade por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 1 mL de etanol 80% gelado. Os tubos foram submetidos novamente à centrifugação a 20.817 xg por 2 minutos e à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos centrifugados a mesma velocidade durante 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, o etanol residual foi pipetado, e os tubos foram colocados para secar para evaporar todo o etanol residual por um período de 2 horas em temperatura ambiente na bancada do laboratório. Após a secagem, aos DNAs precipitados foram adicionados 200 µL de solução tampão TRIS-EDTA. As amostras de DNA dos bovinos foram acondicionadas em caixas plásticas para microtubos de 2,0 mL em freezer a -20°C, separados de acordo com a data da colheita e estação do ano.

4.6. Avaliação da Qualidade e Concentração das Amostras de DNA Extraídas

Para análise da qualidade, a razão entre as absorbâncias na faixa de A260/A280 nm, assim como a concentração em ng/µL das amostras de DNA foram avaliadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA), sendo consideradas puras aquelas que apresentassem razões de absorbância entre 1,8 e 2,0. Em seguida, o DNA foi conservado em freezer a -20°C para posterior amplificação pela técnica de qPCR.

4.7. Quantificação do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A metodologia utilizada para a quantificação do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* nas amostras de sangue dos animais experimentais pela qPCR foi uma adaptação daquela descrita por Buling et al. (2007), utilizando-se o equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e o reagente SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA).

Os iniciadores utilizados foram aqueles que flanqueiam um fragmento do gene mitocondrial do citocromo b (mt-cyt B) e que produzem para ambas as

espécies, amplicons com 88 pares de bases. O Quadro 2 descreve os oligonucleotídeos, descritos por Buling et al. (2007).

Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR para a quantificação do DNA de *B. bigemina* e *B. bovis* e o tamanho dos produtos de amplificação.

<i>Babesia</i> spp	Iniciadores	Sequência(5' > 3')	Produto (pb)
<i>B. bigemina</i>	(F) cbisg 1	TGT TCC AGG AGA TGT TGA TTC	88
	(R) cbisg 2	AGC ATG GAA ATA ACG AAG TGC	
<i>B. bovis</i>	(F) cbosg 1	TGT TCC TGG AAG CGT TGA TTC	88
	(R) cbosg 2	AGC GTG AAA ATA ACG CAT TGC	

(F) Forward; (R) Reverse

4.8. Otimização da qPCR para *B. bovis* e *B. bigemina*

Para a padronização da qPCR foram utilizadas amostras de sangue contendo isolados de *B. bovis* e *B. bigemina*, obtidos a partir da multiplicação desses parasitas em bezerros esplenectomizados. Foram usados os isolados produzidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp, Jaboticabal-SP, gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado.

Os ciclos adotados na qPCR para *B. bovis* e *B. bigemina* estão resumidos no Quadro 3, os quais foram adaptados do protocolo sugerido pela Bio-Rad Laboratories.

Quadro 3. Perfil térmico adotado na qPCR para *B. bovis* e *B. bigemina*.

Etapa do Ciclo	Ciclo	Temperatura	Tempo
Ativação Enzimática	1	95 °C	2 minutos
Desnaturação	45	95 °C	5 segundos
Anelamento/Extensão		57 °C	30 segundos
Curva de Dissociação	1	65-95 °C (incremento de 0,5 °C)	5 segundos/passos

As principais modificações foram com relação ao tempo na etapa de anelamento/extensão. Assim, o tempo foi alterado de cinco para trinta segundos, pois os cinco segundos sugeridos pelo fabricante, não foram suficientes para que a amplificação ocorresse até a fase de platô. Além disso, o volume final de cada reação foi reduzido para 12 μL , enquanto o kit sugeria uma reação com um volume final de 20 μL .

As reações foram preparadas em tubos brancos de perfil baixo em tiras, de 200 μL (Low-Profile, 0,2 mL, 8-Tube Strips without Caps, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e tampas óticas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), livres de DNases e RNases.

A reação em volume final de 12 μL continha 10 μL de “Tampão de Reação” e 2,0 μL de DNA genômico extraídos a partir de 300 μL de sangue, sendo utilizados os seguintes volumes de reagentes: 5,0 μL de Ssofast™EvaGreen®Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0,25 μM de cada oligonucleotídeo a 10 μM (cbosg1 e cbosg2; cbisg1 e cbisg2), 4,4 μL de água deionizada livre de nucleases e 2,0 μL de solução de DNA.

4.9. Clonagem dos Produtos Purificados de qPCR para a Construção da Curva de Calibração para *B. bovis* e *B. bigemina*

Os produtos de amplificação do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* de amostras de isolados, obtidos pela qPCR foram purificados por meio do PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para a construção da curva de calibração, as amostras dos amplicons purificados de babesias foram clonadas no laboratório de Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC. O kit de clonagem utilizado foi o pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) e o protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante. Os clones recombinantes foram transformados em células de *E. coli* DH5 α e as colônias brancas foram selecionadas e incubadas à 37 $\pm$ 1°C por 12 horas, sob agitação. Após a clonagem, as amostras foram purificadas e sequenciadas no equipamento Applied Biosystems/HITACHI ABI Prisma® 3130XL Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) usando o kit BigDye® terminator v.3.1

(Applied Biosystems, Foster, CA, USA). As sequências obtidas na clonagem (amplicons de 88pb) foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados de sequência-GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Após a verificação de sua identidade, alíquotas da solução dos produtos clonados foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA).

4.10. Construção da Curva de Calibração para qPCR de *B. bovis* e *B. bigemina*

Foram utilizados 2 µL das soluções dos produtos clonados dos isolados de ambas as espécies de babesias contendo DNA plasmidial + fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina*, para a quantificação em NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) e construção das respectivas curvas de calibração. Após a quantificação de *B. bovis* (197,3 ng/µL) e *B. bigemina* (203,9 ng/µL), as soluções foram diluídas a 1 ng/µL.

Para a definição do intervalo de trabalho foi testada a faixa de diluição de 10^{-10} a 10^{-1} , sendo verificado que o intervalo de 10^{-10} a 10^{-3} foi ideal para a quantificação das amostras. As diluições 10^{-2} e 10^{-1} foram excluídas da curva, pois se observou que nas quantificações essas diluições não eram necessárias. Para tanto, em cada ensaio de qPCR foi construída uma curva de calibração, possibilitando a estimativa do número de cópias/µL dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* pela qPCR.

A padronização da curva de calibração para cada espécie de babesia possibilitou a obtenção dos valores de Eficiência da reação (E), e a determinação dos intervalos de quantificação (limite máximo e mínimo para a quantificação dentro dos valores estimados pela curva de calibração) nas amostras de sangue dos bovinos experimentais.

4.11. Determinação do Número de Cópias (NC) dos Fragmentos dos Genes mt-cyt B, Específicos para *B. bovis* e *B. bigemina*

O NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies de babesias foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Ke et al. (2006):

$$\text{Número de cópias } / \mu\text{L} = \frac{6,022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{cópias}}{\text{mol}} \right) \times \text{Concentração } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}{\text{Massa Molecular } \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}} \right)}$$

Onde:

- $6,022 \times 10^{23}$ é o número de Avogadro;
- Massa Molecular: é o peso molecular médio da molécula do nucleotídeo de fita dupla (330 x 2) multiplicado pelo tamanho do fragmento clonado (vetor e inserto, 3088 pb);

Para calcular o número de cópias do produto clonado (número de cópias/ μL), a concentração determinada em espectrofotômetro em $\text{ng}/\mu\text{L}$ foi convertida para $\text{g}/\mu\text{L}$ ($\times 10^{-9}$), e em seguida multiplicada por 10^{-3} que foi a concentração inicial utilizada na primeira diluição da curva de calibração do produto clonado e, no final, multiplicado por 2,0 μL , pois corresponde ao volume de DNA da amostra aplicada.

O valor encontrado do número de cópias foi utilizado pelo software do equipamento CFX96 da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para calcular a quantidade inicial de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* em cada amostra de sangue dos bovinos experimentais.

4.12. Cálculo de Eficiência (E) da qPCR para a Quantificação de *B. bovis* e *B. bigemina*

A eficiência da reação (E) foi descrita por Pfaffl (2001) e Vandesompele et al. (2002), e demonstra o quanto que seu alvo está sendo produzido em cada ciclo de reação. Desta forma, a quantidade de DNA alvo será duplicada, se o valor de E for igual a 100%. Assim, o valor padrão da E utilizado nos cálculos é de 100%.

Durante os ensaios, a E dos oligonucleotídeos iniciadores foram avaliadas e registradas. Para esta análise, uma curva de calibração foi gerada utilizando-se diluições seriadas de uma amostra representativa (neste caso, foram os amplicons clonados de *B. bovis* e *B. bigemina*), e em seguida, gravou-se a (E) para a análise subsequente da quantificação do DNA. O software do equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) calcula automaticamente a E, na qual foi obtida da seguinte forma:

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

Em que:

Slope = inclinação da linha derivada da curva de calibração

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

Os resultados foram analisados com base nos valores do ciclo de quantificação (C_q) definidos após o término de cada reação. A linha *threshold* foi ajustada para um mesmo valor para todos os ensaios de qPCR, pois esta linha é que determinará o ponto exato do C_q de cada amostra e dos valores da curva de calibração. Para cada reação foi obtida uma curva de calibração, possibilitando a estimativa da parasitemia por babesias nos animais. As amostras foram quantificadas em duplicatas e para avaliar a ocorrência de contaminação em cada ensaio, foram utilizados três controles negativos (reação contendo água deionizada livre de nucleases ao invés da amostra de DNA). Amostras em que as repetições apresentaram diferenças de C_q s maiores que 0,5 foram novamente analisadas.

5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

5.1. Escolha de Animais Resistentes e Suscetíveis

Para proceder à seleção dos 10 animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, dentre os animais do rebanho, os dados obtidos nas oito primeiras colheitas de contagem de carrapatos e quantificação do número de cópias dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para de *B. bovis* e *B. bigemina* por meio da qPCR foram analisados pela metodologia de modelos mistos, conforme descrito no item 6. Os valores preditos dos efeitos de animal foram utilizados para discriminar aqueles cinco mais resistentes e os cinco mais suscetíveis.

5.2. Colheita de Amostras de Sangue para Extração de RNA

Foram realizadas quatro colheitas de sangue dos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, sendo uma em cada estação do ano (verão, outono, inverno e primavera), no período de março a setembro de 2015 (fim do verão, e início da primavera). Todo material utilizado na colheita foi borrifado com álcool etílico 70% e solução de peróxido de hidrogênio 3%, preparada com água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato-inibidor de RNase, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e posteriormente autoclavados.

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular com auxílio de sistema a vácuo contendo o anticoagulante EDTA. Em seguida pipetou-se 500 µL de sangue, os quais foram transferidos para o kit RNeasy Protect Animal Blood Tubes (QIAGEN, Hilden, Germany), próprios para a preservação do RNA. Após a colheita, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Sanidade Animal, permanecendo na bancada em temperatura ambiente (25°C) por duas horas para promover a completa lise celular. Após este tempo, as amostras foram acondicionadas em freezer à -20°C, separadas de acordo com a data da colheita e estação do ano para a extração de RNA.

5.3. Extração de RNA

Antes de cada extração, a bancada do laboratório e as pipetas foram borrifadas com a solução RNaseZap (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O

procedimento de extração de RNA foi realizado utilizando-se luvas nitrílicas descartáveis, ponteiros com barreiras e tubos de 1,5 mL livres de DNase/RNase, sendo todo o material autoclavado.

O RNA total das amostras de sangue dos bovinos selecionados fenotipicamente como resistentes e suscetíveis foi extraído com o uso do RNeasy Protect Animal Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), conforme protocolo proposto pelo fabricante com modificações, como descrito a seguir. Inicialmente, os tubos contendo o sangue+preservante foram centrifugados por 3 minutos a 5.000 xg. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente por pipetagem e descartado, sendo adicionado 1,0 mL de água livre de RNase ao “pellet” e agitado em vórtex até estar completamente dissolvido. Em seguida, a solução foi centrifugada por 3 minutos a 5.000xg. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente por pipetagem e descartado. Adicionaram-se então 240 µL de tampão RSB (tampão de ressuspensão) ao “pellet” e agitou-se em vórtex até estar visivelmente dissolvido. Após isso, a solução foi pipetada para um tubo limpo, livre de DNase e RNase de 1,5 mL e adicionados 200 µL de tampão RBT (tampão de ligação) e 20 µL de proteinase K. A solução foi novamente agitada em vórtex por 5 segundos e incubada por 10 minutos a 55°C na velocidade de 17.949 xg, em Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Posteriormente, todo o conteúdo do tubo foi pipetado para uma coluna lilás (QIAshredder), e inserida em tubo coletor de 2 mL, sendo centrifugada por 3 minutos à velocidade de 20.000 xg. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo limpo de 1,5 mL. Foram adicionados 240 µL de etanol absoluto (100%) e agitado em vórtex por 5 segundos. Em seguida, a solução foi pipetada para uma coluna rosa (RNeasy MinElute Spin), colocando-a em tubo coletor de 2 mL, foi centrifugada por 1 minuto à 8.000 xg e descartada a solução que passou pela coluna. Foram adicionados 350 µL de tampão RW1 (tampão de lavagem) à coluna que foi centrifugada por 15 segundos a 8.000 xg, descartando-se o conteúdo que passou pela coluna. Foi necessário o preparo de uma solução de trabalho a parte em tubos de 1,5 mL, contendo 10 µL de DNase I e 70 µL de tampão RDD (tampão de digestão de DNA) e misturados suavemente por inversão. Após isso, a solução foi adicionada à coluna, incubando-se por 15 minutos a temperatura ambiente na bancada do laboratório. Passado esse tempo foram adicionados à coluna 350

μL de tampão RW1 e centrifugou-se por 15 segundos a 8.000 xg, descartando-se o fluxo de passagem. Adicionaram-se 500 μL de tampão RPE (tampão de concentrado de lavagem) à coluna, centrifugando-se por 15 segundos a 8.000 xg, descartando-se novamente o conteúdo que passou pela coluna. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de etanol 80% e foi centrifugado por 2 minutos a 8.000 xg. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL livre de DNase e RNase, sendo centrifugada por 5 minutos a velocidade de 18.400 xg com a tampa aberta, pois o etanol residual poderia interferir na integridade do RNA. Após esse tempo, coluna foi novamente transferida para um novo tubo de 1,5 mL livre de DNase e RNase, na qual o fluxo de passagem foi descartado. Foram adicionados 30 μL de tampão REB (tampão de eluição) à coluna, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente na bancada. Após esse tempo, a solução de eluição foi centrifugada por 1 minuto a 8.000 xg. Assim, as amostras de RNA foram incubadas por 5 minutos a 65°C em Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany), sendo aliquotadas e imediatamente acondicionadas em freezer à -80°C, separadas de acordo com a data da colheita e estação do ano.

5.4. Avaliação da Concentração, Qualidade e Integridade das Amostras de RNA Total

A concentração e a qualidade do RNA total das amostras foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA), sendo consideradas puras aquelas que apresentassem razões de absobância (A260/A280 nm) entre 1,8 e 2,0. Para avaliar a integridade, o RNA total das amostras foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizadas no equipamento Gel DocTM XR+System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em freezer a -80°C para a síntese de cDNA, separadas de acordo com a data da colheita e estação do ano.

5.5. Síntese de cDNA

Antes de iniciar a síntese de cDNA, a bancada do laboratório e as pipetas foram borrifadas com a solução RNaseZap (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). O procedimento foi realizado utilizando-se luvas nitrílicas

descartáveis, ponteiras com barreiras e tubos de 200 µL próprios para PCR livres de DNase/RNase, sendo todo o material autoclavado.

As reações de transcriptase reversa (RT) para a síntese de cDNA das amostras de RNA total foram realizadas com o uso do RT² First Strand Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), conforme protocolo proposto pelo fabricante, como descrito a seguir. Inicialmente, todos os reagentes foram centrifugados à velocidade máxima por 15 segundos. Em seguida, foi preparado um mix de eliminação de DNA genômico em tubos de 200 µL, específico para cada amostra. Em cada mix, adicionou-se um volume de RNA correspondente a uma massa de 400 ng, 2 µL de Tampão GE e quantidade variável de água deionizada livre de nucleases, obtendo-se uma reação com volume final de 10 µL. O mix foi incubado por 5 minutos a 42°C no Thermal Cycler T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), e imediatamente colocado no gelo por 1 minuto. Posteriormente, foi preparado o mix de transcriptase reversa (RT): 4 µL de 5x tampão BC3, 1 µL de P2, 2 µL de RE3 transcriptase reversa e 3 µL de água deionizada livre de nucleases, obtendo-se um volume final de 10 µL. Após isso, adicionou-se 10 µL do mix de transcriptase reversa (RT) em cada tubo contendo 10 µL do mix de eliminação de DNA genômico, misturando-se por pipetagem. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C, em seguida, por mais 5 minutos a 95°C no Thermal Cycler T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Posteriormente, adicionaram-se 91 µL de água deionizada livre de nucleases, misturando-se várias vezes a solução por pipetagem. As amostras de cDNA foram aliquotadas em tubos de 200 µL livres de DNases e RNases e acondicionadas em freezer a -80°C para a quantificação relativa pela RT-qPCR, separadas de acordo com a data da colheita e estação do ano.

5.6. Genes Alvos Para Análise de Expressão Gênica

Foi avaliada a expressão gênica do interferon gama (IFN-γ), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α), Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 12B (IL-12B), nos 10 animais dos extremos de resistência/suscetibilidade às babesioses bovinas e aos carrapatos. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os respectivos genes foram descritas previamente por Puech et al. (2015). No Quadro 4 estão descritos as sequências destes

oligonucleotídeos, o tamanho dos produtos de amplificação, e a região gênica amplificada.

Quadro 4. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR para análise dos genes alvos, tamanho dos produtos de amplificação e, as respectivas localizações nos genes.

Gene Alvo	Iniciadores	Sequência (5' > 3')	Produto (pb)	Posição no Éxon
IFN- γ	(F)	CAGAGCCAAATTGTCTCCTTC	167	E3
	(R)	ATCCACCGGAATTTGAATCAG		E3-E4
TNF- α	(F)	CCAGAGGGAAGAGCAGTCC	111	E1-E2
	(R)	GGCTACAACGTGGGCTACC		E3-E4
IL-10	(F)	CTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC	239	E2-E3
	(R)	CTCACTCATGGCTTTGTAGACAC		E5
IL-12B	(F)	CAGCAGAGGCTCCTCTGAC	237	E3-E4
	(R)	GTCTGGTTTGATGATGTCCCTG		E4-E5

(F) Forward; (R) Reverse

5.7. Otimização da RT-qPCR para os Genes Alvos e de Referência para Análise de Expressão Gênica

Amostras de cDNA dos animais experimentais, sintetizados a partir de uma massa de 400 ng de RNA total foram utilizados na padronização da RT-qPCR para os genes alvos e de referência. Inicialmente foi realizada uma reação de gradiente de temperatura no Thermal Cycler T100TM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), sendo testadas seis diferentes temperaturas obtidas ao acaso pelo aparelho, compreendidas entre 53,6 °C e 62,1°C, de acordo com a temperatura de anelamento de cada par dos oligonucleotídeos iniciadores. Apesar da pouca variação entre as temperaturas, observou-se que a temperatura de 60°C foi aquela que possibilitou uma menor variação entre as duplicatas para cada gene em questão.

Todas as reações foram realizadas no equipamento CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), na qual as RT-qPCR foram preparadas em duplicatas, em tubos brancos de perfil baixo em tiras (Low-Profile 0,2ml 8-Tube Strips without Caps, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de 200 μ L, livres de DNases e RNases, em volume final de 13 μ L, contendo 8 μ L de “Tampão de Reação” e 5,0 μ L de cDNA dos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, empregando-se

os seguintes volumes de reagentes: 6,0 µL de Ssofast™EvaGreen®Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 0,30 µM de cada oligonucleotídeo a 10 µL (IFN-γ F e IFN-γ R; TNF-α F e TNF-α R; IL-10 F e IL-10 R; IL-12B F e IL-12B R; GAPDH F e GAPDH R; β-Actina F e β-Actina R; YWHAZ F e YWHAZ R), 1,2 µL de água deionizada livre de nucleases e 5,0 µL de cDNA. Os tubos em tiras contendo as reações foram fechados com tampas ópticas (Optical Flat-Cap Strips, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A leitura de cada ensaio foi realizada de acordo com o descrito no Quadro 5.

Quadro 5. Perfil térmico adotado na RT-qPCR para análise de expressão gênica.

Etapa do Ciclo	Ciclo	Temperatura	Tempo
Ativação Enzimática	1	95 °C	2 minutos
Desnaturação	45	95 °C	5 segundos
Anelamento/Extensão		60 °C	30 segundos
Curva de Dissociação	1	65-95 °C (incremento de 0,5 °C)	5 segundos/passos

5.8. Escolha dos Genes de Referência

Foram testados três genes de referência, com a finalidade de se obter o de maior estabilidade dentre os selecionados, possibilitando a quantificação relativa dos genes alvos. Os genes de referência utilizados foram o GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e β-Actina (ACTB), cujos iniciadores foram descritos por Robinson et al. (2007) e o YWHAZ (tirosina 3-monoxigenase/ativação da proteína triptofano 5-monoxigenase, polipeptídeo zeta) por Puech et al. (2015). No Quadro 6 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos, o tamanho dos produtos de amplificação e, a região gênica amplificada.

Quadro 6. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR para análise dos genes referência, tamanho dos produtos de amplificação e, as respectivas localizações nos genes.

Gene de Referência	Iniciadores	Sequência (5' > 3')	Produto (pb)	Posição no Éxon
GAPDH	(F)	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	119	E6
	(R)	CCCTCCACGATGCCAAAGT		E7
β -Actina	(F)	AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT	244	E6
	(R)	ATCCAACCGACTGCTGTCA		E6
YWHAZ	(F)	GAAAGGGATTGTGGACCAG	183	E3-E4
	(R)	GGCTTCATCAAATGCTGTCT		E4-E5

(F) Forward; (R) Reverse

Para a determinação dos genes de referência foram utilizadas amostras de cDNA de quatro animais, dentre aqueles classificados fenotipicamente como resistentes/suscetíveis.

A escolha foi baseada na ferramenta RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>), a qual foi desenvolvida para a avaliação e triagem dos genes de referência a partir de conjuntos de dados experimentais. Esta ferramenta integra os principais softwares computacionais disponíveis atualmente (geNorm, Normfinder, BestKeeper, e o método comparativo Δ -Ct) para comparar e classificar os genes de referência testados. Com base nos *rankings* de cada programa, a ferramenta atribuiu um peso adequado a um gene individual e calculou a média geométrica de seus pesos para o *ranking* final global.

5.9. Avaliação da Eficiência (E) dos Genes de Referência e Genes Alvos

A eficiência (E) de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores foi estimada mediante a análise no software LingRegPCR (RUIJTER et al., 2009), a qual utiliza a regressão linear para avaliar a eficiência (E) da qPCR. Os resultados foram analisados com base nos dados de fluorescência e valores do ciclo de quantificação (C_q) definidos após o término de cada reação para cada gene, exportados do software do equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

As amostras foram quantificadas em triplicatas, sendo necessárias 10 amostras de cDNA dos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade para cada gene (GAPDH, β -Actina, YWHAZ, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12B). Para avaliar a existência de contaminação em cada reação, foram utilizados três controles negativos para cada gene (sem amostra de cDNA). As condições de termociclagem empregadas no equipamento de qPCR e quantidades dos reagentes utilizados na preparação do “tampão de reação”, foram as mesmas descritas anteriormente para a otimização das temperaturas de anelamento. Para esta análise, foi avaliada uma única concentração de cDNA, obtida à partir de uma massa de 400 ng de RNA total.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foram utilizadas transformações matemáticas visando aproximar a distribuição dos dados de contagem de carrapatos e estimativa dos níveis de parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* nos bovinos, de distribuições normais. Após as transformações, os dados foram analisados utilizando a metodologia de modelos mistos. O modelo de análise incluiu, além dos efeitos fixos de colheitas, o efeito aleatório de animal, sendo utilizada uma matriz de (co)variância de simetria composta para modelar o efeito de animal. Uma análise preliminar, com os dados das oito primeiras coletas, sob o mesmo modelo, foi realizada para proceder à seleção dos animais extremos para resistência/sensibilidade. Os valores preditos dos efeitos de animal foram utilizados para discriminar aqueles mais resistentes/suscetíveis. Dentre os animais do rebanho, foram selecionados cinco animais de cada extremo com base em um índice que considerou em proporções iguais os valores preditos para a quantificação do número de cópias (NC) de *B. bovis* e *B. bigemina* e a contagem de carrapatos. Coeficientes de correlação de Pearson foram estimados entre as contagens de carrapatos e número de cópias de cada espécie de hemoparasita. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS (2001).

6.1. Quantificação Relativa da Análise de Expressão Gênica pela RT-qPCR

Os dados obtidos pela técnica de transcrição reversa, seguido da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram analisados por um modelo linear misto, conforme proposto por Steibel et al. (2009), a fim de avaliar os níveis de expressão do IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12B e do gene de referência YWHAZ nas diferentes estações do ano comparando os animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, por meio da seguinte fórmula:

$$y_{ijklm} = ESG_{jkl} + A_{ik} + e_{ijklm}$$

Onde:

- i , refere-se ao animal;
- j , a estação em que a amostra foi coletada;
- K , a classificação do animal quanto à resistência, conforme descrito anteriormente e;
- l , o gene de interesse.

O valor y_{ijklm} é a média de duas replicações biológicas do Cq obtido para o animal i animal na estação j , correspondendo ao grupo resistente/suscetível para o gene (referencia ou alvo) l . O fator ESG_{jkl} modela a interação entre os efeitos de estação de colheita e grupo extremo (resistente ou suscetível) com cada gene (alvo ou referência). O efeito aleatório de animal dentro de grupo extremo foi incluído para considerar a variabilidade para cada animal. Foi considerada a possibilidade de heterogeneidade de variâncias entre o gene referência e cada um dos genes alvo. O modelo foi ajustado utilizando-se o procedimento "Mixed" do SAS (SAS Institute, Cary, NC). A expressão diferencial foi avaliada por contrastes estimados para a interação entre grupos, estação e genes.

7. RESULTADOS

7.1. Análise do DNA

7.1.1. Avaliação da concentração e pureza das amostras de DNA

Foi possível observar por meio dos resultados obtidos em espectrofotômetro, a concentração e pureza das amostras de DNA extraída após a colheita de sangue dos bovinos, nas diferentes estações do ano, ao longo do período experimental. A Tabela 2 mostra as médias da concentração e do desvio-padrão de amostras de sangue, expressas em ng/μL e a média das razões das absorbâncias na faixa de A260/A280 nm. Algumas amostras por colheita apresentaram média de absorbância (A260/A280nm) fora do intervalo considerado ideal de 1,8 e 2,0 sendo responsáveis pelos valores fora do padrão observado para a média na maioria das colheitas. Apesar da baixa qualidade de parte dessas amostras, este fato não interferiu na amplificação do DNA dos hemoparasitas.

Tabela 2. Avaliação da concentração e pureza das amostras de sangue avaliadas em Nano-Drop ND-1000, de acordo com as colheitas realizadas.

Colheitas	Média e Desvio-Padrão da Concentração do DNA ng/μL	Média A260/A280 nm
3	50,59 ± 28,88	1,58
4	51,05 ± 33,15	1,68
6	61,75 ± 47,70	1,72
7	81,25 ± 27,59	1,72
9	84,02 ± 35,00	1,84
10	71,40 ± 43,89	1,66
12	57,78 ± 24,78	1,79
13	66,40 ± 14,83	1,78
15	61,57 ± 17,66	1,70
16	65,96 ± 19,61	1,64
18	77,80 ± 18,27	1,62
19	76,15 ± 16,91	1,72
21	79,06 ± 20,34	1,72
22	78,54 ± 15,08	1,76
23	78,63 ± 17,67	1,94
24	73,77 ± 25,16	1,95
Geral	69,73±25,41	1,71

7.1.2. Especificidade e eficiência (E) da qPCR para *B. bovis* e *B. bigemina*

Foram realizados 32 ensaios de qPCR para cada espécie de babesia, incluindo uma curva de calibração por reação, amostras de DNA dos animais experimentais, quatro amostras de controle negativo (sem DNA) e duas amostras de isolados dos hemoparasitas que funcionaram como controle positivo.

De modo geral, a quantificação pela qPCR possibilitou estimar a prevalência e o grau de parasitemia por *Babesia* spp. nos bovinos da raça Canchim utilizados no presente estudo. Os resultados obtidos demonstraram que os hemoparasitas foram diagnosticados em 98% dos animais do rebanho, exceto em 2% das amostras de DNA que corresponderam às colheitas 23 e 24 realizadas em junho e julho de 2015 (inverno), representando um total de 1,1% (13/1179) para *B. bovis* e 2,8% (33/1184) para *B. bigemina* de animais negativos. Na Tabela 3 estão apresentados a porcentagem de animais considerados negativos pela qPCR separados por espécie de hemoparasitas, de acordo com a colheita. No entanto, 88,2% e 83,9% das amostras de DNA que puderam ser quantificadas para *B. bovis* e *B. bigemina*, de acordo com o intervalo de quantificação estabelecido nas curvas de calibração e pela temperatura média na curva de dissociação específica para cada espécie de babesia, 98% e 95,4% das mesmas foram positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Tabela 3. Porcentagem de animais considerados negativos pela técnica de qPCR separados de acordo com a colheita, espécie e número total de amostras avaliadas por colheita.

Colheita	% Total de Animais Negativos, Número de Animais Negativos/Colheita e Número Total de Animais/Colheita	
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
23	20,83% (10/48)	31,25 % (15/48)
24	6,25% (3/48)	37,5% (18/48)
Geral	1.1% (13/1179)	2,8%(33/1184)

A análise da curva de dissociação em cada ensaio permitiu distinguir as espécies de babesias avaliadas. *B. bovis* apresentou uma temperatura média na curva de dissociação de 77,5°C e *B. bigemina* de 76,0°C. As Figuras 1 e 2 mostram as curvas de amplificação e de dissociação, indicando boa especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores.

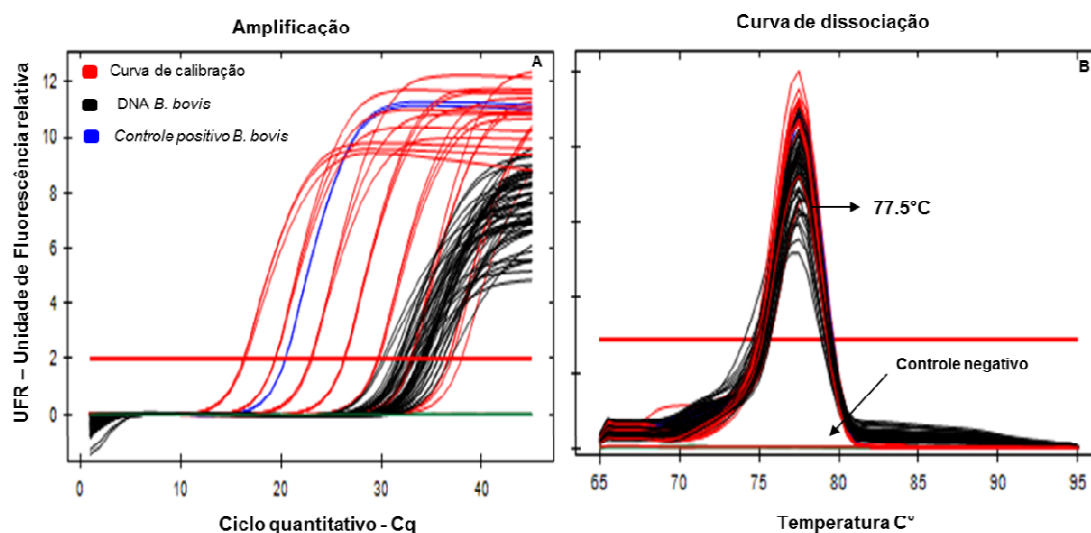


Figura 1. Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) para *B. bovis* obtida pela qPCR.

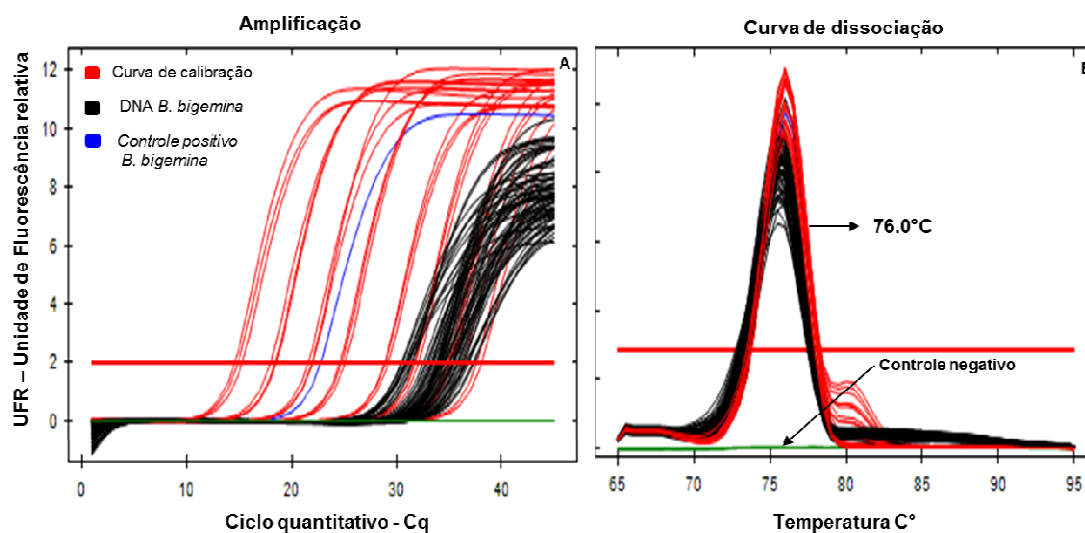


Figura 2. Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) para *B. bigemina* obtida pela qPCR.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores da eficiência da reação (E), o *slope* (coeficiente de angulação) e o coeficiente de determinação (r^2) de cada ensaio de qPCR realizado para a quantificação do DNA alvo. Os resultados observados ficaram próximos aos valores teóricos considerados ideais para a

eficiência de reação que é de 100%, coeficiente de angulação da reta de -3,324 para *B. bovis*, -3,319 para *B. bigemina* e $r^2 > 0,99$ para ambas as espécies. Nestas condições, para cada 3,324 e 3,319 ciclos de amplificação, respectivamente, transcorridos na fase exponencial da reação, a concentração dos amplicons da qPCR aumenta 10 vezes. Estes valores indicam boa padronização dos oligonucleotídeos iniciadores para *B. bovis* e *B. bigemina* e ótima qualidade das amostras de DNA utilizadas.

Tabela 4. Valores da eficiência da reação (E), *slope* e coeficiente de determinação (r^2) para cada placa analisada no experimento por qPCR.

Colheita	<i>Babesia bovis</i>				<i>Babesia bigemina</i>			
	Placa	E	<i>Slope</i>	r^2	Placa	E	<i>Slope</i>	r^2
3	1	99,40	3,336	0,996	1	99,70	3,329	0,998
	2	96,10	3,419	0,997	2	101,70	3,283	0,997
4	3	99,40	3,335	0,997	3	97,20	3,392	0,998
	4	98,10	3,367	0,992	4	100,30	3,314	0,995
6	5	98,20	3,367	0,998	5	102,00	3,274	0,995
	6	100,50	3,310	0,996	6	101,50	3,287	0,998
7	7	98,60	3,356	0,995	7	99,70	3,329	0,996
	8	101,80	3,279	0,997	8	100,00	3,322	0,997
9	9	106,30	3,181	0,995	9	102,70	3,259	0,995
	10	97,70	3,378	0,996	10	101,70	3,283	0,990
10	11	99,40	3,337	0,996	11	98,80	3,351	0,998
	12	98,70	3,353	0,999	12	97,00	3,397	0,999
12	13	103,30	3,244	0,996	13	103,20	3,247	0,998
	14	99,30	3,339	0,993	14	98,30	3,363	0,998
13	15	100,50	3,311	0,999	15	102,00	3,276	0,998
	16	105,00	3,208	0,997	16	98,10	3,369	0,994
15	17	101,30	3,291	0,997	17	97,00	3,397	0,998
	18	101,00	3,299	0,997	18	97,30	3,388	0,998
16	19	96,40	3,413	0,998	19	99,90	3,323	0,998
	20	100,80	3,303	0,998	20	101,60	3,283	0,998
18	21	99,40	3,337	0,999	21	99,40	3,337	0,998
	22	99,60	3,332	0,999	22	101,20	3,293	0,999
19	23	96,00	3,422	0,994	23	99,10	3,345	0,997
	24	94,90	3,450	0,999	24	95,90	3,424	0,999
21	25	100,40	3,313	0,995	25	102,20	3,270	0,999
	26	99,10	3,345	0,998	26	100,00	3,322	0,995
22	27	99,90	3,324	0,999	27	99,80	3,326	0,996
	28	102,00	3,275	0,996	28	101,10	3,295	0,996
23	29	100,50	3,311	0,995	29	99,80	3,326	0,996
	30	99,90	3,323	0,997	30	104,50	3,219	0,994
24	31	102,00	3,275	0,997	31	100,80	3,304	0,994
	32	103,50	3,241	0,997	32	102,70	3,258	0,994
Média	32	99,97	3,324	0,997	32	100,19	3,318	0,997

7.1.3. Sensibilidade de quantificação de *B. bovis* e *B. bigemina* pela qPCR

A construção da curva de calibração específica para *B. bovis* e *B. bigemina* em cada ensaio de qPCR, possibilitou a quantificação absoluta do número de cópias/ μL dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para cada espécie de babesia.

A curva de calibração de ambas as espécies apresentaram uma faixa de quantificação entre 10^{-10} e 10^{-3} . A sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores permitiu a quantificação de aproximadamente 12 cópias/ μL (0,02 fg) de DNA alvo nas amostras de sangue dos bovinos (último ponto da curva de calibração) para *B. bovis* e *B. bigemina*. As amostras de sangue dos animais experimentais que não apresentaram amplificação nesta faixa de quantificação (confirmadas na curva de dissociação) ou aquelas que apresentaram amplificação, mas os valores da temperatura média da curva de dissociação não se adequaram aos valores para a determinação de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram consideradas negativas e não puderam ser quantificadas.

7.1.4. Quantificação absoluta de *B. bovis* e *B. bigemina* e contagem de *R. (B.) microplus* nos animais experimentais

Com a utilização da qPCR absoluta foi possível obter a estimativa da parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos da raça Canchim durante o período experimental.

Neste estudo utilizou como DNA alvo, fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para cada espécie de babesia. Entretanto, o número de cópias do DNA alvo em cada protozoário é variável podendo atingir até 1000 cópias. Assim, a utilização desses oligonucleotídeos iniciadores nos ensaios de qPCR gerou inconvenientes, pois permitiu apenas estimar relativamente a quantidade de DNA dos hemoparasitas. Esta sequência de DNA mitocondrial foi preferida em relação a uma sequência de DNA nuclear, porque a repetição permitiu aumentar a quantidade de DNA alvo nas amostras de DNA dos bovinos (composta majoritariamente pelo DNA do hospedeiro vertebrado) elevando, dessa maneira, a sensibilidade do teste.

Com relação ao número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) das espécies de babesia

e interação de ambas com as colheitas realizadas nas diferentes estações do ano, durante o período experimental. As médias do NC e o desvio-padrão de *B. bovis* e *B. bigemina* foram de $1,66 \pm 0,02$ e $1,78 \pm 0,03$, respectivamente.

Na Figura 3, verifica-se que as médias do NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de *B. bigemina* e *B. bovis* variaram entre as diferentes estações. Nota-se também que, as maiores quantificações ocorreram no início do experimento, na primavera de 2013, a qual decresceu nas estações subsequentes, até o outono de 2014, voltando a aumentar no inverno do mesmo ano. A partir da próxima estação (primavera 2014), ocorreram variações nas quantificações, na qual a parasitemia voltou a diminuir a partir do outono de 2015, se estendendo até o início do inverno de 2015, quando voltou a aumentar, embora a quantificação tenha se mantido em níveis baixos. Observa-se também que, muitas vezes, quando a contagem do número de carrapatos aumentou ou diminuiu, o mesmo comportamento foi verificado para as médias do NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies de babesias.

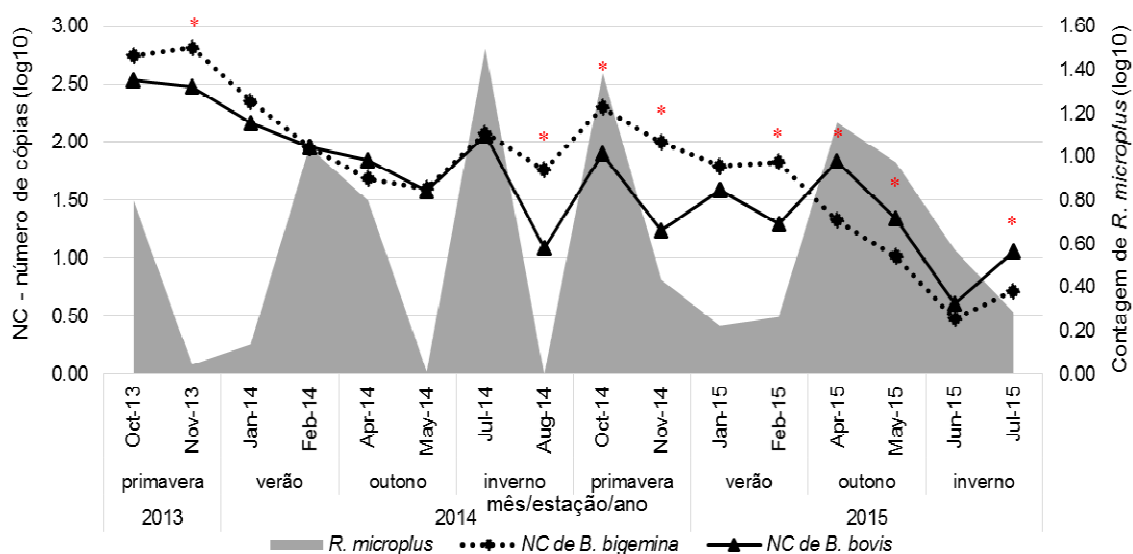


Figura 3. Distribuição das médias do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* e contagem de *R. (B.) microplus* durante os meses (estação/ano) das avaliações.

No que se refere às contagens de carrapatos, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os meses das avaliações. Para esta análise, no entanto, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nas colheitas realizadas entre novembro de 2013 a janeiro de 2014 e entre os meses janeiro e fevereiro de 2015 (Figura 3).

Pela análise descrita na Tabela 5, observa-se que a contagem de *R. (B.) microplus* foi inicialmente alta na primavera de 2013, diminuindo no verão de 2014, e elevando-se no outono e no início do inverno, respectivamente, sendo que neste último apresentou a maior contagem dentre as estações do ano avaliadas. Na primavera do mesmo ano, houve um aumento considerável nas contagens de carrapatos, apresentando uma diminuição gradativa até a metade do verão de 2015. Posteriormente, no início do outono de 2015, as contagens voltaram a se elevar, entrando em declínio na estação subsequente e estendendo-se até o término do experimento.

Para as médias do NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de *B. bigemina* ao longo das colheitas, não ocorreram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as colheitas 3 e 4 (primavera de 2013), 9 e 10 (outono de 2014), 16 e 18 (primavera de 2014 e verão de 2015) e 18 e 19 (verão de 2015). Para *B. bovis*, somente entre as colheitas 3 e 4 (primavera de 2013) e 7 e 9 (verão e outono de 2014) não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$). Para as contagens de *R. (B.) microplus* somente entre as colheitas 4 e 6 (primavera de 2013 e verão de 2014), 18 e 19 (verão de 2015) não ocorreram diferenças entre as colheitas.

Tabela 5. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B de *B. bigemina* e *B. bovis* e da contagem de *R. (B.) microplus* de acordo com a estação do ano, considerando os respectivos desvio-padrão.

Ano	Estação	Colheita	Número de Cópias (log10)		Contagem de <i>R. (B.) microplus</i> (log10)
			<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	
2013	Primavera	3	2,75±0,10	2,53±0,08	0,80±0,05
		4	2,81±0,10	2,48±0,08	0,04±0,05
2014	Verão	6	2,35±0,10	2,16±0,08	0,14±0,05
		7	1,96±0,10	1,96±0,08	1,04±0,05
	Outono	9	1,69±0,10	1,85±0,08	0,80±0,05
		10	1,60±0,10	1,58±0,08	0,01±0,05
	Inverno	12	2,08±0,10	2,06±0,08	1,50±0,05
		13	1,76±0,10	1,09±0,08	0,00±0,05
	Primavera	15	2,30±0,10	1,90±0,08	1,38±0,05
		16	2,00±0,10	1,24±0,08	0,44±0,05
2015	Verão	18	1,80±0,10	1,59±0,08	0,22±0,05
		19	1,83±0,10	1,29±0,08	0,26±0,05
	Outono	21	1,33±0,10	1,84±0,08	1,16±0,05
		22	1,02±0,10	1,35±0,08	0,97±0,05
	Inverno	23	0,48±0,10	0,60±0,08	0,57±0,05
		24	0,72±0,10	1,06±0,08	0,28±0,05

7.1.5. Estimativa do coeficiente de correlação entre o número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos de *B. bovis* e *B. bigemina* e entre as contagens de *R. (B.) microplus* com o número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies

A estimativa do coeficiente de correlação do NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* entre si foi baixo (Tabela 6), mostrando que há uma pequena tendência de variação no mesmo sentido entre o NC de ambas as espécies. Para as estimativas de correlações entre o NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies e a contagem de carrapatos foram ainda menores (Tabela 6), especialmente para *B. bigemina*, na qual a correlação foi próxima a zero. Estes resultados indicam que os mecanismos que determinam a resistência aos diferentes parasitas podem ser considerados eventos independentes.

Tabela 6. Correlação estimada entre o NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* e entre a contagem de *R. (B.) microplus* com o NC dos fragmentos dos genes mt-cyt B de ambas as espécies, durante as estações do ano.

Espécie	Medida de Associação	
	<i>B. bovis</i>	<i>R. (B.) microplus</i>
<i>B. bigemina</i>	0,17	0,04
<i>B. bovis</i>	-	0,12

7.2. Influência das Condições Climáticas na Infestação por *R. (B.) microplus*

Para avaliar os fatores climáticos que podem influenciar na fase de vida livre do carrapato *R. (B.) microplus* e, conseqüentemente, no grau de infestação dos animais, informações de médias mensais de precipitação pluviométrica (mm), temperatura (°C) e umidade relativa (UR%) foram colhidas na estação meteorológica do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa, São Carlos-SP, durante o período compreendido de agosto de 2013 a julho de 2015.

A Figura 4 apresenta as médias mensais de precipitação pluviométrica (mm) e de temperatura (°C). Após um período seco com pouca severidade no inverno de 2013, as chuvas retornaram na região no início de setembro. Observa-se, que desde o início de dezembro deste ano os volumes de chuva foram abaixo da normalidade, sendo o ano de 2014 extremamente seco comparado com as médias normais da região de São Carlos-SP. O período de menor índice de precipitação pluviométrica foi entre os meses de junho (outono) e agosto de 2014 (inverno), coincidindo com as menores temperaturas. Todavia, em fevereiro de 2015 (verão) foi registrado o maior índice.

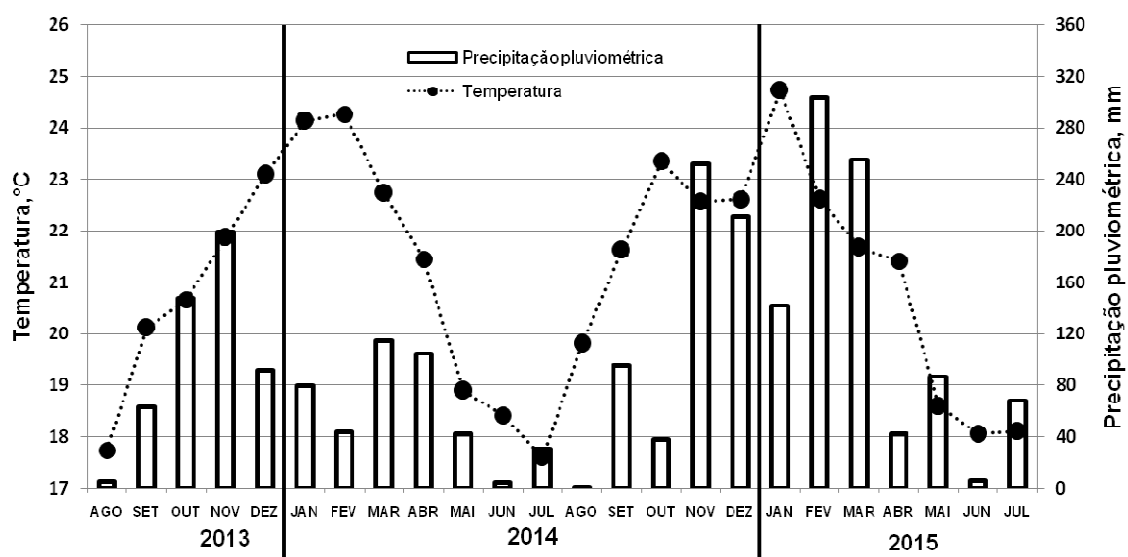


Figura 4. Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm) em São Carlos-SP.

A Figura 5 apresenta a distribuição das médias de precipitação pluviométrica (mm) e da contagem de *R. (B.) microplus* durante o período das avaliações (estação/ano). Neste estudo, as maiores contagens de carrapatos foram observadas nas colheitas de julho e outubro de 2014, nas quais as médias mensais de temperatura variaram de 17,6°C a 23,3°C e as de precipitação pluviométrica de 30,4 mm a 38,0 mm, enquanto que as menores contagens ocorreram em colheitas de maio e agosto de 2014, nas quais as médias mensais de temperatura variaram de 18,9°C e 19,8°C e as de precipitação pluviométrica de 41,8 mm e 0,6 mm. Entretanto, em fevereiro de 2015 (verão) foi registrado o maior índice pluviométrico (303,0 mm), sendo verificada baixa contagem de carrapatos ($0,26 \pm 0,05$).

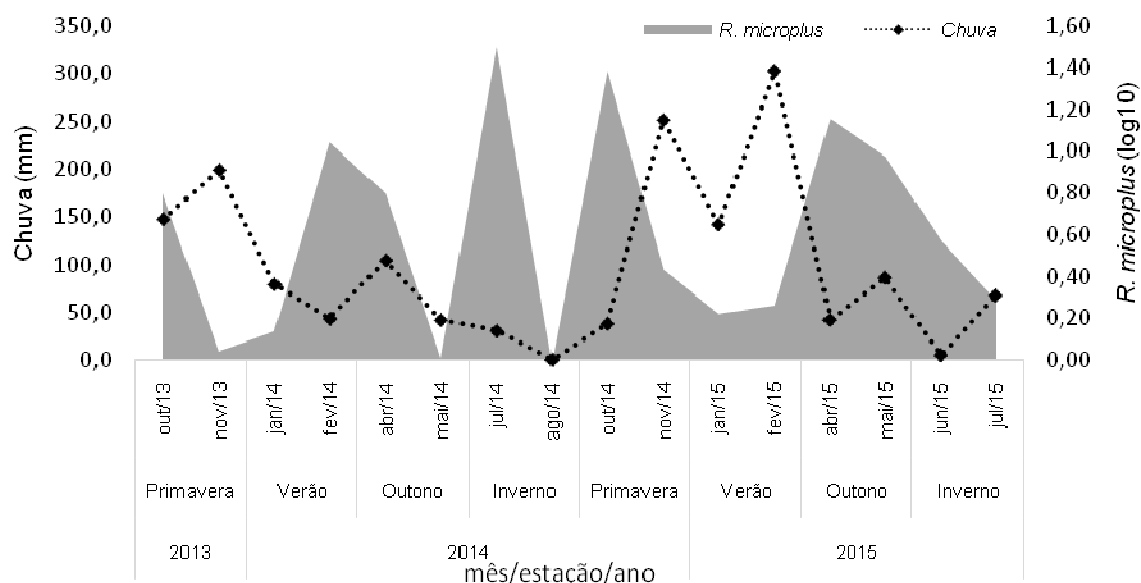


Figura 5. Distribuição da contagem de *R. (B.) microplus* e precipitação pluviométrica (mm) durante os meses (estação/ano) das avaliações.

A Figura 6 mostra a distribuição das médias da umidade relativa (UR%) e da contagem de *R. (B.) microplus* durante o período das avaliações (estação/ano). Na colheita realizada em fevereiro de 2015 (verão) a umidade relativa do ar foi de 85,4%, sendo a maior média mensal durante todo o período experimental, coincidindo também com o maior índice de precipitação pluviométrica (303,0 mm). Em contrapartida, o menor índice registrado foi em agosto de 2014 (58,5%) no inverno, coincidindo também com o menor índice de precipitação pluviométrica (0,6 mm) e contagem de carrapatos ($0,00 \pm 0,05$).

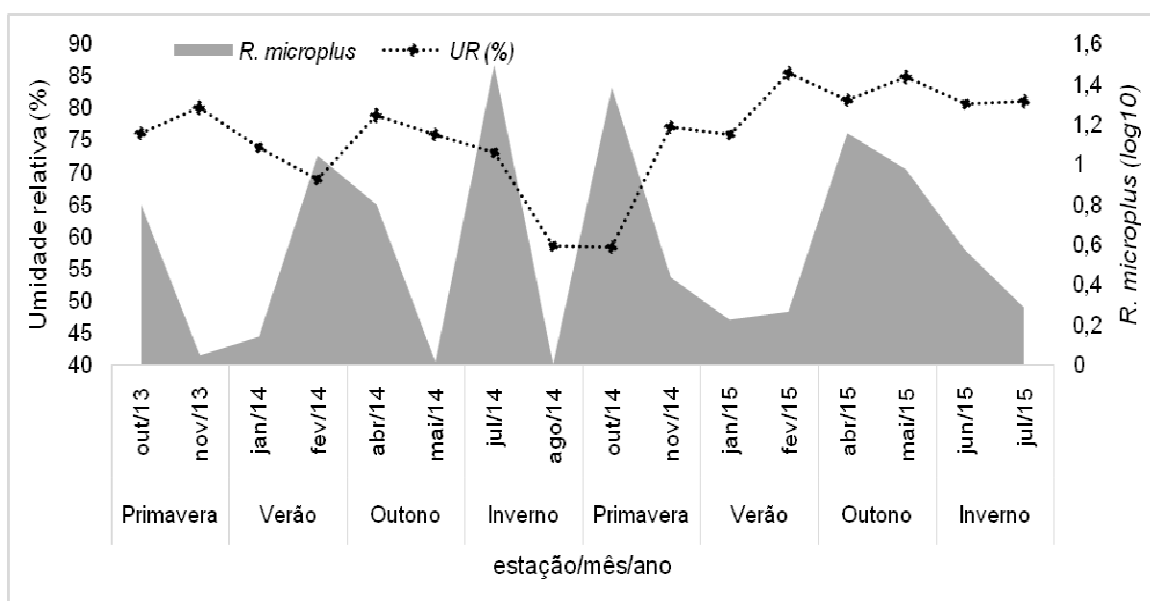


Figura 6. Distribuição das contagens de *R. (B.) microplus* e umidade (%) durante os meses (estação/ano) das avaliações.

7.3. Análise de Expressão Gênica

7.3.1. Avaliação das amostras de RNA total

Todas as amostras purificadas foram consideradas puras e íntegras, pois apresentaram razões de absorbância entre 1,8 e 2,0 e perfil eletroforético compatível com integridade do RNA total, respectivamente. A Tabela 7 mostra a média da concentração e o desvio-padrão das amostras de RNA total dos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, obtidas em NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) expressas em ng/μL, e a média das razões das absorbâncias na faixa de A260/A280 nm.

Tabela 7. Avaliação em Nano-Drop ND-1000 das amostras purificadas de RNA total dos animais dos extremos de resistência e suscetibilidade, realizadas nas diferentes estações do ano.

Estação	Média e Desvio-Padrão da Concentração do RNA ng/μL	Média A260/A280 nm
Primavera	69,16 $\pm$ 19,97	2,19
Verão	76,08 $\pm$ 14,63	2,11
Outono	85,83 $\pm$ 24,64	2,15
Inverno	102,07 $\pm$ 51,6	2,11

As Figuras 7 e 8 mostram os resultados obtidos por meio da eletroforese visualizadas no transiluminador, na qual evidencia a integridade das amostras de RNA total purificadas.

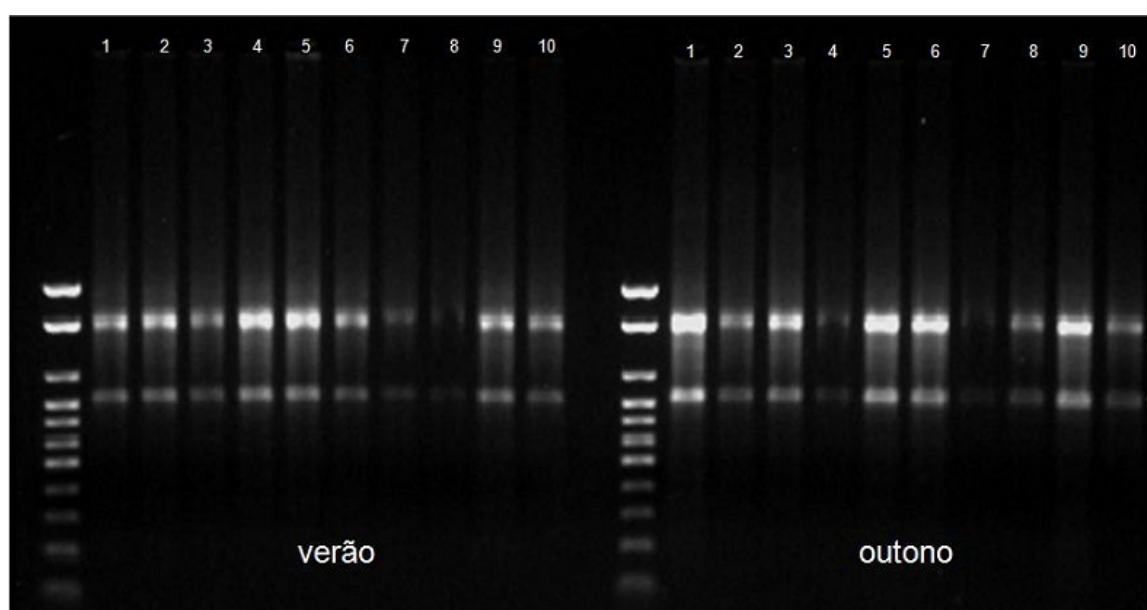


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras de RNA total, referente às colheitas realizadas no verão e outono de 2015, visualizadas em transiluminador.

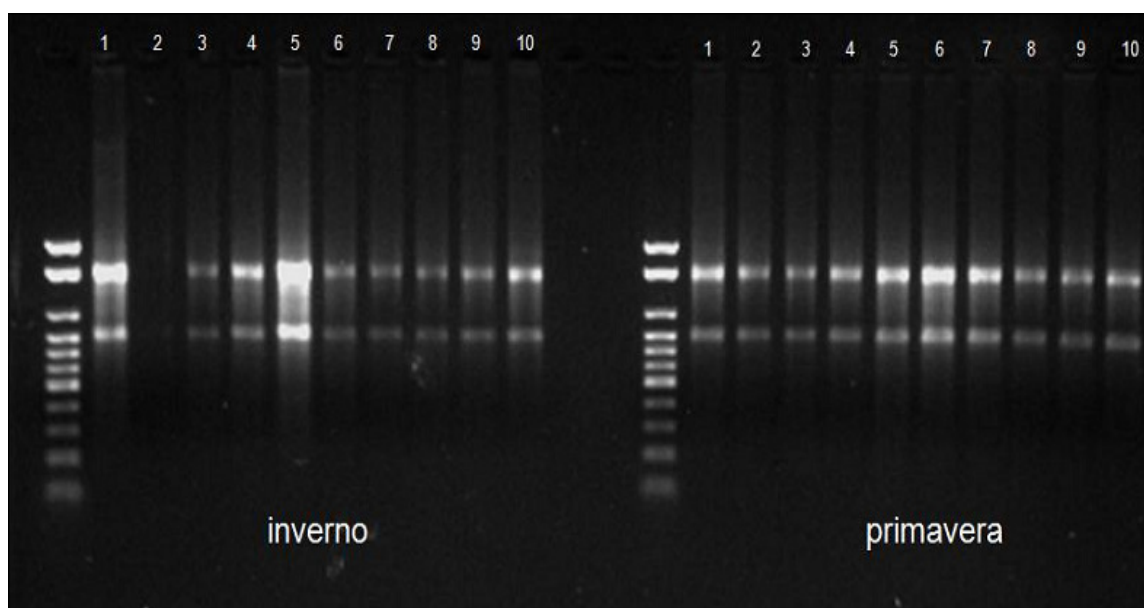


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1% de amostras de RNA total, referente às colheitas realizadas no inverno e primavera de 2015 visualizadas, em transiluminador.

7.3.2. Determinação do gene de referência para validação da expressão dos genes alvos

O gene YWHAZ apresentou o melhor (menor) valor da média geométrica dentre os três genes de referências avaliados. Na Tabela 8 está apresentada a ordem de ranqueamento determinada pela ferramenta RefFinder, seguido pelas análises dos programas utilizados para estes genes. Somente no *ranking* do programa Genorm, os genes YWHAZ e GAPDH se apresentaram como as melhores opções com relação ao gene da β -Actina.

Tabela 8. Classificação dos genes de referência de acordo com a ordem de *ranking* determinada pela ferramenta RefFinder.

Ordem de <i>Ranking</i> (Melhor Média)			
Programa	1	2	3
Delta CT	YWHAZ	GAPDH	β -Actina
BestKeeper	YWHAZ	GAPDH	β -Actina
Normfinder	YWHAZ	GAPDH	β -Actina
Genorm	GAPDH/YWHAZ	-	β -Actina
<i>Ranking</i> abrangente de classificação	YWHAZ	GAPDH	β -Actina

A Figura 9 demonstra a estabilidade dos genes de referência testados, de acordo com a ordem de *ranking* determinada pela ferramenta RefFinder.

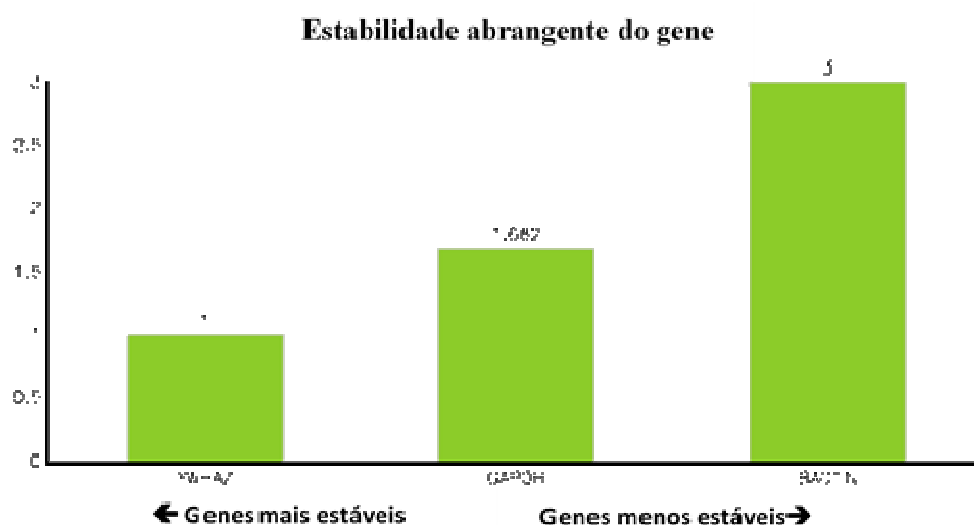


Figura 9. Estabilidade dos genes de referência avaliados no estudo de expressão gênica, seguido dos valores das médias geométricas para YWAZ, GAPDH e β-Actina.

7.3.3. Análise de expressão gênica pela RT-qPCR

O valores de eficiência da reação (E) obtidos pelo software LinRegPCR, calculados para cada gene de referência e alvo estão apresentados no Quadro 7 abaixo.

Quadro 7. Valores de eficiência da reação (E) da RT-qPCR para os genes de referência e genes alvos avaliados no estudo de expressão gênica.

Amostra	β-Actina	GAPDH	YWAZ	IFN-γ	TNF-α	IL-10	IL-12
1	98,09	97,97	97,78	98,06	98,02	98,04	98,07
2	97,96	97,96	98,03	97,98	98,14	98,05	97,66
3	97,99	98,00	97,97	97,96	98,05	98,06	97,97
4	98,08	97,98	97,93	98,05	98,18	98,05	98,08
5	98,02	98,04	97,95	97,94	98,17	97,97	98,04
6	97,95	97,77	97,97	97,96	98,24	98,03	98,07
7	97,98	97,85	97,99	98,11	98,04	97,97	97,98
8	97,97	97,95	98,13	98,15	98,15	98,05	98,00
9	97,99	97,95	98,11	98,03	98,05	97,93	98,05
10	97,96	98,10	98,09	97,99	98,17	98,02	97,94
Média	98,007	97,970	97,997	98,018	98,122	98,013	97,985

As análises estatísticas dos dados de quantificação relativa dos genes IFN- γ , TNF- α e IL-12B revelaram que houve um efeito significativo ($P < 0,05$) da interação entre os animais dos extremos de resistência/suscetibilidade e estações do ano avaliadas. Para a IL-10 o perfil de expressão permaneceu constante durante todo período experimental considerado para este estudo. Entretanto, quando avaliada uma determinada estação do ano isoladamente (primavera, verão, outono e inverno), para cada gene alvo em questão (IFN- γ , TNF- α e IL-12B), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de animais resistentes ou suscetíveis.

De maneira geral, os maiores níveis de expressão dos genes da IL-10, IFN- γ e TNF- α foram observados na primavera e no outono e, somente no outono para a IL-12B. Nota-se também que, no grupo de animais suscetíveis, a expressão das citocinas variou bastante entre as estações do ano, quando comparado ao grupo resistente, embora todos os animais dos extremos de resistência/suscetibilidade tenham apresentado uma tendência de perfil similar de expressão.

O perfil de expressão dos genes da IL-10, IL-12B, IFN- γ e TNF- α em amostras de sangue de bovinos naturalmente infectados com *B. bovis* e *B. bigemina*, nas diferentes estações do ano, estão apresentados na Figura 10. Na primavera e no outono de 2015, especialmente, no grupo extremo resistente, houve uma tendência a níveis mais elevados de expressão da IL-10 quando comparado às demais estações (Figura 10a). Embora não tenha sido observado efeito significativo ($P > 0,05$) da interação entre animais dos extremos de resistência/suscetibilidade e estação do ano para esta citocina.

O outono de 2015 foi à estação de maior expressão da IL-12B, principalmente, no grupo de animais classificados como suscetíveis (Fig 10b). Para o IFN- γ , o verão de 2015 foi à estação de menor expressão desta citocina, especialmente, no grupo extremo resistente. Porém, nas demais estações do ano, houve uma tendência de perfil similar e mais elevado de expressão do IFN- γ , dentre os animais dos extremos avaliados (Fig 10c). As maiores expressões de TNF- α foram observadas na primavera e no outono, principalmente, no grupo de animais classificados como resistentes. No entanto, o menor nível de expressão foi observado no verão, no grupo extremo suscetível (Fig 10d).

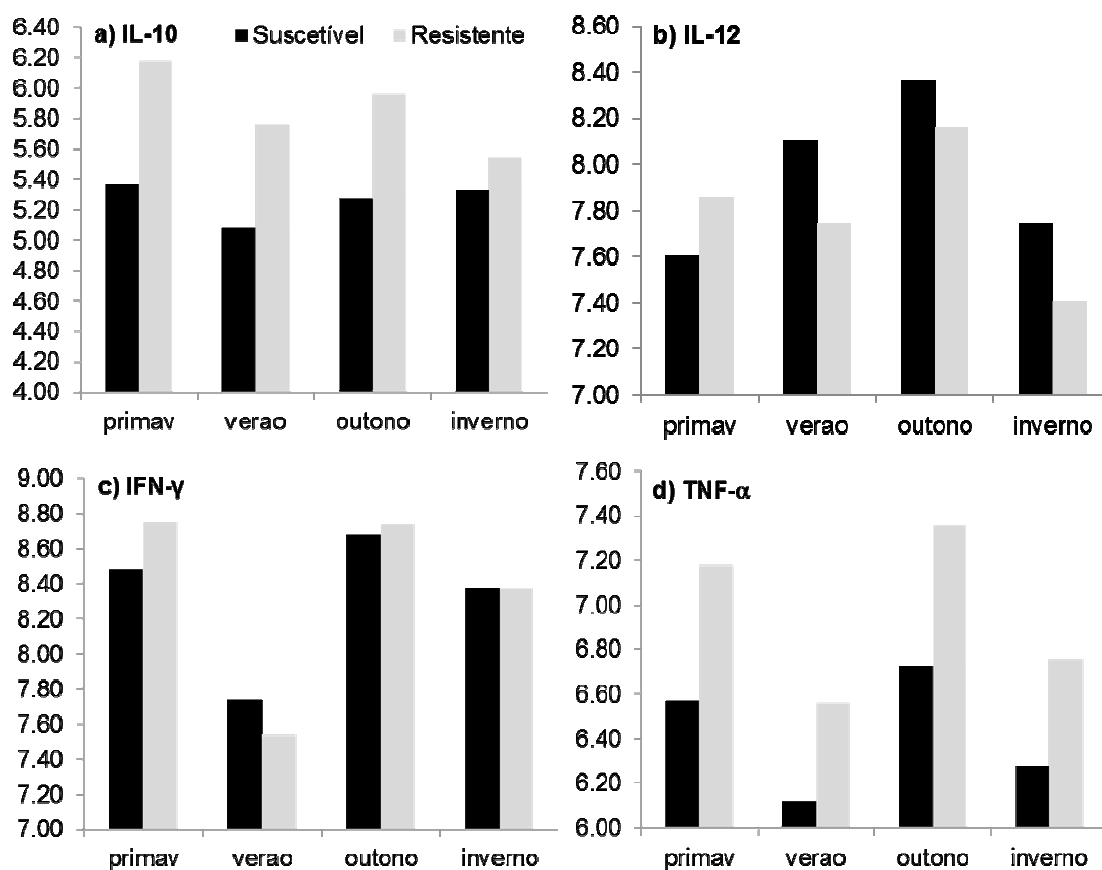


Figura 10. Perfil de citocinas avaliadas no estudo de expressão gênica: IL-10 (a), IL-12B (b), IFN- γ (c) e TNF- α (d), de acordo com a estação do ano, e grupos de animais classificados como resistentes e suscetíveis as babesioses bovinas.

8. DISCUSSÃO

As infestações por *R. (B.) microplus* e as hemoparasitoses transmitidas por esse ácaro são fatores limitantes ao melhor desempenho da pecuária nos trópicos. Animais taurinos, mais produtivos, são muito sensíveis a estes parasitas. A criação de raças mais adaptadas tem sido a saída para a melhor produtividade dos rebanhos brasileiros, com uso moderado de medicamentos. Uma alternativa ao uso de raças zebuínas puras com alta resistência aos carrapatos foi a formação de raças adaptadas. Com este intuito foi criada a raça Canchim ($\frac{5}{8}$ Charolês + $\frac{3}{8}$ Zebu), a qual alia a produtividade dos taurinos à resistência dos animais de origem indiana.

A raça Canchim apresenta suscetibilidade média às infestações por carrapatos quando comparada com animais zebuínos, de acordo com estudos conduzidos previamente (OLIVEIRA et al., 1987; OLIVEIRA e ALENCAR., 1989). Devido a alta proporção de genes de *Bos taurus taurus*, este grupo genético poderia ser considerado suscetível às babesioses bovinas.

As novilhas usadas nesse experimento fazem parte do rebanho experimental do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, localizada em São Carlos-SP. A região de São Carlos-SP apresenta condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do carrapato durante todos os meses do ano. Vários estudos permitiram concluir que esta área apresenta características de estabilidade enzoótica para as babesioses bovinas (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. 2005; OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; GIGLIOTI, 2013; BILHASSI et al., 2014), sendo que a infecção pelos hemoparasitas ocorre nas primeiras semanas de vida dos bezerros, coincidindo com a fase em que estão protegidos pela imunidade inata (como maior produção de óxido nítrico no fígado, presença de timo e resquícios de hemoglobina fetal) e pela imunidade passiva conferida pelo colostro (FARIAS, 1995). Assim, a taxa de transmissão dos hemoparasitas nos sistemas endêmicos estáveis é suficiente para infectar a maioria dos animais jovens (MAHONEY; ROSS, 1972).

Animais que se recuperam da infecção primária, tornam-se portadores crônicos e desenvolvem, pela prolongada exposição ao vetor e pelas constantes inoculações dos agentes infecciosos, sólida imunidade (FARIAS, 1995). Sabe-se que tanto os animais jovens como os adultos infectados desempenham papel importante na manutenção da endemia, visto que atuam como fonte de infecção para os carrapatos (HODGSON, 1992; TAYLOR et al., 2010). De acordo com Melhorn e Schein (1984), a transmissão transovariana de várias espécies de babesias nos carrapatos é a principal explicação para a sua ampla distribuição geográfica.

Neste estudo foram acompanhadas 50 novilhas da raça Canchim por um período de 24 meses, entre os 8-32 meses de idade. Os animais apresentaram infestação pelo carrapato durante todo o período experimental, exceto na colheita realizada em agosto de 2014, sendo constantemente inoculados com os agentes das babesioses bovinas (confirmado pela qPCR). Apesar disso, os animais não mostraram sinais clínicos da doença, em virtude do equilíbrio entre inóculo recebido e o nível de anticorpos anti-babesias produzido (MAHONEY et al., 1972; FARIAS, 1995), exceto um animal do rebanho que precisou ser tratado com babesicida.

Este caso isolado pode estar associado à queda de resistência individual do animal (FARIAS, 1995). No entanto, os bovinos avaliados tiveram contato com o carrapato desde o nascimento, já que são criados de maneira extensiva. Como já mencionado, nesta fase, os bezerros estão protegidos pelos anticorpos colostrais e por fatores não específicos (presença de timo e resquícios de hemoglobina fetal). Após esta fase os animais desenvolvem seus próprios anticorpos e, a constante inoculação de *B. bovis* e *B. bigemina* pelo *R. (B). microplus*, é o responsável pela manutenção dos altos títulos de anticorpos anti-babesias ao longo da vida dos bovinos, que dificilmente adoecem.

Verificar a ocorrência de diferenças nas contagens de carrapatos nos bovinos Canchim durante as estações do ano era um dos objetivos deste experimento. Os animais tinham contato constante com larvas infestantes de carrapatos, por serem criados em pastagens onde o carrapato é encontrado durante todos os meses do ano. E, mesmo nas colheitas em que o número de fêmeas padrão de carrapatos presentes no lado esquerdo do corpo dos animais foi baixo, foi observado um número elevado de ninfas, fato este que

pode explicar as contagens altas nas colheitas subsequentes. Durante o período experimental compreendido de agosto de 2013 a julho de 2015, o rebanho foi banhado cinco vezes com soluções acaricidas, de acordo com a avaliação visual do grau de infestação que indicou a sua necessidade.

A análise das contagens do *R. (B.) microplus* mostrou que na colheita 12, realizada em julho de 2014 no inverno, foi aquela que apresentou a maior média ($1,50 \pm 0,05$), seguida da colheita 15 ($1,38 \pm 0,05$), realizada em outubro do mesmo ano, na primavera. As menores médias foram observadas na colheita 13, realizada em agosto de 2014 no inverno ($0,00 \pm 0,05$), e na colheita 10, realizada em maio de 2014 no outono ($0,01 \pm 0,05$).

De maneira geral, no último ano de monitoramento do rebanho (julho de 2014 a julho de 2015), a análise dos dados de contagem do *R. (B.) microplus* indicou picos de infestação no inverno (julho) e na primavera (outubro) de 2014, com queda acentuada no verão de 2015 (janeiro e fevereiro), o qual voltou a se elevar no início do outono (abril) do mesmo ano. Estes achados discordam daqueles observados por Farias et al. (1995), que observaram uma queda acentuada da infestação durante o inverno, com pico no final do verão e no outono em estudos que tinham por finalidade estimar a infestação dos animais durante as estações do ano na região de Araçatuba-SP. Entretanto, Oliveira et al. (1989), ao avaliarem a característica de resistência em animais da raça Canchim e Nelore infestados naturalmente por *R. (B.) microplus* em diferentes estações do ano na mesma região do presente experimento observaram pico de infestação no outono e no inverno, corroborando com os dados obtidos no último ano das avaliações, referentes ao inverno de 2014 (julho) e outono de 2015 (abril).

Veríssimo et al. (1997) em estudos que tinham por objetivo avaliar os fatores genéticos e ambientais que influenciavam na característica de resistência as infestações pelo *R. (B.) microplus* em animais mestiços leiteiros ($\frac{5}{8}$ *Bos taurus taurus* x $\frac{3}{8}$ *Bos taurus indicus*) criados em Colina-SP, observaram maiores infestações na época do outono. Estes achados corroboram com aqueles encontrados por Giglioti et al. (2016), que avaliaram a taxa de infestação por carrapatos em animais da raça Angus criados em área endêmica do estado de São Paulo e observaram pico de infestação na mesma época do ano.

Fraga et al. (2003) estudaram os fatores envolvidos com a características de resistência ao parasitismo e verificaram que o pico de infestação ocorreu no verão, com queda pronunciada na primavera, em fêmeas bovinas da raça Caracu criadas em pastagens na Paranaíba-MS, e em Sertãozinho-SP.

Nossos achados, no entanto, discordam em parte dos resultados reportados por Silva et al. (2010) em estudo conduzido em São Carlos-SP, que tinha por finalidade avaliar a infestação natural por ectoparasitas em fêmeas Nelore, Canchim x Nelore, Angus x Nelore e Simental x Nelore nas diferentes estações do ano, realizado no período de julho de 2003 a dezembro de 2004. Os autores verificaram maiores médias de contagens de carrapatos no inverno de 2003 e no outono de 2004, enquanto que as menores infestações foram observadas na primavera de 2003 e no verão de 2004. O grupo de pesquisa relatou que as diferenças nas infestações entre os grupos genéticos avaliados pode estar associada aos efeitos de ano e época das contagens. Entretanto, os animais Nelore apresentaram infestações significativamente menores que os Canchim x Nelore, que, por sua vez, foram menos infestados que os Angus x Nelore e Simental x Nelore.

Oliveira et al. (2013) avaliaram a resistência de animais Nelore e mestiços "three cross" ($\frac{1}{2}$ Angus + $\frac{1}{4}$ Canchim + $\frac{1}{4}$ Nelore) criados em São Carlos, SP, às infestações por carrapatos. Esses autores usaram dados colhidos no período de agosto de 2009 a julho de 2011 e verificaram maiores picos de infestação na primavera e no verão, coincidindo com os meses mais úmidos do período experimental. Apesar da diferença observada entre os grupos genéticos avaliados, os pesquisadores concluíram que o clima foi o fator que mais influenciou no parasitismo dos animais a cada colheita. Estes achados corroboram com os resultados observados na primavera de 2013 e 2014 do presente estudo, pois na colheita 3 ($0,80 \pm 0,05$) e na colheita 15 ($1,38 \pm 0,05$), ambas realizadas em outubro, as médias das contagens de carrapatos foram elevadas.

Assim, os dados da literatura evidenciam que existe certa divergência com relação à estação do ano em que ocorre o pico de infestação pelos carrapatos nos bovinos, estando associados, principalmente, às condições

climáticas do ano e local das avaliações, o qual terá influência direta na taxa de infestação apresentada pelos animais.

O ciclo biológico do *R. (B.) microplus* divide-se em duas fases distintas, a fase de vida livre, que ocorre no ambiente e, a fase de vida parasitária, que ocorre nos bovinos, sendo que as condições ambientais exercem forte influência sobre a primeira fase dos carrapatos (FARIAS et al., 1995; VERÍSSIMO, 1991), principalmente, a temperatura e a umidade relativa do ar (GONZALES, 1975).

Mediante a análise dos dados meteorológicos, observou-se que a temperatura e a umidade relativa foram os fatores climáticos que mais influenciaram a fase de vida livre dos carrapatos e, conseqüentemente, na diferença de infestação apresentada pelos animais, durante o período experimental. A média de temperatura mensal atingiu valores superiores a 18°C, não sendo verificados valores inferiores a este. De acordo com Hitchcock (1955), temperaturas abaixo de 15°C afetam a fase de vida livre, pois impedem a oviposição e a embriogênese do *R. (B.) microplus*.

A umidade relativa do ar manteve-se superior a 73% ao longo do período experimental exceto nos mês de agosto de 2014 (inverno), no qual a UR% foi de 58,5%. Talvez este fato possa explicar os motivos pelos quais a média de contagem de carrapatos para esta colheita foi de $0,00 \pm 0,05$. Entretanto, índices baixos de umidade relativa do ar podem interferir na embriogênese e na sobrevivência das larvas nas pastagens, reduzindo a infestação nos bovinos (HITCHCOCK, 1955).

Desta forma, as condições climáticas observadas ao longo do período experimental na região de São Carlos-SP e suas influências na fase de vida livre do *R. (B.) microplus* explicam, em partes, as divergências descritas na literatura quanto ao pico de infestação.

Para avaliar a parasitemia e a frequência da infecção por *Babesia* spp. no rebanho Canchim naturalmente infestado pelo *R. (B.) microplus*, nas diferentes estações do ano, foi usada a quantificação absoluta por meio da qPCR. Esta técnica molecular permitiu o diagnóstico rápido da doença com alta sensibilidade, além de distinguir as espécies de babesias avaliadas por meio da análise da média de temperatura obtida na curva de dissociação, demonstrando elevada especificidade. Somam-se a esses fatores, a

capacidade do teste em quantificar o número de cópias do fragmento do gene alvo em amostras de DNA dos bovinos infectados (GIGLIOTI, 2013; BILHASSI et al., 2014).

Assim, os resultados obtidos pela qPCR são extremamente confiáveis, uma vez que para cada ensaio foram incluídos controles negativos, nos quais não foram observados amplificação de produtos inespecíficos e amostras de isolados de ambas as espécies de babesias que funcionaram como controles positivos da reação.

Os oligonucleotídeos iniciadores empregados para quantificar o DNA de *Babesia* spp. foram descritos por Buling et al. (2007) e são sequências do fragmento do gene mt-cyt B, específica para *B. bovis* e *B. bigemina*, o qual é classificado como gene “multicópias”. Talvez a utilização dessas sequências no presente estudo possa explicar a elevada sensibilidade evidenciada nos ensaios de qPCR, embora resultados semelhantes tenham sido observados por Ramos et al. (2011), que utilizaram sequências do fragmento do gene *msa2c* para amplificar o DNA de *B. bovis* pela qPCR, sendo este denominado de “cópia única” no genoma desta espécie, fato este que pode inviabilizar a detecção do DNA do parasita reduzindo a sensibilidade do teste. No entanto, se por um lado a utilização de um gene “cópia única” pode gerar inconvenientes, a utilização de genes “multicópias” pode impedir a quantificação exata do número de cópias dos fragmentos dos genes mt-cyt B nas amostras de sangue dos bovinos infectados.

Por meio da mesma técnica molecular, Bilhassi et al. (2014) utilizaram um protocolo para amplificação do fragmento do gene mt-cyt B, específica para *B. bovis* descrito por Buling et al. (2007), que possibilitou a detecção de até 1000 cópias (0,1 fg) do gene alvo, em amostras de sangue de animais de diferentes grupos genéticos. Segundo os autores, a sensibilidade do teste permitiu estimar a quantidade de cópias do referido gene e observar que bovinos da raça Nelore e cruzados ($\frac{1}{2}$ Nelore + $\frac{1}{2}$ Angus) apresentaram níveis de parasitemia mais baixos, quando comparados com bovinos da raça Angus.

No presente estudo, a sensibilidade encontrada foi de aproximadamente 12 cópias do gene mt-cyt B/ μ L (0,02 fg) para ambas as espécies de babesias nas amostras de DNA dos animais experimentais. Entretanto, a eficiência do

teste foi elevada, o que permitiu a quantificação do gene alvo em quase todas as amostras avaliadas.

Com relação à especificidade, a análise da média de temperatura na curva de dissociação em cada ensaio de qPCR permitiu diferenciar as sequências dos genes mt-cyt B, específica para cada espécie de babesia. Assim, *B. bovis* apresentou uma temperatura média de 77,5 e *B. bigemina* de 76,0.

As babesioses foram diagnosticadas em 98% dos animais, frequência que já era esperada, tendo em vista os resultados de trabalhos conduzidos nesta região do estado de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. 2005; OLIVEIRA et al., 2008;; OLIVEIRA et al., 2013; GIGLIOTI, 2013; BILHASSI et al., 2014). Esses achados permitem confirmar observações anteriores de que a região de São Carlos-SP apresenta característica de estabilidade endêmica para as babesioses bovinas, de acordo com os critérios previamente estabelecidos por Mahoney e Ross (1972).

Utilizando a mesma técnica molecular, Bilhassi et al. (2014) quantificaram *B. bovis* em animais de diferentes grupos genéticos, criados em em regiões enzooticamente estáveis do estado de São Paulo e observaram que a prevalência da doença foi elevada, sendo de 96%, 98% e 100% em rebanhos Nelore, ½Nelore + ½Angus e Angus. Estes resultados corroboram com os dados reportados por Giglioti et al. (2016), os quais observaram parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* em 100% e 98% nos animais taurinos avaliados pela qPCR.

Foi verificada uma flutuação na quantidade do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos de *B. bovis* e *B. bigemina* nas amostras de DNA dos bovinos analisadas ao longo das estações do ano, sendo que as maiores médias foram observadas no início do experimento, na primavera de 2013, quando os animais tinham idade ao redor dos 8 meses. Entretanto, com o passar dos meses foi observado uma tendência bem definida de redução dos valores dos NC de babesias, o que talvez seja resultado da consolidação da resposta imune, em virtude do aumento da idade dos animais.

As amostras encontradas como negativas correspondem às colheitas 23 e 24 realizadas no inverno (junho e julho de 2015), sendo de 1,1% (13/1179) e 2,8% (33/1184) para *B. bovis* e *B. bigemina*. Observa-se que as amostras que

foram negativas para *B. bovis* foram positivas para *B. bigemina* para as respectivas colheitas, evidenciando a inexistência de imunidade cruzada entre as espécies. Isto significa dizer que a parasitemia causada por *B. bovis* não protege o animal contra a infecção por *B. bigemina* e vice-versa (SMITH et al., 1980), fato este que os tornam eventos independentes. Estes resultados possibilitam supor ainda que animais deste grupo genético são capazes de desenvolver uma resposta imune mais eficiente contra a parasitemia causada por *B. bovis*.

Em torno de 88,2% (44/50) e 83,9 (42/50) das amostras de DNA dos bovinos puderam ser quantificadas para *B. bovis* e *B. bigemina* por colheita. Segundo os critérios estabelecidos para a curva de calibração e os valores da temperatura da curva de dissociação, 98% (49/50) e 95,4% (47/50) das mesmas foram positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

As médias do número de cópias (NC) e o desvio-padrão para *B. bovis* e *B. bigemina* foram de $1,66 \pm 0,02$ e $1,78 \pm 0,03$, respectivamente. Nota-se o elevado grau de parasitemia causado por *B. bigemina* nos animais avaliados.

Com relação à frequência da infecção por ambas as espécies de babesias detectados pela qPCR, pode-se verificar que os nossos dados são semelhantes aos obtidos por OLIVEIRA et al. (2008) na mesma região do presente experimento. Estes autores verificaram altas taxas de parasitemia por *B. bigemina* entre animais de idades (bezerros de 8-12 meses e vacas com três anos) e constituição genética diferentes (Nelore, Angus x nelore, Canchim x Nelore, e Simental x Nelore). Estes pesquisadores trabalharam, no entanto, com testes de amplificação de DNA dos parasitas de forma que os resultados eram qualitativos.

Nossos achados diferem daqueles encontrados por Giglioti et al. (2016), que quantificaram amostras de DNA dos hemoparasitas a partir de bovinos da raça Angus com idades variando entre 12 e 24 meses em região endêmica para as babesioses bovinas do estado de São Paulo. Os autores observaram que a média do NC de *B. bovis* ($1,49 \pm 0,07$) foi maior quando comparado com a média do NC de *B. bigemina* ($0,82 \pm 0,06$) em colheitas realizadas nas diferentes estações do ano. Os resultados deste grupo de pesquisa corroboram com aqueles encontrados por Oliveira et al. (2014), os quais observaram uma

maior média do NC de *B. bovis* em animais de grupos genéticos e idades diferentes.

As estimativas do coeficiente de correlação entre os NC de fragmentos dos genes mt-cyt B de *B. bovis* e *B. bigemina* e a contagem de carrapatos nos animais foram baixas tendendo à zero, principalmente, para *B. bigemina* (0,04). De maneira semelhante, Giglioti et al. (2016) encontraram valores de associação próximos aos do presente experimento, ao estudarem contagens de carrapatos realizadas nas diferentes estações do ano (outono e inverno) com os NC de *Babesia* spp. em animais Angus. Embora as áreas de ocorrência das babesioses bovinas sejam dependentes da dinâmica populacional do carrapato vetor (MAHONEY; ROSS, 1972), os resultados obtidos sugerem que a taxa de infestação pelo *R. (B.) microplus* talvez não seja o único fator responsável pelo maior ou menor grau de parasitemia apresentada pelos animais do rebanho, uma vez que a associação entre a quantidade dos NC de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* e as contagens de carrapatos realizadas durante o período experimental foram baixas. As outras hipóteses que podem explicar os resultados obtidos estão associados aos mecanismos que determinam a resistência e a imunidade aos diferentes parasitas, tornando-os eventos independentes.

Foi verificada uma baixa correlação (0,17) entre o NC de *B. bovis* e *B. bigemina*. Os resultados sugerem que existe uma pequena tendência de variação no mesmo sentido dos NC de ambas as babesias, sendo que os fatores que determinam o aumento ou a redução da parasitemia por uma espécie provocam variação no mesmo sentido da parasitemia pela outra espécie. Estes achados, no entanto, diferem daqueles observados por Giglioti et al. (2016) que verificaram um valor de associação moderado (0,30) entre os NC de ambas as babesias para medidas avaliadas em uma mesma colheita e valores próximos a zero (0,07) quando foi considerado medidas de colheitas diferentes.

Nota-se também que, mesmo os bovinos estando infestados com o carrapato e sendo constantemente inoculados com os hemoparasitas os animais não mostraram sinais clínicos da doença, provavelmente em virtude do equilíbrio entre inóculo recebido e o nível de anticorpos anti-babesias produzido (MAHONEY et al., 1972; FARIAS, 1995).

Para análise de expressão gênica, na qual se objetiva a quantificação relativa da expressão de genes que estejam relacionados a uma determinada característica de interesse, a normalização dos dados por meio da utilização de genes de referência (GAPDH, YHAZ, β -actina), representa um dos fatores mais importantes a serem considerados. Segundo Hendriks-Balk, Michel e Alewijnse (2007), os genes de referência, além de participarem da maquinaria basal das células, sendo constante a expressão dos mesmos no organismo dos animais, permitem avaliar a qualidade do RNA extraído, as diferenças na síntese de cDNA dependentes das alterações na quantidade de RNA, controlar a variação na quantidade inicial de material e a variação intrínseca do equipamento utilizado nos testes.

Os três genes de referência testados foram descritos em experimentos anteriores (ROBINSON et al., 2007; SHERIDAN et al., 2012; PUECH et al., 2015), sendo utilizados para normalizar as diferenças entre a quantificação relativa dos genes de referência e genes alvos, em amostras de RNA extraídas a partir de sangue total de bovinos. Entre os genes mais utilizados como referência destacam-se o GAPDH, β -actina, e o YWHAZ. Entretanto, a literatura mostra grandes variações para estes genes. Dedha et al. (2004) rejeitaram o uso do GAPDH como gene de referência, pois foi aquele que mais variou em culturas de células de sangue total. Em contrapartida, Robinson et al. (2007) demonstraram que os genes da β -actina e GAPDH foram os genes mais adequados para normalizar os dados de expressão em sangue total de bovinos, podendo ser utilizados tanto individualmente ou em associação. Peletto et al. (2011) relataram que o YWHAZ foi o gene de referência mais estável em amostras de sangue de ovinos, corroborando com os dados observados no presente estudo. Todavia, Puech et al. (2015) observaram que o gene de referência mais estável em células mononucleares de sangue periférico de bovinos (PBMC) foi a β -actina, seguido do YWHAZ e GAPDH.

Desta forma, o gene de referência utilizado foi o YWHAZ, uma vez que apresentou expressão constante entre as amostras de RNA, obtidos de amostras de sangue dos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade, permitindo a normalização dos dados de expressão por meio da RT-qPCR. Além disso, o YWHAZ foi considerado o mais estável, dentre os métodos de avaliação utilizados para a escolha do gene de referência.

De maneira geral, as diferenças apresentadas no perfil de expressão dos genes da IL-12B, IFN- γ e TNF- α nos animais dos extremos de resistência/suscetibilidade foram dependentes, exclusivamente, das estações do ano, não sendo verificadas diferenças entre os grupos avaliados em uma mesma estação. No entanto, por estarem expostos a infestações naturais por *R. (B.) microplus*, *Haematobia irritans*, larvas de *Dermatobia hominis* e helmintos gastrintestinais em associação ao estresse gerado pelo intenso parasitismo, estes fatores podem, teoricamente, interferir no “status imune” dos animais do rebanho. Tal possibilidade pode explicar a tendência de perfil de expressão similar das citocinas entre os grupos de animais resistentes e suscetíveis as babesioses.

Os maiores níveis de expressão do IFN- γ , TNF- α e IL-12B ocorreram no outono de 2015, no qual foi observado um aumento na contagem de carrapatos e (Figura 3), principalmente, aumento da parasitemia por *B. bovis* com relação à estação anterior, o verão do mesmo ano. Isto nos sugere uma relação entre a carga parasitária e a modulação positiva da resposta inflamatória nesses animais.

Os resultados observados no presente estudo sugerem algumas hipóteses: (1) Essas citocinas podem não estar relacionadas aos mecanismos de resistência e suscetibilidade às babesioses; (2) Como os bovinos não foram mantidos em condições controladas, a expressão dessas citocinas pode ter sido influenciada por outros agentes etiológicos não investigados durante o experimento ou outras condições adversas que não foram monitoradas; (3) Que a alta variação individual na expressão dos genes relacionados as citocinas avaliadas apresentada pelos animais dos extremos, impossibilitou encontrar diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, o N amostral pode ter favorecido as diferenças observadas.

Nesse estudo, nós trabalhamos com animais que após a primo infecção, permaneceram persistentemente infectados com babesias (Figura 3; Tabela 5) e, desta forma, dificilmente apresentam os sinais clínicos, devido principalmente aos mecanismos da imunidade adaptativa (BROW et al., 2006).

Em áreas enzooticamente estáveis, a parasitemia é persistente nos animais, os quais servem de reservatório de *B. bovis* e *B. bigemina*. Desta maneira permitindo a manutenção do equilíbrio entre carrapato vetor,

hospedeiro (bovino) e agentes etiológicos das babesioses, uma vez que a presença constante hemoparasitas serve de estímulo para o desenvolvimento da resposta imune protetora tanto celular, como humoral (MOHONEY; MIRRE, 1979; FARIAS, 1995). Como *B. bovis* e *B. bigemina* são parasitas intraeritrocitários, a resposta imune é dependente de células apresentadoras de antígenos especializadas (APCs), principalmente macrófagos e células dendríticas. No caso das babesioses, são os macrófagos que apresentam os antígenos desses protozoários às células T CD4⁺, desencadeando a resposta imune (BROWN; PALMER, 1999; BROWN, 2001). Assim, o controle dos casos clínicos da doença e a manutenção da imunidade à parasitemia subsequente são determinados pela interação das respostas imunes inatas e adaptativas, incluindo, células T CD4⁺ e a produção de anticorpos anti-babesias (BROWN et al., 2006; BROWN, 2001).

Dentre os fatores imunológicos que contribuem para determinar o fenótipo de resistência e suscetibilidade apresentado pelos bovinos às babesioses, destacam-se os padrões de resposta envolvendo os subconjuntos de células T CD4⁺ (Th1 e Th2). Assim, para avaliar a imunidade celular dos bovinos contra *B. bovis* e *B. bigemina*, o IFN- γ , TNF- α e IL-12B citocinas produzidas por células com perfil Th1 e a IL-10 por células regulatórias, sintetizada também por células com perfil Th2, foram avaliadas no presente estudo por meio da expressão gênica.

De acordo com os dados reportados na literatura (BROWN, 2001; BROWN; PALMER, 1999; GOFF et al., 2001), a resposta imune protetora à parasitemia primária está associada com o padrão de resposta de células com perfil Th1 e macrófagos. Posteriormente ao pico da parasitemia, observa-se uma resposta de células com perfil Th2. Todavia, a exacerbada produção de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e de óxido nítrico (NO) na fase aguda da enfermidade pode acarretar algumas lesões específicas nos órgãos vitais do hospedeiro, que podem inclusive levar o animal ao óbito (BROWN, 2001). Assim, sugere-se que a resposta Th1 é mais efetora na tentativa de eliminar o parasita. De maneira oposta, se o animal apresentar uma resposta Th2 ao invés de Th1 na primeira fase da doença, não haverá o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra as babesias, sendo estas respostas associadas às perdas de animais do rebanho (BENAVIDES et al., 2006).

Nota-se que, dependendo da fase e do nível de parasitemia apresentado pelos bovinos, pode ocorrer a redução ou aumento da expressão de certas citocinas, interferindo no padrão de resposta de células com perfil Th1 e Th2, uma vez que, após a ativação destes subtipos, as células influenciam-se mutuamente e de maneira antagônica (ABBAS, et al., 2015).

Deve-se salientar que os animais avaliados neste estudo já apresentavam a imunidade inata e adaptativa, devido ao contato prévio com *R. (B.) microplus* e, conseqüentemente, aos hemoparasitas transmitidos por ele.

A quantificação relativa apresentou níveis elevados de expressão de mRNA de IFN- γ em todas as estações do ano, exceto no verão. Igarashi et al. (1999) avaliaram a imunidade de camundongos desafiados por *B. microti* e observaram que a síntese IFN- γ e de células T CD4⁺ foram essenciais para conferir resistência contra a parasitemia. O IFN- γ desempenha papel fundamental na modulação da resposta imune, uma vez que, em associação com o TNF- α , estimulam a síntese de óxido nítrico (NO), por meio de macrófagos ativados expostos a merozoítas de babesias, tendo efeito babesicida (GOFF et al., 1998; BROWN et al., 2006). No presente estudo, também foi observado níveis semelhantes de IFN- γ e TNF- α na primavera e no outono dentre os animais do grupo resistente. No entanto, esses resultados precisam ser melhor investigados para uma relação mais refinada entre a parasitemia e os níveis de citocinas nesses animais.

Outras citocinas sintetizadas pelos macrófagos ativados, de importância no desencadeamento de respostas imunes contra as babesioses bovinas, incluem o TNF- α a IL-12 e IL-18. Todavia, na parasitemia por *B. bovis*, o alto nível de expressão destas citocinas permite aumentar a resposta imune dos bovinos (SHODA et al., 1999). A quantificação relativa mostrou altos níveis de expressão de mRNA de TNF- α nos animais do grupo resistente (Figura 10 d). Em experimentos que tinham por finalidade avaliar a inibição da replicação in Vitro da *B. bovis* mediante a estimulação de macrófagos ativados, Shoda et al. (2000) observaram liberação de citocinas próinflamatória como a IL-1 β e TNF- α e citocina Th1 IL-12 na fase clínica da parasitemia por *B. bovis*, o qual permitiu concluir a importância destas citocinas na ativação da imunidade inata e no desenvolvimento da imunidade adaptativa. De modo semelhante, foram observados no presente estudo níveis elevados de expressão de mRNA de IL-

12B (Figura 10 b), IFN- γ (Figura 10 c) e TNF- α (Figura 10 d) no outono dentre os animais selecionados, principalmente, no grupo extremo resistente. Exceto para a IL-12B (Figura 10 b), no qual a quantificação desta citocina foi maior no grupo extremo suscetível. Como já mencionado, nesta estação do ano, foram observados aumento na contagem de carrapatos e do número de cópias (NC) de um fragmento do gene mt-cyt B (Figura 3), principalmente, para *B. bovis*, sugerindo uma relação direta da expressão destas citocinas com a parasitemia.

A IL-12 ativa células exterminadoras naturais (NK) para produzir níveis elevados de IFN- γ (BROWN et al., 1996), além de induzir a síntese desta citocina pelas células T. Esta citocina potencializa as funções citolíticas das células NK e das TCD8⁺ ativadas. Acrescenta-se a isso, o fato da IL-12 atuar como fator de diferenciação sobre as células T CD4⁺, para um padrão de resposta do tipo Th1. Segundo Bittar (2002), esta citocina atua como um mediador da resposta inata e da citotoxicidade como uma resposta efetora contra o parasita. Uma vez que essa ligação entre o desenvolvimento de respostas imunes específicas e a ativação dos macrófagos pode proporcionar o controle da parasitemia. Estas observações talvez possam explicar o maior nível de expressão de IL-12B e IFN- γ (Figura 10) no outono, dentre os animais classificados como suscetíveis e resistentes, respectivamente.

Brown et al. (1996) em estudos que tinha por finalidade caracterizar o padrão de resposta de células T à parasitemia por babesias observaram que a IL-12 sintetizada, principalmente, por macrófagos e por células dendríticas induziu a síntese de IFN- γ em clones de células Th (Th0, Th1 e Th2) de bovinos. Apesar disto, os pesquisadores não observaram aumento significativo na taxa de proliferação celular durante esses ensaios.

Garcia et al. (2004) avaliaram a resposta imune em vacas prenhes e não prenhes artificialmente infectadas por *B. bigemina* em períodos de tempo diferentes. Os pesquisadores observaram que a indução de expressão de mRNA de IFN- γ , IL-12, TNF- α , iNOS ocorreu em ambos os períodos, sendo que a IL-10 foi detectada apenas no primeiro dia pós-infecção e que a condição fisiológica das fêmeas não tinha efeito sobre a susceptibilidade à parasitemia, nem sobre a resposta imune. A prenhez é uma forma independente do animal se apresentar imunologicamente frente as infecções, sendo caracterizado

muitas vezes uma resposta imunossupressora, por isso talvez esses resultados tenham sido observados por esse grupo.

Para a IL-10 (Figura 10 a) não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos níveis de expressão do mRNA desta citocina dentre os animais dos extremos avaliados nas diferentes estações do ano, sendo que ambos os grupos apresentaram perfis de expressão semelhantes ao longo do período das avaliações. Com relação a IL-10, estudos realizados por Goff et al. (2002) mostraram que esta citocina inibe a expressão do IFN- γ e do TNF- α e a síntese de NO por meio da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), o qual modula a resposta imune contra as babesioses bovinas. Estes resultados corroboram com os dados observados por Shoda et al. (2000) em experimentos semelhantes. Chitko-McKown et al. (1995) observaram que a IL-10 humana recombinante suprimiu a síntese de IFN- γ e a proliferação de linfócitos T de bovinos, sendo este efeito dependente dos macrófagos. Talvez estes estudos possam explicar, em partes, a diminuição nos níveis de expressão observados no verão para o IFN- γ (Figura 10 c) e TNF- α (Figura 10 d) nos grupos extremos resistentes e suscetíveis, respectivamente, sendo observado esse mesmo efeito imunoregulador nesse modelo.

Contudo, os dados reportados da literatura demonstram a importância da imunidade adaptativa contra *Babesia* spp. e sugerem que as citocinas produzidas por células com perfil Th1 são induzidas com a finalidade de proteger os bovinos na fase aguda da doença, e consequentemente, na parasitemia subsequente. Assim, o resultado da análise de expressão gênica permite concluir que a oscilação na carga parasitária nas diferentes estações no ano de 2015 pode estar relacionada com o perfil de expressão dos genes do IFN- γ , TNF- α e IL-12B apresentados nos animais avaliados neste estudo. Entretanto, a análise dos níveis dessas citocinas nos dois grupos experimentais não permitiu identificar fatores que contribuíssem para maior resistência ou suscetibilidade às babesias. Talvez outros genes relacionados às respostas imunes, como iNOS, citocinas produzidas por células com perfil Th2, como por exemplo, IL-4 e IL-13 ou da resposta imune inata, como os receptores TLRs (Toll-Like Receptors), NLR (Nod-Like Receptors) e, RLR (RIG-1, Like Receptors) possam ser futuramente investigados na tentativa de se buscar

genes de imuno resposta que poderiam ser expressos diferencialmente em animais resistentes e suscetíveis às babesioses bovinas.

CONCLUSÕES

- 1) A qPCR padronizada neste experimento, embora não tenha possibilitado a quantificação exata do número de cópias do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* permitiu estimar o nível de parasitemia em novilhas da raça Canchim e observar que ocorrem flutuações nos níveis destes hemoparasitas nas diferentes estações do ano, sendo dependente do ano das avaliações;
- 2) A técnica de amplificação de DNA dos hemoparasitas por qPCR apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue de bovinos portadores das babesioses;
- 3) Com base nos resultados da quantificação absoluta do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* pela qPCR e da infestação pelo carrapato ao longo do período experimental, pode-se confirmar que na região estudada, a babesiose bovina ocorre na forma de endemia estável;
- 4) A baixa estimativa do coeficiente de correlação entre o número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* com as contagens de carrapatos realizadas ao longo do período experimental sugerem que a variação no grau de parasitemia ocorre de forma independente das infestações pelo *R. (B.) microplus*;
- 5) A oscilação do número de cópias (NC) dos fragmentos dos genes mt-cyt B, específicos de *B. bovis* e *B. bigemina* nas diferentes estações do ano de 2015, pode estar relacionada com o perfil de expressão dos genes do IFN- γ , TNF- α e IL-12B apresentado pelos animais dos extremos de resistências/suscetibilidade;
- 6) Pode-se concluir ainda, que há uma tendência de resposta Th1 evidenciada pelos níveis de IFN- γ , TNF- α , e IL-12B quantificados por meio da RT-qPCR nos grupos de bovinos avaliados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Propriedades e Visão Geral das Respostas Imunes; Células e Tecidos do Sistema Imune; Circulação de Leucócitos e Migração para os Tecidos; Diferenciação e Funções das Células TCD4⁺ Efetoras. In: _____ **Imunologia Celular e Molecular**. 8ªed. Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda. cap.1, 2, 3 e 10, p.1-12, 13-33, 35-50, 213-230, 2015.

ALENCAR, M. M.; TREMATORE, R. L.; BARBOSA, P. F. et al Desempenho de bezerros filhos de touros das raças Nelore e Canchim e cruzados (F1) Charolês x Nelore e Piemontês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.3, p.461-466, 1997.

ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; TULLIO, R. R. et al. Peso à desmama de bezerros da raça Nelore e cruzados Canchim x Nelore e Marchigiana x Nelore. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.6, p.917-925, 1995a.

ALENCAR, M.M.; CRUZ, G.M.; TULLIO, R.R. et al. Comparação de diferentes equações para caracterizar a curva de lactação em bovinos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.4, p.530-541, 1995b.

ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; BARBOSA, R. T. et al. Desenvolvimento de bezerros guzerás e cruzados Canchim x Guzerá na região de Governador Valadares, MG. In:REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29, Lavras. **Anais...**Lavras: SBZ, p.202, 1992.

ALENCAR, M. M. **Bovino-Raça Canchim: Origem e Desenvolvimento**. Brasília-DF, Embrapa DPU, Documentos 4, p. 09, 20, 1988.

ALENCAR, M. M.; SILVA, A. H. G.; BARBOSA, P. F. Efeitos da consanguinidade sobre os pesos ao nascimento e a desmama de bezerros da Raça Canchim. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 10, p. 72-156, 1981.

ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V. H. et al. Epidemiology of babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Revue Science Techonology Off International Epizootiology**, v.11, n. 3, p.713-733, 1992.

AI-KHEDERY, B.; ALLRED, D. R. Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the ves multigene family, within abidirectional locus of active transcription. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 402-414, 2006.

ALLRED, D. R.; AL-KHEDERY, B. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 27-35, 2004.

ANTONIASSI, N. B. A.; CORRÊA, A. M. R.; SANTOS, A. S.; PAVARINI, S. P.; SONNE, L.; BANDARRA, P. M.; DRIEMEIR, D. Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.39, p. 933-936, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CANCHIM.

Disponível em: <http://www.abccan.com.br/canchim/>

Acesso em: 15 de julho de 2015.

AZAMBUJA, C.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, p.1-4, 1994.

BARBOSA, P. F. **Heterose, heterose residual e efeitos da recombinação em sistemas de cruzamento de bovinos**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, p. 145-243 (série monografias), 1995.

BARBOSA, P. F.; SILVEIRA, F. J. **Utilização do Canchim em Cruzamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Canchim, 1979.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.103, p.161-179, 1995.

BENAVIDES, M. V.; SÁ, G. L.; SACCO, A. M. S. **Resposta Imune dos Bovinos Frente à Infecção por *Babesia bovis***. Editoração Eletrônica, Embrapa Pecuária Sul, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa, n. 60, p.32, 2006.

BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; BRESSANI, F. A.; MALAGÓ JR, W.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, M. C. S. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, n.3, p.234-238, 2014.

BEST, E. L.; FOX, A. J.; FROST, J. A.; BOLTON, F. J. Real-time singlenucleotide polymorphism profiling using Taqman technology for rapid recognition of *Campylobacter jejuni* clonal complexes. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.919-925, 2005.

BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.107-110, 2004.

BITTAR, J. F. F. **Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*: Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral**. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, p. 83, 2002.

BOCK, R. E.; JACKSON, I.; de VOS, A. J.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 2, p.247-69, 2004.

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*. **Australian Veterinary Journal**, 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*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.5, p.337-40, 1997.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DeVOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.

BRITO, L. G.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S.; RIBEIRO, E. S.; VENDRAMI, F. B.; SOUZA, G. C. R.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; FALCOSKI, T. O. R. S.; TIZIOTO, P. C.; OLIVEIRA, M. C. S. *Babesia bovis* infection in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p.78-82, 2013.

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 75-87, 2006.

BROWN, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune response to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.233-248, 2001.

BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; TUO, W. Human IL-12 upregulates proliferation and IFN- γ production by parasite antigenstimulated Th cell clones and $\gamma\delta$ T cells of cattle. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.795, p. 321-324, 1996.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 275-281, 1999.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J. C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.16-25, 2007.

BYFORD, I.; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. A tick resistant dairy breed. **Queensland Agricultural Journal**, v.102, p.11-15, 1976.

CALLOW, L. L.; HOYTE, H. M. D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp., and the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v.37, p.381-390, 1961.

CORRIER, D. E.; GONZALES, E. F.; BETANCOURT, A. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colombia. In: Wilde J.K.H. (ed.). **Tick-borne Diseases and their Vectors**. Lewis, Tonbridge, p.114-120, 1978.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, p.37, 2009.

CHITKO-McKOWN, G. G.; RUEL, B. J.; RICE-FICHT, A. C.; BROWN, W. C. Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 chain and interferon-gamma, but not interleukin-2 or interleukin-4, by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. **Journal Interferon Cytokine Research**, v. 10, p. 915-22, 1995.

COSTA-JUNIOR, L. M.; RABELO, E. M. L.; MARTINS-FILHO, O. A.; RIBEIRO, M. F. B. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p.231-236, 2006.

CRUZ, G. M.; TULLIO, R. R.; ESTEVES, S. N.; ALENCAR, M. M.; CORREA, L. A. Desempenho em confinamento e características de carcaça de machos cruzados abatidos com diferentes pesos, para produção do bovino jovem. 32^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, **Anais...**Fortaleza: SBZ, p.203-205, 1996.

D'ANDREA, L. A. Z.; SARTOR, I. F.; MADRUGA, C. R.; FREITAS, S. B. Z.; KROLL, L. B.; KRONKA, S. N. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 74-78, 2006.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; BUSTIN, S.;A.; JOHNSON, M.;A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v.37, p.112-119, 2004.

DOUBE, B. M.; WHARTON, R. H. The effect of locality, breed and previous tick experience on seasonal change in the resistance of cattle to *Boophilus microplus* (Ixodoidea:Ixodidae). **Experientia**, v.36, p.1178-9, 1980.

ESTES, D. M.; BROWN, W. C. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. **Veterinary Immunology. Immunopathology**, v. 90, p. 1-10, 2002.

ESTEVEZ, S. N.; CRUZ, G. M.; TULLIO, R. R.; FREITAS, A. R. Milho ou sorgo na alimentação de bovinos inteiros da raça Canchim e ½Canchim+½Nelore em confinamento. I. Ganho de peso e características de carcaça. 30^º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Rio de Janeiro: SBZ, p.437, 1993.

FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Ed.Guaíba Agropecuária, cap. 3, 4, p. 29-33, 34-36, 1995.

FARIAS, N. A. R.; STOBBE, N. S.; CHISTOVÃO, M. L.; PERRI, S. H. V.; COSTA, A. J. Influência das condições climáticas da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, sobre os estágios não parasitários do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 67-77, 1995.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W. L.; JASMER, D. P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.6, p.1374-1379, 1992.

FARRUGIA, C.; CABARET, O.; BOTTEREL, F.; BORIES, C.; FOULET, F.; COSTA, J. M.; BRETAGNE, S. Cytochrome b Gene Quantitative PCR for Diagnosing *Plasmodium falciparum* Infection in Travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.6, p. 2191-2195, 2011.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*. *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.69-81, 1993.

FOLLO, M. Y.; BOSI, C.; FINELLI, C.; FIUME, R.; FAENZA, I.; RAMAZZOTTI, G.; GABOARDI, G. C.; MANZOLI, L.; COCCO, L. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLCbeta1 gene expression in myelodysplastic syndrome. **International Journal Molecular Medicine**, v.18, p.267-271, 2006.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Nitric Oxide: a simple messenger passing through the complexity. Metabolism, synthesis and functions. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, p.265-271, 2000.

FONSECA, A.; BRAGA, A. **Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, p.216, 1924.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.6, v.32, p.1578-1586, 2003 (supl.1).

GARCIA, T. D.; FIGUEROA, M. J. V.; RAMOS, A. J. A.; ROJAS, M. C.; CANTÓ, A. G. J.; FALCÓN, N. A.; ÁLVAREZ, M. J. A. Immune response to *Babesia bigemina* infection in pregnant cows. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 10, n. 26, p.298-301, 2004.

GIGLIOTI, R.; Oliveira, H. N.; SANTANA, C.; 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* levels estimated by qPCR in Angus cattle from endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne diseases**, 2016 (No prelo).

GIGLIOTI, R. **Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p.81, Jaboticabal, 2013.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; TUO, W.; VALDEZ, R. A.; PARISH, S. M.; BARRINGTON, G. M. Age-Related Innate Immune Response in Calves to *Babesia bovis* Involves IL-12 Induction and IL-10 Modulation. **Academy of Sciences**, v. 969, p. 164-168, 2002.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; PARISH, S. M.; BARRINGTON, G. M.; TUO, W.; VALDEZ, R. A. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 463-471, 2001.

GOFF, W. L.; JOHNSON, C. C.; CLUFF, C. W. *Babesia bovis* immunity. In vitro and in vivo evidence for IL-10 regulation of IFN- γ and iNOS. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 849, p.161-180, 1998.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v.23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduce Science**, v.82, p.349-360, 2004.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, n.10, p. 986-994, 1996.

HENDRIKS-BALK, M. C.; MICHEL, M. C.; ALEWIJNSE, A. E. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. **Basic Research Cardiology**, v. 102, p. 195-197, 2007.

HERMANS, P.; DWINGER, R.H.; BUENING, G.M.; HERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.42, p.623-32, 1994.

HITCHCOCK, L. F. Studies of the non-parasitic stages on the cattle tick, *B. microplus*. **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 295-311, 1955.

HODGSON, J. H. Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Annals of the New York Academy Science**, v. 653, p. 42-51, 1992.

IGARASHI, I.; S. WAKI, M. ITO, Y. OMATA, A. SAITO.; SUZUKI, N. 1994. Role of CD4⁺1 T Cells and Gamma Interferon in Protective Immunity Against *Babesia microti* Infection in Mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, 1999.

JOHNSTON, L. A. Y.; LEACH, G.; JONES, P. N. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Australian Veterinary Journal**, v.54, p.14-18, 1978.

JOHNSTON, T. H.; BANCROFT, M. J.; FELLOW, E. H.; FELLOW, W. H. A tick-resistant condition in cattle. **Proceedings Royale Society Biological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 219-317, 1918.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*), **Veterinary Parasitology**, v.17, n.89, p.297-305, 2000.

KAKOMA, I., MELHORN, H. Babesia of Domestic Animals. In: KREIER, J.P. (Ed). **Parasitic Protozoa**, Academic Press, p.141-216, 1994.

KE, G. M.; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W. T.; CHULU, J. L. C.; LIAO, M. H.; CHANG, T. J.; LIU, H. J. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **Journal of Virological Methods**, v.133, p.6-13, 2006.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SHENCK, M. A. M. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em bezerros do estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 1225-1230, 1983.

KREIER, J. P. Babesia of Domestic Animals. Parasitic Protozoa. **New York, Academic Press**, vol. IV, p.1-52, 1977.

LEMOS, A. M. **A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato**. Juiz de Fora: Embrapa, CNPGL, p.42, 1986.

LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P. et al. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá in Brasil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal Production**, v.41, p.187-191, 1985.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.90, p.2-33, 1971.

LI, J.; KELLY, P.; ZHANG, J.; XU, C.; WANG, C. Development of a pan-*Babesia* FRET-qPCR and a survey of livestock from five Caribbean islands. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.246, 2015.

LIVESTOCK. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. PSD: production, supply and distribution online. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2013.

Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/>

Acesso em: 15 de julho de 2015.

LUCHIARI FILHO, A., LEME, P. R., RAZOOK, A. G. et al. **Características de carcaça e rendimento da porção comestível de machos Nelore comparados a cruzados (F1) obtidos do acasalamento de touros das raças Canchim, Santa Gertrudis, Caracu, Holandês e Suíço com fêmeas Nelore I. Animais inteiros terminados em confinamento**. Boletim da Indústria Animal, v.46, n.1, p.17-25, 1989.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.71, p. 17-26, 1997.

MADRUGA, C. R.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. **Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da Tristeza Parasitária Bovina no Mato Grosso do Sul**. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGL, p.7, 1987.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESLLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. **Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.19, p.1163-1168, 1984.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. A note on the transmission of *B. bovis* by the one host tick *Boophilus microplus*. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 253-254, 1979.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. *Babesia argentina*: the infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*). **Research in Veterinary Science**, v.16, p.112-114, 1974.

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I. G.; MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, v.67, p.197-203, 1973.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p.292-8, 1972.

MATTIOLI, R. F.; PANDEY, V. S.; MURRAY, M.; FITZPATRICK, J. L. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Tropica**, v. 75, p. 263-277, 2000.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KRIER, J. P. (Eds). Babesiosis. **New York: Academic Press**, p.1-19, 1981.
MELHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances Parasitology**, v.23, p.37-99, 1984.

MELHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v.23, p.37-99, 1984.

MORAES, F. R., COSTA, A. J., WOELZ, C. R. Ecologia de carrapato. XV: Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Arquivos de Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n.1, p.45-53. 1986.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JOHNSON, W. C.; GOFF, W. L. Development of conventional subunit vaccines for anaplasmosis and babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.255-266, 1995.

MOTTA, A. C.; NAVES, A. C.; SILVA, D. A. In: **Canchim, Resumos Informativos**. 2ªed. Brasília-DF, Embrapa-DID, p.92, 1981.

NORIMINE, J.; SUAREZ, C. E.; McELWAIN, T. F.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; BROWN, W. C. Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2039-2048, 2002.

OLIVEIRA, G. P; ALENCAR, M. M; FREITAS, A. R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação Natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 10, p. 1267-1271, 1989.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 433-438, 1987.

OLIVEIRA, M. C. S.; BILHASSI, T. B.; GIGLIOTI, R.; IBELLI, A. M. G.; MALAGÓ JR, W.; OLIVEIRA, H.N. **Estudo da prevalência e do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Angus, Nelore e cruzados, criados em áreas endêmicas do Estado de São Paulo**. Editoração Eletrônica, Embrapa Pecuária Sudeste, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 37, p.26, 2014.

OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; GIGLIOTI, R.; BERALDO, M. C. D.; ANÍBAL, F. F.; CORREIA, R. O.; BOSCHINI, L.; CHAGAS, A. C. S.; BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.168-175, 2013.

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. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v.155, p. 281-286, 2008.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.61-67, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal Parasitology**, v.35, p.105-111, 2005.

OURA, C. A.; BISHOP, R. P.; WAMPANDE, E. M.; LUBEGA, G. W.; TAIT, A. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. **International Journal Parasitology**, v.34, p.603-613, 2004.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nuclear Acids Research**., v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PUECH, C.; DEDIEU, L.; CHANTAL, I.; RODRIGUES, V. Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.65, 2015.

QUINTÃO-SILVA, M. G.; RIBEIRO, M. F. B. Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.8, p.999-1002, 2003.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. Diseases associated with protozoa. 10th Edn. In: *Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. **Saunders Elsevier**, p.1483-1540, 2008.

RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; BACANELLI, G.; LUIZ, HERA. L.; RUSSI, L. S.; OLIVEIRA, R. H. M.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ALVES, L. C. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.79-83, 2011.

RIEK, R.F. Babesiosis. In: D. Wienman and M. Ristic (Editors), *Infectious Blood Diseases of Man and Animals*. **Academic Press, New York**, v. II, p. 219-268, 1968.

RIEK, R. F. The cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal Agricultural Research**, v.17, p.247-54, 1966.

RIEK, R.F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & kilborne , 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal Agricultural Research**, v.15, p.802-21, 1964.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (canestrini). **Australian Journal Agricultural Research**, v.13, p.532-552, 1962.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Development of ticks on *Bos Taurus*. **Journal Parasitology**, v. 54, p. 663-666, 1968.

ROBINSON, T. L.; SUTHERLAND, I. A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.155, p.160-165, 2007.

RUIJTER J. M.; RAMAKERS C.; HOOGAARS W. M. H.; KARLEN Y.; BAKKER O.; VAN DEN HOFF, M. J.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v.37, n. 6, e45, 2009.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HEGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p. 487-491, 1988.

SAUERESSIG, T. M. **Produção de proteína animal de qualidade com sustentabilidade: controle racional das parasitoses dos bovinos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517- 5111;157), p.46, 2006.

- SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1477-1482, 2010.
- SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; JÚNIOR, W. B. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1150-1155, 2007.
- SINGH, N. K.; GHOSH, S. Experimental immunization of crossbred cattle with glycoprotein isolated from the larvae of *Hyalomma anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v.31, p. 297–314, 2003.
- SHEBISH, E.; VEMULAPALLI, R.; OSETO, C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p.164-167, 2012.
- SHERIDAN, M.P.; BROWNE, J. A.; MACHUGH, D. E.; COSTELLO, E.; GORMLEY, E. Impact of delayed processing of bovine peripheral blood on differential gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p.199-205, 2012.
- SHODA, L. K. M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; PALMER, G. H.; BROWN, W. C. *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**, v. 68, p. 5139-5145, 2000.
- SHODA, L. K. M.; ZARLENGA, D. S.; HIRANO, A.; BROWN, W. C. Cloning of a cDNA encoding bovine interleukin-18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN- γ inducing activity. **Journal Interferon Cytokine Research**, v.19, p. 1169-1177, 1999.
- SMITH, T.; KILBOURNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern Cause fever", **Bureau of Animal Industry Bulletin**, n.1. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. 1893.
- SMITH, R. D.; MOLINAR, E.; LARIOS, F.; MONROY, J.; TRIGO, F.; RISTIC M. Bovine babesiosis: pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infections. **American Journal Veterinary Research**, v.41, n.12, p.1957-65, 1980.

STARCOVICH, C. Bemerkungen über den durch Bebês entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte hamoglobinurie des Rinds (Bebês), das Txasfierber (Th. Smith) und Carceag der Schafe (Bebês). **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten Hygiene, Jena, Abt. I:** v. 14, p. 1-8. 1893.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM-SAS. System for Microsoft Windows: release 8.2. Cary: 2001. 1 CD-ROM.

STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, p.146-152, 2009.

STICH, R. W et al. Stimulation of Nitric Oxide production in macrophages by *B. bovis*. **Infection and Immunoly**, v. 66, p. 4130-4136, 1998.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitas de Bovinos. In: _____. 3º ed. **Parasitologia Veterinária**, Guanabara Koogan, cap. 2, p.42-127, 2010.

TIZARD, I. R. A Defesa do Corpo. In: _____. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. (OLIVEIRA, P. M. A. Tradução e Revisão Científica), 5º ed., Roca, cap.1, 4,12, p. 1-10, 32-44, 148-159, 1998.

TUO, W.; D, M. ESTES.; BROWN, W. C. Comparative effects of IL-12 and IL-4 on cytokine expression by antigen-stimulated memory CD41 T cells of cattle: IL-12 enhances IFN-g production, but IL-4 has marginal effects on cytokine expression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, p.743-751, 1999.

UILENBERG, G. Babesia - A Historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n.1-3, p.19-41, 1995.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, v.29, p.885-895, 1978.

VANDESOMPELE, J; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology Research**, v.3, n. 7, 2002.

VERÍSSIMO, C. J.; OTZUK, I. P.; DEODATO, A. P.; LARA, M. A. C.; BECHARA, G. H. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em vacas das raças Gir, Holandesa e mestiça sob pastejo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69 (supl.), p.87-89, 2002.

VERÍSSIMO, C. J.; SILVA, R. G.; OLIVEIRA, A.A.D. et al. Resistência e susceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, n.2, v.54, p.1-10, 1997.

VERÍSSIMO, C. J. **Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***. (Dissertação-Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp de Jaboticabal, p.170p, 1991.

VIANNA, A. T.; GOMES, F. P.; SANTIAGO, M. **Formação do Gado Canchim pelo Cruzamento Charolês-Zebu**. 2ªed. São Paulo-SP, Nobel, p.193, 1978.

VIANNA, A. T. O Cruzamento Charolês-Zebu: Breve notícia sobre os trabalhos experimentais que estão sendo realizados na fazenda de criação de São Carlos, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.18, p.47-56, 1949-1950.

VILLARES, J. B. Climatologia Zootecnia. III. Contribuição ao estudo da resistência e suscetibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Boletim de Indústria Animal**, n.4, v.1, p.60-80, 1941.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Response of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 26, p.1073-1078, 1975.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P.; WAGHELA, S.; PERRONE, J.; SHOMPOLE, S.; RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, supl. III, p.193-199, 1992.

WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v.77, p.63-70, 1998.

WANDURSKA-NOWAK, E. The role of nitric oxide (NO) in parasitic infections. **Wiad Parazytology**, v.50, p.665-678, 2004.

WRIGHT, I. G.; RIDDLES, P. W. **Biotechnology in tick born diseases**. Present status, future perspectives. FAO-Un Biotechnology for Livestock Production Plenum, New York, p. 325-240, 1989.