

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

GABRIELLE OLIVEIRA SOARES

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMASSOMA NA RESPOSTA IMUNE INATA
DESENCADEADA PELA INFESTAÇÃO POR CARRAPATOS *Rhipicephalus*
microplus EM HOSPEDEIROS TAURINOS E ZEBUÍNS**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

GABRIELLE OLIVEIRA SOARES

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMASSOMA NA RESPOSTA IMUNE INATA
DESENCADEADA PELA INFESTAÇÃO POR CARRAPATOS *Rhipicephalus*
microplus EM HOSPEDEIROS TAURINOS E ZEBUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Artur Kanadani Campos

Coorientadores: Wanessa Araújo Carvalho,
Ana Luiza Franco, Leandro Licursi de Oliveira
e Ricardo Seiti Yamatogi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

T

S676p
2024

Soares, Gabrielle Oliveira, 1996-
Participação do inflamassoma na resposta imune inata desencadeada pela infestação por carrapatos *Rhipicephalus microplus* em hospedeiros taurinos e zebuínos: - / Gabrielle Oliveira Soares. - Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (92 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Artur Kanadani Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 74-89.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.706>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Doenças - Aspectos genéticos. 2. Imunidade. 3. Expressão gênica. 4. Carrapatos como transmissores de doenças. I. Campos, Artur Kanadani, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.20896079

GABRIELLE OLIVEIRA SOARES

**PARTICIPAÇÃO DO INFLAMASSOMA NA RESPOSTA IMUNE INATA
DESENCADEADA PELA INFESTAÇÃO POR CARRAPATOS *Rhipicephalus*
microplus EM HOSPEDEIROS TAURINOS E ZEBUÍDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de agosto de 2024.

Assentimento:

Gabrielle Oliveira Soares
(Autora)

Prof.: Artur Kanadani Campos
(Orientador)

*A Deus Pai, Filho e Espírito Santo e à
Virgem Maria.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força motriz. À Virgem Maria, minha referência.

A minha mãe, Vilma, pela sua dedicação, proteção e incentivo constantes. À minha irmã, Stella, pela sua companhia e apoio incondicionais. Ao meu pai, José, pelo estímulo aos meus estudos. Aos meus avós, Sebastião e Olivina, por me ensinarem o amor pelos animais. Aos meus amigos, Ana Keren, Leandra, Caio, Leonardo, Ravi, Karen e tantos outros, por estarem sempre disponíveis para me ouvir e aconselhar. Ao Gabriel e à sua família, por estarem presentes e me acolherem.

Aos meus orientadores, Artur Kanadani e Wanessa Carvalho, pela paciência, empenho, conhecimento e disponibilidade constantes que sempre demonstraram comigo. Aos meus coorientadores Leandro, Ricardo e Simone, pelos conhecimentos e contribuições para o projeto. À Ana Luiza, além de coorientadora, uma amiga, fundamental para a realização do projeto em laboratório. À Dra. Mariana Magalhães, que além de orientadora durante todos os anos de estágio na Embrapa Gado de Leite, me proporcionou a oportunidade de participar desse projeto. A todos os funcionários - pesquisadores, analistas, assistentes - e colegas que auxiliaram no experimento de campo: Luiz Aparecido Resende Lopes, que nos deixou muita saudade, Glória Verônica da Silva, Carlos Juarez Filgueiras, José Mario Tres, José Roberto Nogueira, Amarildo da Silva, Wilson Wesley Ribeiro, Jonas Amaral, Letícia Mendonça, Emanuelle Gaspar, Carla Loures, Anaclara Schmitz e todos os funcionários e estagiários, que direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho. A todos que me auxiliaram no experimento em laboratório, especialmente à Dra. Marta Martins, por abrir as portas do Laboratório de Genética Molecular, e aos analistas Robert Domingues e Daniele Faza, pelos conhecimentos e ajuda prestados.

A Embrapa Gado de Leite, pela realização do projeto. Ao Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (LBMS) da Embrapa Gado de Leite, onde foram conduzidos os experimentos com animais, e pela infraestrutura para realização dos ensaios laboratoriais. A todos os animais que participaram do experimento, sem suas vidas nada seria possível: Maria, Wanessa, Mariana, Gabi, Robert, Verônica, Tamires, Aninha, Betinho, Luizinha, Ferdinando, Letícia, Manu, Dani, Páscoa, Stella, Iago, Eduardo, Isabella, Carlinha.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. Além de todos os funcionários, colegas de mestrado e professores que

contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional: Aloízio, Paula, Nívea, Alex, Luiz, Samuel, Jackson, Gabriela, Giulia, Ingrid, Leonardo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Conhecereis a verdade e a verdade vos libertará”.
(João 8:32)

RESUMO

SOARES, Gabrielle Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024.
Participação do inflamassoma na resposta imune inata desencadeada por carrapatos *Rhipicephalus microplus* em hospedeiros taurinos e zebuínos.
Orientador: Artur Kanadani Campos. Coorientadores: Wanessa Araújo Carvalho, Ana Luiza Franco, Leandro Licursi de Oliveira, Ricardo Seiti Yamatogi e Simone Eliza Facioni Guimarães.

A criação de bovinos é uma das principais atividades pecuárias na qual o Brasil ocupa posição de destaque mundial. Aliado a isso, infestações pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* são responsáveis por perdas diretas e indiretas ao rebanho, ao produtor e a indústria. O uso de acaricidas para seu controle pode gerar resistência e consequente ineficiência no controle do parasito. Diferenças nas linhagens de bovinos podem demonstrar perfis de infestação diferenciados nos quais animais de origem taurina (*Bos taurus*) possuem maior contagem de parasitos que animais zebuínos (*Bos indicus*), além de demonstrarem perfis imunológicos, celulares e humorais, distintos. Apesar dos conhecimentos acerca da discrepância em relação as respostas imunológicas, o perfil inflamatório inato ainda não é bem descrito em bovinos. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão gênica de alvos relacionados a ativação de vias de inflamassomas em células sanguíneas e pele de bovinos Holandês (taurino) e Gir (zebuíno), antes e após infestações artificiais controladas por *R. microplus*. Resultados demonstraram que os inflamassomas de NLRP3 e NLRP1 estão envolvidos na ativação de imunidade inata, tanto em animais zebuínos quanto taurinos, e a infestação por carrapatos é capaz de modular diferencialmente essas vias promovendo aumento de CASP1 em animais suscetíveis e IL-1 β em animais resistentes. Mais estudos são necessários para avançar no conhecimento para desenvolvimento de imunomoduladores seletivos capazes de melhorar a imunidade dos animais para controle das infestações de forma mais sustentável.

Palavras-chave: Expressão gênica. Imunidade inata. Resistentes. Suscetíveis.

ABSTRACT

SOARES, Gabrielle Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2024. **The role of inflammasomes in the innate immune response triggered by *Rhipicephalus microplus* tick infestation in taurine and zebu hosts.** Adviser: Artur Kanadani Campos. Co-advisers: Wanessa Araújo Carvalho, Ana Luiza Franco, Leandro Licursi de Oliveira, Ricardo Seiti Yamatogi e Simone Eliza Facioni Guimarães.

Cattle farming is one of the main livestock activities in which Brazil holds a prominent global position. Additionally, infestations by the tick *Rhipicephalus microplus* are responsible for direct and indirect losses to the herd, producers, and the industry. The use of acaricides for control can lead to resistance and consequent inefficiency in parasite management. Differences in cattle breeds can show varied infestation profiles, where taurine breeds (*Bos taurus*) have higher parasite counts than zebu breeds (*Bos indicus*), as well as distinct immunological, cellular, and humoral profiles. Despite the knowledge about the discrepancy in immune responses, the innate inflammatory profile in cattle is not well described. Therefore, the present study aimed to evaluate the gene expression of targets related to the activation of inflammasome pathways in blood cells and skin of Holstein (taurine) and Gir (zebu) cattle, before and after controlled artificial infestations by *R. microplus*. Results showed that the NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are involved in the activation of innate immunity in both zebu and taurine cattle, and tick infestation can differentially modulate these pathways by promoting increased CASP1 in susceptible animals and IL-1 β in resistant animals. Further studies are needed to advance knowledge for the development of selective immunomodulators capable of enhancing animal immunity for more sustainable control of infestations.

Keywords: Gene expression. Innate immunity. Resistant. Susceptible.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i> em fase de vida livre e parasitária (Fonte: Próprio autor).....	16
Figura 2 – Diferentes sensores e ativadores de inflamassoma.....	27
Figura 3 – Espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para a ativação do inflamassoma NLRP3 em células endoteliais.....	31
Figura 4 – Linha do tempo das infestações artificiais e coletas de amostras (Fonte: Elaboração própria).....	37
Figura 5 – Sinais de perigo ou componentes microbianos que levam a ativação de inflamassomas.	43
Figura 5 – Eletroforeograma representativo de amostras aleatórias de RNA de <i>Buffy coat</i> e pele gerados pelo Bioanalyzer 2100.	51
Figura 6 – Imagem da amplificação por RT-qPCR em biópsia de pele em bovinos das raças Gir e holandeses	53
Figura 7 – Expressão gênica de alvos do inflamossoma na pele em buffy coat de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos.	56
Figura 8 – Expressão gênica de alvos de resposta imune na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos.	60
Figura 9 – Variação na expressão gênica de alvos do inflamossomo na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos..	64
Figura 10 – Variação na expressão gênica de alvos de resposta imune na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos.	66
Figura 11 – Visão geral dos mecanismos de ativação dos inflamassomas em animais Gir e HPB	71
Figura Apêndice B – Experimento in sílico do primer de AIM2 (Blast)	91
Gráfico Anexo A – Concentração de ROS convertido em nitrito no soro de animais taurinos e zebuínos desafiados com carrapatos	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de primers utilizadas no experimento	44
Tabela 2 – Quantificação de RNA em ng/μL das amostras extraídas em pele pelo equipamento Nanodrop	48
Tabela 3 – Quantificação de RNA em ng/μL das amostras extraídas em <i>Buffy coat</i> pelo equipamento Nanodrop	49
Tabela 4 – Padronização da eficiência para reações de RT-qPCR para os alvos	52
Tabela 5 – Contagem das teleóginas em cada animal na primeira e terceira infestação controlada com larvas infestantes de <i>R. microplus</i>	67
Tabela 6 – Correlação entre as contagens de carrapato e expressão gênica	68
Tabela Apêndice A – Amostras de pele aleatórias submetidas a extração de RNA por Kit RNeasy, Trizol (Fenol-clorofórmio) e Kit Fibrous Tissue avaliadas por Nanodrop	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.2 Interação imunopatológica de <i>R. microplus</i> com hospedeiros bovinos	16
2.2.1. Fenótipos de resistência à infestação por <i>R. microplus</i> em bovinos: influência de espécie e raças.....	16
2.2.2. Mecanismos inflamatórios e celulares ativados pelo carrapato em seus hospedeiros	18
2.2.3 Perfil inflamatório cutâneo no local da picada.....	20
2.3 Inflamassomas e sua participação na regulação da resposta imune contra patógenos	23
2.3.1 Tipos de inflamassoma: estrutura e ativação.....	25
2.4 Reação em cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real.....	31
2.5 Justificativa e Objetivos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Ética	34
3.2 Local	34
3.3 Animais	34
3.3.1 Nascimento.....	35
3.3.2 Manejo de animais experimentais.....	36
3.3.3 Coletas e infestações.....	37
3.3.4 Contagem de teleóginas	38
3.4 Metodologia da RT-qPCR	39
3.4.1 Quantificação e qualidade do RNA em amostras de pele e Buffy coat ..	40
3.4.2 Síntese cDNA (DNA complementar).....	41
3.4.3 PCR em tempo real para amplificação de alvos	41
3.5 Avaliação estatística	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Transferência de Imunidade Passiva	47
4.2 RT-qPCR.....	47
4.2.1 Quantificação do RNA em amostras de pele e Buffy coat	47
4.2.2 Padronização dos alvos	52
4.3 Expressão gênica em biópsias de pele e células de <i>buffy coat</i> : efeito de uma ou repetidas infestações sobre a imunidade inata e inflamassomas	53
4.4 Variações na expressão gênica de alvos: comparação proporcional entre animais Gir e HPB.....	62

4.5 Correlação entre as contagens de teleóginas e expressões gênicas	67
4.6 Resumo dos resultados em vias de ativação de inflamassomas: modulação e seus potenciais efeitos sobre a carga parasitária em animais taurinos e zebuínos	70
5. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE A.....	90
APÊNDICE B.....	91
ANEXO A	92

1. INTRODUÇÃO

A criação de bovinos para os segmentos consumidores de carne e leite é uma das principais atividades pecuárias no mundo. O Brasil é um dos principais criadores e exportadores, com um rebanho de 234,4 milhões de bovinos em 2022 (MAPA, 2023) que sofre a ação de enfermidades infecciosas e parasitárias endêmicas de regiões tropicais, como a infestação por carrapatos.

Rhipicephalus microplus, conhecido como “carrapato do boi”, é um dos responsáveis por grandes perdas e disseminação de patógenos (Pereira *et al.*, 2022). Carrapaticidas, utilizados para combater infestações por esse parasito, podem ser tóxicos ao animal, ambiente e homem, além de causar resistência e gerar ineficiência para combatê-los em parasitoses sucessivas (Gomes *et al.*, 2022).

Diferentes raças de bovinos demonstram perfis diferenciados de infestações. Animais taurinos (*Bos taurus*) possuem contagem de carrapatos superior a animais zebuínos (*Bos indicus*) (Wambura *et al.*, 1998), além disso, diferenças hematológicas e imunológicas distintas já foram bastante discutidas e demonstradas (Tabor *et al.*, 2017). Estudos focalizados na avaliação dos perfis imunológicos de ambas as linhagens revelaram divergências em aspectos celulares e humorais (Piper *et al.*, 2009).

Apesar de haver descrição dos perfis imunológicos distintos, o conhecimento de mecanismos específicos da resposta inata imunológica desenvolvida por animais resistentes e suscetíveis ao carrapato, como a ativação de inflamassomas, são desconhecidos e podem trazer dados valiosos para desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas e de melhoramento animal para combate ao parasita.

Durante o processo de fixação do carrapato, células de defesa são ativadas induzindo a modulação inflamatória que desempenham papel importante na defesa do hospedeiro e no reparo tecidual (Rodriguez-Valle *et al.*, 2010). Um desses mecanismos é a ativação intracitoplasmática de inflamassomas que, a partir de padrões ou danos moleculares gerados às células, levam a resposta pró-inflamatória promovendo a liberação de citocinas ou ativação da piroptose, o que pode estar relacionado ao dano tecidual pela picada do carrapato ou às respostas as proteínas salivares do parasito. A partir desses resultados, a interpretação das diferenças na expressão do inflamassoma podem ser correlacionadas ao fenótipo das linhagens, ou

seja, explicando o aumento ou diminuição da resposta inflamatória e da reação, tanto local, quanto sistêmica, nos animais.

Para análise do envolvimento dos inflamassomas em animais infestados por *R. microplus*, serão analisadas as expressões gênicas das moléculas que codificam proteínas estruturais de inflamassomas, como *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 (NOD2)*, *Domínio de Ativação e Recrutamento de Caspase (CARD)*, *junção de PYD - domínio contendo pirina* – e *CARD (PYCARD)* presente em inflamassomas da família NLR, *Domínio Funcional de Encontro (FIIND)* presente em inflamassoma NLRP1, *caspase 1 (CASP1)* protease envolvida na cascata de ativação do inflamassoma, além de proteínas que codificam interleucinas e citocinas, como *interleucina 1 β (IL-1 β)*, *interleucina – 18 (IL-18)*, *Fator Nuclear κ B (NF κ B)*, além de *Regulador Negativo de Espécies Reativas de Oxigênio (NRROS)*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos e patógenos transmitidos por eles, para humanos e animais, são um problema no mundo todo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, onde geram grandes perdas produtivas na bovinocultura (Horner e Gomes, 1990; Reck *et al.*, 2014). Como exemplo, a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* pode acarretar redução do ganho de peso, produção de leite e carne, transmissão de agentes patogênicos, dentre eles, protozoários e bactérias do complexo Tristeza Parasitária Bovina (Dalglish e Stewart, 1983), e causar lesões de pele, com consequente depreciação do couro, causada pela fixação. Também acarreta elevação dos custos de produção pela profilaxia e controle, realizado com acaricidas, podendo ser tóxico ao animal e ao manejador, além de poluir e gerar resíduos no ambiente e em produtos de origem animal (Higa *et al.*, 2015; Pascoeti, *et al.*, 2016; Rodrigues-Vivas *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2020).

A principal metodologia de controle do carrapato bovino é a utilização de acaricidas, que possuem, em sua composição, ativos sintéticos como arsênio, organoclorados, piretróides, organofosforados e amidinas (Sousa, 2022) que são tóxicas em doses altas e podem promover resíduos em alimentos de origem animal e

contaminação ambiental. O uso indiscriminado de acaricidas têm contribuído para o desenvolvimento de resistência pelo *R. microplus* à maioria das bases químicas, sendo mandatória a substituição destes por alternativas mais sustentáveis de controle do carrapato, afim de reduzir os impactos ambientais e possíveis contaminações por resíduos (Yessinou *et al.*, 2016; De Meneghi, *et al.*, 2016; Beys-da-Silva *et al.*, 2020).

Rhipicephalus microplus, um artrópode hematófago da classe Arachnida e família Ixodidae (Brites-Neto *et al.*, 2015), tem nos bovinos seus hospedeiros predominantes, embora também possa parasitar outras espécies, como equinos, ovinos e cervídeos. Trata-se de um ectoparasita monoxeno, dependendo de apenas um hospedeiro para concluir seu ciclo reprodutivo. Este ciclo compreende uma fase de vida livre, em que as fêmeas caem do hospedeiro para realizar a oviposição, resultando na produção de larvas infestantes. A duração total do ciclo de vida é de, aproximadamente, 120 dias, com a fase parasitária variando de 14 a 21 dias, desde a fixação da larva até o estágio adulto, e a fase livre abrangendo de 30 a 90 dias. Durante essa última fase, as fêmeas ingurgitadas caem no solo pra ovipostura, gerando cerca de 3.000 ovos, antes de morrerem, encerrando seu ciclo de vida (Andreotti *et al.*, 2019).

O carrapato-do-boi, sendo monoxeno, realiza sua alimentação e ecdise no hospedeiro, com a fase livre é concluída quando as larvas encontram um hospedeiro em potencial para se fixarem (Mastropaolo *et al.*, 2017). A primeira ecdise ocorre 4 a 7 dias após a fixação, passando de larva a ninfa. Após 9 a 16 dias, uma nova ecdise ocorre, transformando-as em adultos. Nesse estágio, a cópula ocorre, e as fêmeas se desprendem do hospedeiro entre 18 e 36 dias após a fixação das larvas (Andreotti *et al.*, 2019). O ciclo do parasita está exemplificado na Figura 1, a seguir:

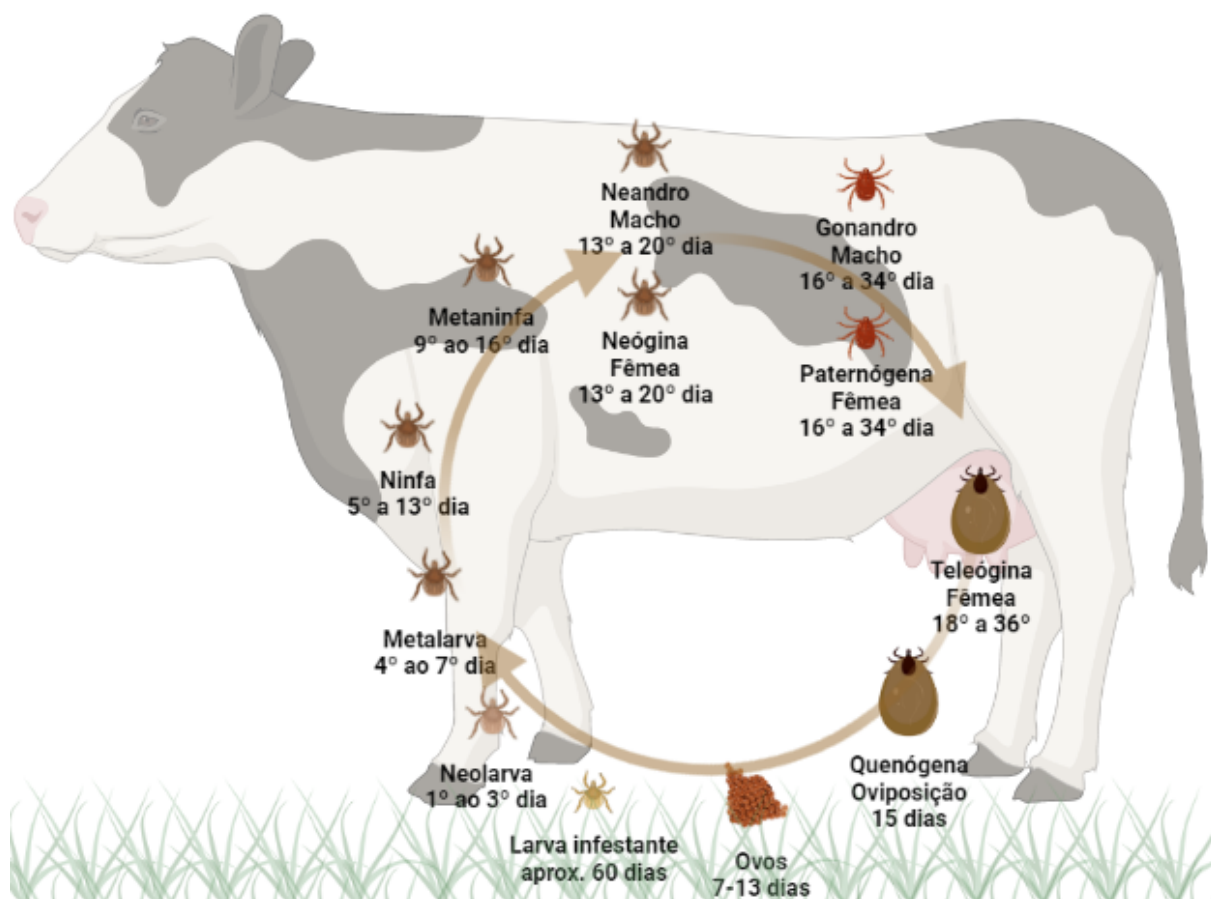


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* em fase de vida livre e parasitária (Fonte: Próprio autor)

2.2 Interação imunopatológica de *R. microplus* com hospedeiros bovinos

2.2.1. Fenótipos de resistência à infestação por *R. microplus* em bovinos: influência de espécie e raças

Os bovinos atuais provêm de um ancestral comum, o extinto auroque (*Bos primigenius*), que foi domesticado há 10.000 anos e espalhou-se por todo o mundo, porém há duas vertentes que explicam a diferenciação dessa espécie nas subespécies existentes, uma acredita que houve centros primários de domesticação, onde dois táxons principais *Bos indicus* (indiano ou zebu) e *Bos taurus* (europeu ou taurino) foram domesticados separadamente (Loftus *et al.*, 1994), e outra vertente que acredita em linhagens diferentes de auroques, de onde surgiram esses dois táxons (Loftus *et al.*, 1999).

Nos bovinos, a resistência ocorre em duas fases, pela imunidade inata, já presente no animal mesmo sem contato prévio com o parasito, e pela imunidade

adquirida, por meio da resposta do sistema imune do hospedeiro frente à sucessivas infestações, que envolve a resposta humoral e celular (Wikel, 1996). Linhagens europeias são mais predispostas a infestação e quando introduzidas em regiões endêmicas desse parasita, falham em resistir, diferente do que ocorre em raças indianas que coevoluíram com carrapatos (Utech *et al.*, 1978), por isso, a resposta imunológica varia já que essas raças se comportam e possuem características diferentes que influenciam, ou não, na persistência da infestação. Como exemplo disso, zebuínos possuem couro mais espesso, maior coceira à picada, pigmentação mais escura da pele, papilas linguais e odor diferenciado de taurinos (Osterkamp *et al.*, 1999) que os fazem ser mais resistentes a esse vetor (De Castro *et al.*, 1985; Spickett *et al.*, 1989).

Apesar de haver muitos fatores que influenciam na resistência e susceptibilidade de bovinos à infestação por carrapatos, a raça é o fator que apresenta uma ampla gama de estudos entre os pesquisadores que avaliam a resposta imune dos hospedeiros. Em bovinos, a resposta imunológica se desenvolve com influxo de basófilos, neutrófilos e eosinófilos para o local da picada, promovendo hipersensibilidade basofílica cutânea, caracterizada pela degranulação dessas células e liberação de histamina, que possivelmente inibe a salivação e alimentação do carrapato (Siqueira *et al.*, 2019). Bovinos que demonstram resistência apresentam uma habilidade superior em reter eosinófilos na área de lesão da pele infestada por carrapatos adultos, conforme constata Carvalho *et al.* (2010). Correlaciona-se a isso um papel na transferência de histamina dos mastócitos para o local de fixação do carrapato, havendo aumento nos mecanismos de limpeza e rejeição (Franscischetti *et al.*, 2009), por elevar os níveis de coceira e irritação local. Portanto, o gado naturalmente resistente compromete a capacidade de fixação e alimentação dos carrapatos, resultando na redução, tanto do número, quanto do peso das teleóginas, bem como na diminuição do número e viabilidade dos ovos. A resistência à infestação é direcionada a todos os estágios do ciclo de vida do carrapato, porém parece afetar de maneira mais evidente a fixação das larvas. Em bovinos com uma imunidade protetora significativa, pode-se observar a rejeição de até 90% das larvas em apenas 24 horas após a infestação (Wagland, 1979).

Além das respostas celulares, estudos avaliaram perfis de populações celulares na pele de animais taurinos e zebuínos sob infestação artificial por *R. microplus*, constatando menor população de linfócitos em animais resistentes em

relação a suscetíveis (Constantinoiu *et al.*, 2010), o que indica maior capacidade que animais resistentes possuem em responder a picada da larva com padrão inflamatório distinto, porém, ambas as linhagens bovinas apresentaram aumento significativo desse tipo celular. Apesar de essas células ainda não terem seu papel totalmente elucidado, estudos sugerem que elas atuam na integração da imunidade inata e adquirida, na primeira linha de defesa contra patógenos invasores e no desenvolvimento tumoral, agindo como resposta primária ao dano.

Outros estudos vinculam o fenótipo de resistência à imunidade adquirida, após repetidas exposições dos animais a infestação. Wagland (1975) avaliou animais Brahman (resistentes) e Shorthorn (suscetíveis) sem prévia exposição a *R. microplus* submetidos a infestações controladas, após a primeira exposição, ambos os grupos apresentaram resultados semelhantes em relação ao número de fêmeas adultas do parasita no corpo dos animais. No entanto, após quatro infestações consecutivas, os bovinos Shorthorn demonstraram uma infestação significativamente maior em comparação aos Brahman, fazendo com que as discrepâncias observadas entre esses animais quanto à resistência aos carrapatos estejam relacionadas à eficácia da resposta imunológica, sendo mais pronunciada em *B. indicus* que em *B. taurus*.

Tais variações no grau de infestação por carrapatos entre subespécies, raças e indivíduos viabilizam a estratégia de cruzamento, visando aproveitar os benefícios da heterose e da complementariedade em características produtivas e adaptativas, com o intuito de aprimorar a eficiência produtiva nos rebanhos. Muitos estudos exploram cruzamentos entre animais taurinos e zebuínos sugerindo uma correlação entre a frequência de genes zebuínos e o nível de resistência dos hospedeiros (Biegelmeier *et al.*, 2012). Nessas pesquisas, quanto maior a proporção de material genético zebuíno no animal mestiço, maior será sua resistência aos carrapatos (Santos Jr. *et al.*, 2000; Regitano *et al.*, 2008), inclusive trabalhos no Brasil (Veríssimo *et al.*, 2002; Nascimento, 2009; Silva *et al.*, 2010) observam a maior carga parasitária em animais taurinos em relação a mestiços.

2.2.2. Mecanismos inflamatórios e celulares ativados pelo carrapato em seus hospedeiros

De maneira geral, quando ocorre a fixação das larvas na pele do hospedeiro, há lesão da epiderme e fixação do hipostômio, provocando rompimento dos capilares locais a fim de que o parasita consiga realizar a hematofagia. Para que o repasto

sanguíneo seja eficiente, o carrapato inocula moléculas presentes na sua saliva para modulação da resposta imunológica do hospedeiro, favorecendo a permanência da fixação e ingurgitamento do parasita para continuidade do seu ciclo reprodutivo (Kitsou *et al.*, 2021).

Com a lesão epidermal, acontece a quimiotaxia celular para o local da picada, havendo um misto de células inflamatórias, como macrófagos teciduais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, causando epidermite e hemorragia local para alimentação do carrapato (Krause *et al.*, 2009). Essa migração celular é mediada por citocinas e quimiocinas que sofrem modulação de acordo com nível de resistência do hospedeiro (Bowman *et al.*, 1996). Dentre as moléculas presentes na saliva do carrapato, que modulam o desenvolvimento de inflamação e migração celular, estão moléculas com funções anti-hemostáticas, vasodilatadoras, anti-histamínicas e imunorreguladoras, como apirase, inibidor de adesão por carrapato (TAI), entre outras (Ribeiro *et al.*, 1988; Stutzer *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2010; Van Den Kerkhof *et al.*, 2020).

Durante o ingurgitamento, o carrapato também ingere uma quantidade alta de anticorpos que neutralizam moléculas inoculadas por ele na lesão, que são responsáveis por danos a suas estruturas, juntamente com espécies reativas de oxigênio (Saini *et al.*, 2007). Para contrabalancear essa resposta do hospedeiro, os carrapatos produzem proteínas ligantes de imunoglobulinas (IGBP), que são responsáveis por inibir a ação citotóxica mediada pelos anticorpos (Gong *et al.*, 2014). Muitos autores ainda divergem sobre a ação protetora das diversas classes de anticorpos produzidos por hospedeiros bovinos suscetíveis e resistentes. O que se sabe, é que há aumento dos níveis de anticorpos IgG contra antígenos do carrapato em raças bovinas suscetíveis em relação às raças resistentes, porém, as respostas de IgG às proteínas salivares foram maiores em hospedeiros resistentes, como demonstrado por Garcia *et al.* (2017), em estudo comparando gado holandês e nelore. Kashino *et al.* (2005) conduziram um estudo que investigou os níveis de anticorpos contra antígenos salivares de carrapatos em bovinos das raças holandês e nelore, os resultados revelaram que, após sucessivas infestações, os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 diminuíram nos bovinos holandeses, enquanto permaneceram inalterados nos nelore, sugerindo que as infestações por carrapato têm o efeito de suprimir a resposta humoral mediada por anticorpos IgG em animais suscetíveis. Ademais, alótipos de IgG2, podem estar associados com a resistência ao carrapato (Carvalho *et al.*, 2011).

uma vez que mostraram diferença de ligação a proteínas salivares de *R. microplus*, havendo diminuição naqueles que infestam animais taurinos.

Além das IGBPs, outras proteínas de carrapatos foram estudadas para reconhecimento imunológico de animais resistentes e suscetíveis. Inibidores de serina protease recombinante (Serpín-rRMS-3) e lipocalinas (LRMs) foram reconhecidas em animais resistentes por células B, além disso, estimulam resposta Th1 com secreção de IFN- γ em gado susceptível e Th2 com expressão de IL-4 em gado resistente (Rodríguez-Valle *et al.*, 2013).

Basicamente, a partir da infestação do bovino pelo *R. microplus*, ocorrerá, primeiramente, uma resposta imunológica inata, com quimiotaxia de células de defesa, ação de anticorpos e citocinas ativando as vias humoral e celular, especialmente se for a primeira exposição do animal. Após o primeiro contato e resposta, havendo um segundo desafio, a imunidade adquirida desse bovino entra em ação (Burrow *et al.*, 2019). As respostas associadas são descritas com a hipersensibilidade cutânea, mudanças histológicas da pele no local de adesão do carrapato, havendo desigualdade entre animais taurinos e zebuínos no perfil micro e macroscópico da lesão, além de mudanças nas respostas imunomediadas e quimiotaxia celular, alterando completamente o perfil inflamatório em animais suscetíveis (Piper *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Piper *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Franzin *et al.*, 2017; Piper *et al.*, 2017).

2.2.3 Perfil inflamatório cutâneo no local da picada

O perfil inflamatório no local de fixação do carrapato mostra-se divergente em espécies taurinas e zebuínas, alguns trabalhos buscaram demonstrar as diferenças, em relação às linhagens, de maneiras distintas. Em animais resistentes, a reação é predominantemente de células mononucleares, como eosinófilos e basófilos, enquanto que animais suscetíveis, reagem com a ação de neutrófilos (Gill, 1986; Szabó e Bechara, 1999; Ferreira *et al.*, 2003). Carvalho (2010), demonstrou que a saliva do carrapato pode interferir na adesão das Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) a monocamada de Células endoteliais da veia umbilical bovina (BUVECs). Hospedeiros suscetíveis mantêm uma infestação mais numerosa, com muitos carrapatos se alimentando ao mesmo tempo, porém a reação inflamatória provocada na pele foi similar em ambas as linhagens. A contagem de neutrófilos e células mononucleares foi mais abundante em pele infestada em relação à não-

infestada, não havendo correlação entre o número de carrapatos que infestam o animal e a reação relacionada à raça. No entanto, foram encontrados mais basófilos em pele de animais resistentes sob infestação. Ademais, foi demonstrado que houve diminuição de moléculas de adesão no local da picada independente do fenótipo bovino e grau de infestação.

Carvalho (2014), em pesquisa do perfil genético entre taurinos e zebuínos, demonstrou que animais resistentes apresentaram aumento dos genes associados aos fatores de crescimento, ao estresse oxidativo, a arquitetura e a sinalização celular. Esses genes parecem ajudar na regulação da cascata de complemento e coagulação, apresentação de antígenos, mobilidade celular e de lipídeos de baixa densidade. Além disso, houve uma diminuição nos genes associados a componentes da matriz extracelular e junções intercelulares. Em contrapartida, foram encontrados genes associados a apoptose, sinalização celular, angiogênese e remodelamento tecidual.

Enquanto Piper (2009), demonstrou diferenças claras entre as raças taurina e zebuína em relação aos níveis de resistência ao carrapato, infestação, parâmetros celulares e anticorpos. Neste trabalho, é demonstrado uma diferença em relação a porcentagem de PBMCs. Bovinos da raça Brahman, que demonstram fenótipo resistente, apresentam maior porcentagem de células T, que geram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como subunidade alfa de receptores de interleucina – 2 (IL-2R α CD25), interleucina – 2 (IL-2), Fator de necrose tumoral α (TNF- α), receptor de quimiocina C-C tipo 1 (CCR-1), maior resposta humoral. Por outro lado, animais da raça Holandês, que demonstram perfil fenotípico suscetível, demonstram maior porcentagem de macrófagos, com maiores níveis inflamatórios com monócitos na circulação periférica. Em outro estudo, Piper (2010), mostrou que muitos dos genes expressos na pele de animais após a infestação por *R. microplus* são diferentes em relação a hospedeiros resistentes ou suscetíveis, principalmente genes de citocinas, quimiocinas, fatores de complemento e constituintes da matriz extracelular, como ceratocanos, osteoglicinas e fibronectinas.

A saliva do carrapato possui proteases que podem afetar o recrutamento de células e adesão leucocitária ao endotélio pela lesão local da picada (Kaplanski *et al.*, 1998; Déruaz *et al.*, 2008). Além disso, muitas dessas moléculas produzidas possuem propriedades que facilitam a permanência e alimentação do parasita, como anticoagulantes e inibidoras de adesão celular (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2008; Mans *et al.*, 2002). Thatchell e Moorhouse (1968), descreveram os processos pelos quais

ocorre a adesão do hipostômio do carrapato em diferentes fases do ciclo na pele do hospedeiro e como a resposta inflamatória à fixação e as proteínas salivares agem frente aos desafios do processo de alimentação. Carvalho (2010), demonstrou que a composição do infiltrado inflamatório no local da lesão é diferente em animais suscetíveis e resistentes, já que mostrou-se haver número de basófilos mais abundantes em pele infestada comparadas a não-infestada. Schleger (1976) e Riek (1962), discutiram também que bovinos resistentes possuem uma maior capacidade de reter eosinófilos no local da lesão.

Quanto ao perfil das proteínas de fase aguda (PFA), responsáveis pela modulação da inflamação sistêmica, como amilóide sérica A (SAA), hepatoglobulina (Hp) e glicoproteína ácida α -1 (α 1-AGP), atuam como marcadores da inflamação em bovinos por serem produzidas no fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, geradas por dano tecidual, como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Horadagoda *et al.*, 1999). Em relação a descrição dessas proteínas em local da picada de *R. microplus* em bovinos *Bos t. taurus* e *Bos t. indicus*, Carvalho *et al.* (2008), mensurou a expressão de SAA, Hp, α 1-AGP, como proteínas reguladoras positivas da inflamação, e transferrina (Tf), como reguladora negativa, em animais antes e após a infestação natural por carrapatos. Neste estudo, observou-se que os animais suscetíveis aumentam a produção da proteína Hp durante a infestação. A concentração dessa proteína diminui conforme a infestação declina, mas não retorna aos níveis iniciais. Já a SAA não sofreu alterações durante a infestação, porém, em animais resistentes houve tendência ao aumento no local da picada. A α 1-AGP diminuiu durante a infestação e em animais suscetíveis demonstrou ser mais elevada mesmo antes da infestação. Em relação a Tf, seus níveis declinaram durante a infestação em ambas as linhagens, principalmente em taurinos, quando a infestação reduziu, seus níveis aumentaram significativamente, isso pode estar relacionado ao fato de animais suscetíveis terem, antes da infestação, os parâmetros hematológicos e ferro menores que animais resistentes.

Ainda em relação às PFA, a IL-1 β é uma importante moduladora dessa resposta, já que induz a síntese de várias dessas proteínas e durante a resposta inflamatória pode estimular o fígado a produzir proteína C reativa, SAA, dentre outras (Sonel *et al.*, 2002). Como os produtos de ativação dos inflamassomas são, também, as IL-1 β , é provável que haja aumento de tais proteínas na corrente sanguínea de animais expostos.

2.3 Inflamassomas e sua participação na regulação da resposta imune contra patógenos

A imunidade inata consiste na primeira linha de defesa do organismo possuindo vários mecanismos de reconhecimento de patógenos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), Receptores de membrana associada Toll-like (TLRs), Receptores Semelhantes a Domínios de Ligação a Nucleotídeos (NOD) ou citosólicos (NLRs), Receptores semelhantes a RIG-I (RLRs), Receptores tipo C de lectina (CLR), Receptores Semelhantes a AIM2 (ALRs) e os Receptores Semelhantes a Sequestossomos 1/p62 (SLRs) (Zhang *et al.*, 2018). A ativação desses PRRs tem como função principal desencadear cascatas de sinalização intracelular para liberação de moléculas responsáveis em amplificar a inflamação, recrutar células imunes inatas e evocar respostas imunes adaptativas (Man e Kanneganti, 2015), sendo essenciais para a defesa do organismo contra lesões, patógenos e parasitários (Jin e Flavell, 2010).

Inflamassomas são complexos multiméricos de proteínas montados no citoplasma de células da imunidade inata como resposta a sinais de estresse ou moléculas microbianas (Bai *et al.*, 2020). PRRs reconhecem a presença de lesão ou componente microbiano, chamado de Padrão Molecular Associado à Patógenos (PAMPs) ou Padrão Molecular Associado à Dano (DAMPs), que são gerados por esse estresse endógeno e desencadeia a via inflamatória para a eliminação do patógeno ou indução do reparo tecidual através da ativação do inflamassoma (Kelley *et al.*, 2019). Tal mecanismo, facilita a indução de secreção de citocinas inflamatórias, como interleucina-1beta (IL-1 β), que ativa respostas de fase aguda de inflamação (Bent *et al.*, 2018). Concomitantemente, ocorre liberação de IL-18, responsável pelo recrutamento de células endoteliais, aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas, acréscimo da atividade metaloproteases, promoção da liberação de neutrófilos, aumento da atividade pirogênica, ativação de linfócitos T e macrófagos, além do aumento de citocinas, como TNF-a e IL-6 (Francisco *et al.*, 2006; Paiva-Oliveira *et al.*, 2010), que em conjunto atuam na morte celular programada.

A IL-1 β tem como uma de suas principais funções ativar o recrutamento de neutrófilos para o local de inflamação, promover a adesão de moléculas endoteliais e induzir a produção de quimiocinas e citocinas. Além disso, ela induz a resposta de

fase aguda e estimula a imunidade adaptativa por meio da resposta Th17 (Dinarello, 2009; Sahoo *et al.*, 2011). Por sua vez, a IL-18 promove a produção de IFN- γ por células T e Natural Killer (NK), além de estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-8 e GM-CSF, que aumentam a migração e ativação de neutrófilos durante a injúria. A IL-18 também intensifica a atividade citotóxica e a proliferação de células T CD8⁺ e NK (Dinarello e Fantuzzi, 2003). Esses processos favorecem o início da cascata inflamatória em tecidos lesados ou infectados e podem contribuir para a depuração do patógeno, a indução da imunidade adaptativa e o retorno à homeostase (Fang *et al.*, 2019). No entanto, a forma como a resposta celular ocorre frente ao dano ou infecção ainda não está completamente esclarecida.

Chavarría-Smith e Vance (2015) descrevem a ativação do NLRP1 por diversos estímulos celulares em resposta a patógenos, como toxinas, peptídeos microbianos, infecção de roedores por *Toxoplasma gondii* e variações nos níveis de ATP. Contudo, os estudos mostram essa ativação apenas em roedores, como ratos e camundongos, e humanos, não havendo literatura descritiva para bovinos ou ruminantes. Zamboni e Lima-Junior (2015) descrevem formas de ativação do NLRP3 frente à infecção por *Leishmania* sp. Nesse contexto, após a entrada da forma promastigota do parasita, padrões moleculares são reconhecidos pelos TLRs presentes na membrana externa e nas membranas endossomais. Esses receptores enviam sinais para moléculas adaptadoras, resultando na ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que, por sua vez, ativa o NFkB, levando à transcrição de genes inflamatórios, incluindo os componentes do inflamassoma e seus produtos, como pró-IL-1 β , pró-IL-18 e NLRP3.

Outra forma de ativação do NLRP3 descrita pelos autores, ainda não totalmente elucidada, ocorre pelo efluxo de K⁺ após a entrada do patógeno, resultando na liberação de catepsina B, que fornece sinais para a ativação do inflamassoma. Além disso, o parasita pode se ligar à lectina do tipo C na membrana plasmática, induzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) dependente da tirosina quinase de baço (Syk), o que é outro processo crítico para a ativação do NLRP3.

Bai *et al.* (2020) discutem a ativação do inflamassoma por disfunção endotelial, que ocorre através da interação do NLRP3 com ROS, levando à inflamação tecidual e à ativação da resposta imune. A TXNIP (proteína de interação com a tiorredoxina), o NFkB e o fator de transcrição nuclear 2 (Nrf2), relacionado ao eritróide, são proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, que ligam o ROS à

ativação do NLRP3. Além disso, pode ocorrer um aumento no catabolismo de óxido nítrico (NO), diminuindo sua disponibilidade celular. Esse desequilíbrio leva à expressão de genes relacionados a proteínas inflamatórias, causando injúria e disfunção do endotélio (Abais *et al.*, 2015). Após a ativação do inflamassoma, ocorre a ativação da caspase-1, que cliva as pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas.

As metodologias utilizadas para caracterização de inflamassomas são diversificadas, havendo técnicas de diagnósticos moleculares muito eficientes baseadas em reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (Liu *et al.* 2013; De Biase, 2019). No caso de detecção de inflamassomas ativos, as técnicas mais utilizadas são Imunohistoquímica (IHQ) (Gonzalez *et al.*, 2020), Imunofluorescência (Aoki *et al.*, 2010), Western Blot / Immunoblot (Liu *et al.*, 2013; De Biase, 2019; Guo e Ting, 2021) e Citometria de Fluxo (Sester *et al.*, 2015; Nagar *et al.*, 2019) para detecção da proteína em tecidos e células, ou seja, detectando a presença e localização da proteína nos tecidos. Os inflamassomas não são bem caracterizados em bovinos (Vrentas *et al.*, 2018), há estudos que envolvem a ativação causada por patógenos em células, como Herpesvírus bovino Tipo 1 (Wang *et al.*, 2014), Diarreia viral bovina do tipo 2 (Schaut *et al.*, 2016), moléculas ou componentes, como alumínio (Harte *et al.*, 2017), *Mannheimia haemolytica* (Cai *et al.*, 2022), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Sun *et al.*, 2019), *Pasteurella multocida* (Fang *et al.*, 2019; 2020), *Salmonella typhimurium* (Tahoun *et al.*, 2020) e *Neospora caninum* (Wang *et al.*, 2018; 2019; Li *et al.*, 2020). Porém, não são estudadas as ativações sistêmicas ou locais desse aspecto imunológico em bovinos sem a estimulação por patógeno específico, ou por dano celular. Atualmente, as alterações diferenciais, em animais taurinos e zebuínos, quanto ao perfil genético e fenotípico, são bastante avaliadas através da imunologia, considerando recrutamento celular, expressão de genes de resistência, diferenciação de perfis celulares e humorais e estresse oxidativo em resposta a infestação por carrapatos são bastante descritas. Apesar disso, correlações da ativação de inflamassomas com a resposta a infestação por carrapatos nunca foram estudadas. Isso demonstra uma lacuna importante no conhecimento, que ao ser elucidada pode ajudar no desenvolvimento de fármacos imunomoduladores capazes de controlar a infestação por carrapato ainda na sua fase inicial.

2.3.1 Tipos de inflamassoma: estrutura e ativação

Os inflamassomas são compostos, geralmente, por um sensor, um adaptador, e uma caspase inflamatória. A molécula-sensor determina a especificidade do inflamassoma e é geralmente um membro da família de receptores semelhantes a nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) ou NOD-like receptors (NLR) (Zamboni e Lima-Junior, 2015). Também já foram descritos inflamassomas que não contêm NLR, incluindo um composto pela DNA helicase ausente na proteína do melanoma 2 (AIM2), proteína 16 induzível por interferon (IFI-16), gene I induzível por ácido retinóico (RIG-I) e pirina. A ativação desses sensores por agonistas específicos, iniciam a sua oligomerização que permite o recrutamento de uma molécula adaptadora e a caspase efetora (De Torre-Minguela *et al.*, 2017).

Em relação a estrutura da família de proteínas sensoras NLR, apresentam um domínio central de ligação de nucleotídeo (NBD), sendo que a maioria possui um domínio C-terminal de repetição rica em leucina (LRR), o domínio da proteína N-terminal é usado para classificá-la quanto ao grupo pertencente, sendo (Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, repetição rica em leucina e domínio contendo pirina) NLRP se tiver um domínio contendo pirina (PYD) ou (Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, repetição rica em leucina e domínio contendo caspase) NLRC se possuir domínio de ativação e recrutamento de caspase (CARD) (Ting *et al.*, 2008). Nem todos os complexos pertencentes da família NLR podem montar um inflamassoma, alguns estão envolvidos em outros aspectos da imunidade inata, regulando outras vias, como o NLRP12 sendo regulador negativo de NF- κ B ou modulando produção de IL-4 em linfócitos T, NLRP6 como regulador negativo da imunidade da mucosa intestinal (Anand *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2013; Lukens *et al.*, 2015). NLRP1b responde à clivagem proteolítica em seu N-terminal induzida pela toxina letal da *Bacillus anthracis*. NLRP3 é um sensor geral de dano celular que responde ao dano intracelular induzido por danos patogênicos ou estéreis. NLRC4 reconhece proteínas bacterianas via proteínas inibidoras de apoptose da família NLR (NAIPs) e pode montar inflamassomas com ou sem recrutamento de PYCARD/ASC, semelhante ao NLRP1b. AIM2 e proteína 16 induzível por interferon (IFI-16) sentindo dsDNA através de seus domínios HIN-200; enquanto isso, o RIG-1 ativa a caspase-1 por meio de um conjunto de inflamassoma após detectar o ssRNA. O inflamassoma de pirina é induzida por toxinas bacterianas que modificam a Ras Homolog Family Member A Guanosine Triphosphate (RhoA GTPase). Para melhor sintetizar, a Figura 2 demonstra a variedade de estímulos intracelulares que podem

estar envolvidos na ativação e montagem do inflamassoma, segue abaixo a figura adaptada de De Torre-Minguela (2017):

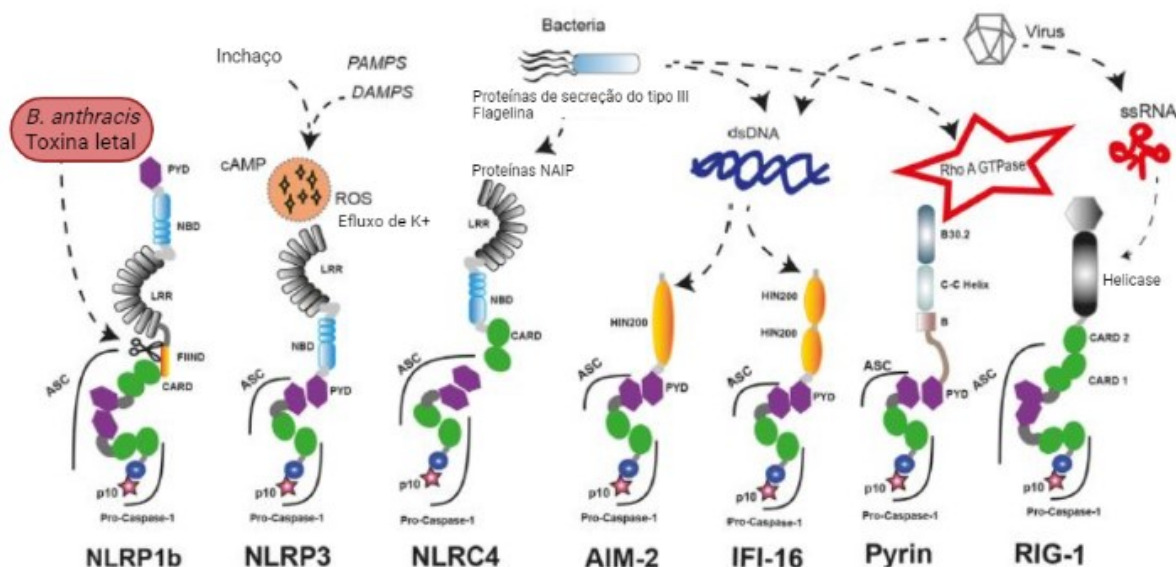


Figura 2 – Diferentes sensores e ativadores de inflamassoma. cAMP – monofosfato cíclico de adenosina; NAIP – proteínas de detecção de patógenos; ROS – espécies reativas de oxigênio; PAMPs - Padrão Molecular Associado à Patógenos; DAMPS - Padrão Molecular Associado a Dano; ssRNA - RNA de fita simples, dsDNA - DNA de fita dupla (Fonte: De Torre-Minguela, 2017)

As proteínas sensoras do inflamassoma reconhecem o estímulo de perigo para desencadear a montagem do complexo multimérico do inflamassoma, sendo que na maioria deles, a interação com uma proteína adaptadora é necessária para aumentar a ativação de caspase-1. A proteína PYCARD/ASC é o adaptador de todos os inflamassomas, e quando interage com a proteína sensora, ativa o inflamassoma a induzir o processo de oligomerização para sua formação estrutural, essa proteína é composta por dois domínios, um N-terminal PYD e um C-terminal CARD (Masumoto *et al.*, 1999; Vajjhala *et al.*, 2012). A ativação da caspase-1 também é dependente da proteína sensora do inflamassoma ativada (Lu *et al.*, 2014), sendo que a ativação da caspase-1 ocorre nesse agregado. O NLRP3 contém os três domínios principais descritos para a família NLRP: PYD, NBD e LRR, sendo capaz de montar inflamassomas funcionais em resposta a uma grande variedade de estímulos, autores sugerem que pode ser um sensor universal para danos celulares e diferentes patógenos (Pelegrín, 2011). A ativação do NLRP3 acontece em resposta a infecção e é amplificada em aumento de sinalização da mesma, também é ativado por lesões

teciduais ou por suas alterações homeostáticas, mesmo sem infecção (Kelley *et al.*, 2019). O NLRP3 pode oligomerizar em resposta a uma grande variedade de estímulos, como moléculas de patógenos, componentes de parede celular bacteriana, toxinas formadoras de poros, sinais endógenos, como ATP extracelular, agregados de β -amilóide, ácido úrico ou por disfunção metabólica e partículas poluentes, como amianto, alume ou sílica (Pelegrín, 2011; Malik *et al.*, 2018). Além disso, a ativação do inflamassoma pode ocorrer por diminuição na concentração de potássio intracelular que, como já discutido, pode levar a quebra de homeostase, alterações oxidativas por ROS por dano mitocondrial. A caspase-4 também pode ativar NLRP3 por reconhecimento de LPS citosólico, embora seja um mecanismo fora do comum (De Torre-Minguela *et al.*, 2017). A regulação de NLRP3 requer a ativação de NF- κ B por TLR ou sinalização do receptor IL-1 tipo I (IL-1RI) para aumentar a concentração de proteína NLRP3 após o estímulo (Bauernfeind *et al.*, 2009; Franchi *et al.*, 2009). Tanto as caspases (Singh *et al.*, 2020) quanto outras moléculas envolvidas na ativação do inflamassoma, como IL-1 β , espécies reativas de oxigênio, já foram demonstradas como diferencialmente ativadas em células de animais taurinos e zebuínos estimuladas com LPS (Daibert *et al.*, 2020), no entanto não foi apresentada nenhuma participação de inflamassoma nesse estudo. Em bovinos, maioria dos estudos que buscam avaliar a ativação de inflamassomas, focam em NLRP1 ou NLRP3, por diferentes estímulos, principalmente por bactérias (Ventras *et al.*, 2019).

Já em relação a inibição do inflamassoma NLRP3, estudos demonstram que ocorrer por modificações pós-traducionais com cadeias de ubiquitina que também direcionam o NLRP3 para sua degradação através de proteassoma ou autofagia (Py *et al.*, 2013), além disso, aumento do óxido nítrico pode prejudicar sua montagem (Mishra *et al.*, 2012; Miao *et al.*, 2010). Pirina também é um dos fatores de regulação negativa do inflamassoma, prevenindo liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Chae, *et al.*, 2006). O dano celular é um dos fatores de ativação do NLRP3 e também ativa autofagia (Shi *et al.*, 2012), porém, a autofagia é um mecanismo de controle negativo, já que envolve degradação e dano mitocondrial, incluindo indutores de NLRP3 como o DNA mitocondrial ou ROS, depuração de PYCARD / ASC e pró-IL-1 β (Harris *et al.*, 2011). Além desses mecanismos, muitas outras proteínas podem estar envolvidas na regulação negativa ou positiva de NLRP3, mantendo a homeostase celular e ativando-o quando necessário.

Após a formação do inflamassoma, há a ativação da caspase-1, que desencadeia vários eventos celulares como consequência de atividades catalíticas, como a liberação de proteínas citosólicas pró-inflamatórias que estão associadas à piroptose. Como exemplo disso, a caspase-1 cliva pró-IL-1 β e pró-IL-18, formas imaturas, nas suas formas ativas IL-1 β e IL-18 (Manji *et al.*, 2002; Martinon *et al.*, 2002; Franchi *et al.*, 2009) que são reguladoras da resposta inflamatória, sendo que IL-18 é sintetizada a partir da indução de produtos microbianos como o LPS, sinalizados via TLR ou pela própria pró-IL-1 β (Garlanda *et al.*, 2013; Andrei *et al.*, 2004).

A IL-1 β expressa genes que controlam a febre, dor, vasodilatação, hipotensão e facilita a infiltração endotelial de células imunes ao local do dano, é também por meio dessa citocina que haverá a produção de PFAs pelo fígado (Horadagoda, 1999), podendo haver aumento ou expressões divergentes em relação a animais suscetíveis ou resistentes à infestação por carrapatos (Carvalho *et al.*, 2008). Já a IL-18 é necessária para a produção de IFN- γ , citocina co-estimuladora que medeia a imunidade adaptativa (Dinarello, 2009). A ativação da caspase também ajuda na clivagem de gasdermina D (GSDMD), que permite que seu domínio N-terminal forme poros na membrana celular, esses poros desencadeiam processos líticos que serão interpretados como formas pró-inflamatórias de morte celular, chamada de piroptose, que força o patógeno intracelular a sair do nicho de replicação, expondo-o a outros fatores imunológicos, isso faz com que desencadeie a liberação de mais citocinas e geração de DAMPs preparando o sistema imunológico para responder a infecção (Miao *et al.*, 2010; He *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2019).

Sabe-se que a saliva do carrapato, inoculada durante o repasto sanguíneo, possui propriedades imunomoduladoras e controlam diferencialmente a produção de IL-1, IL-18, IFN, apoptose, entre outros fatores que são mediados por inflamassomas (Kotál *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Aounallah *et al.*, 2020). Essas propriedades têm o objetivo de preservar o parasita, garantindo sua fixação até a conclusão de seu ciclo de vida. As moléculas inoculadas podem desempenhar funções inibitórias em processos inflamatórios que, de outra forma, auxiliariam o hospedeiro na erradicação da infestação e, conseqüentemente, na redução da inflamação epitelial (Kitsou *et al.*, 2021). Até o momento, nenhum trabalho correlaciona a ativação do inflamassoma NLRP3 em animais taurinos e zebuínos frente a infestação por *R. microplus*, por isso, o conhecimento acerca da expressão do inflamassoma NLRP3, e ainda, se há diferença na expressão entre linhagens taurinas e zebuínas, pode ser de grande valor

para melhor entendimento dos processos inflamatórios acerca da infestação por carrapato bovino.

Como já discutido, há ativação do inflamassoma quando há dano tecidual, em ambos os mecanismos a lesão tecidual é importante. Na ativação do inflamassoma por ROS, há envolvimento do ROS mitocondrial (mtROS), fonte principal de ROS celular, o endotélio mitocondrial age na sinalização de organelas que atuam na regulação de inúmeras funções intracelulares, por isso, quando há dano mitocondrial por injúria, é essencial a ativação de NLRP3, que também está associado ao aumento de mtROS e exposição de Padrão Molecular Associado a Dano mitocondrial (mtDAMPs), como DNA mitocondrial (mtDNA) e cardiolipina no citoplasma, além disso, muitas alterações no metabolismo e organelas celulares estão ligados ao aumento de ROS e, com isso, ativação do NLRP3 (Kluge *et al.*, 2013). Além disso, Paiva *et al.* (2019) demonstrou em trabalho com animais taurinos e zebuínos, que há expressão em diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio quando o animal é exposto a saliva de *R. microplus*. Em relação aos DAMPs, uma ampla variedade de estímulos, podem desencadear a ativação do NLRP3, como descrito anteriormente, um alto efluxo de K^+ , vazamento lisossômico, disfunção mitocondrial, e até mesmo a própria produção de ROS pode ser encarada como um padrão de dano à célula (Bai *et al.*, 2020). A Figura 3, de Bai *et al.* (2020), a seguir, exemplifica o desencadeamento da ativação de NLRP3 por PAMPs/DAMPs e ROS:

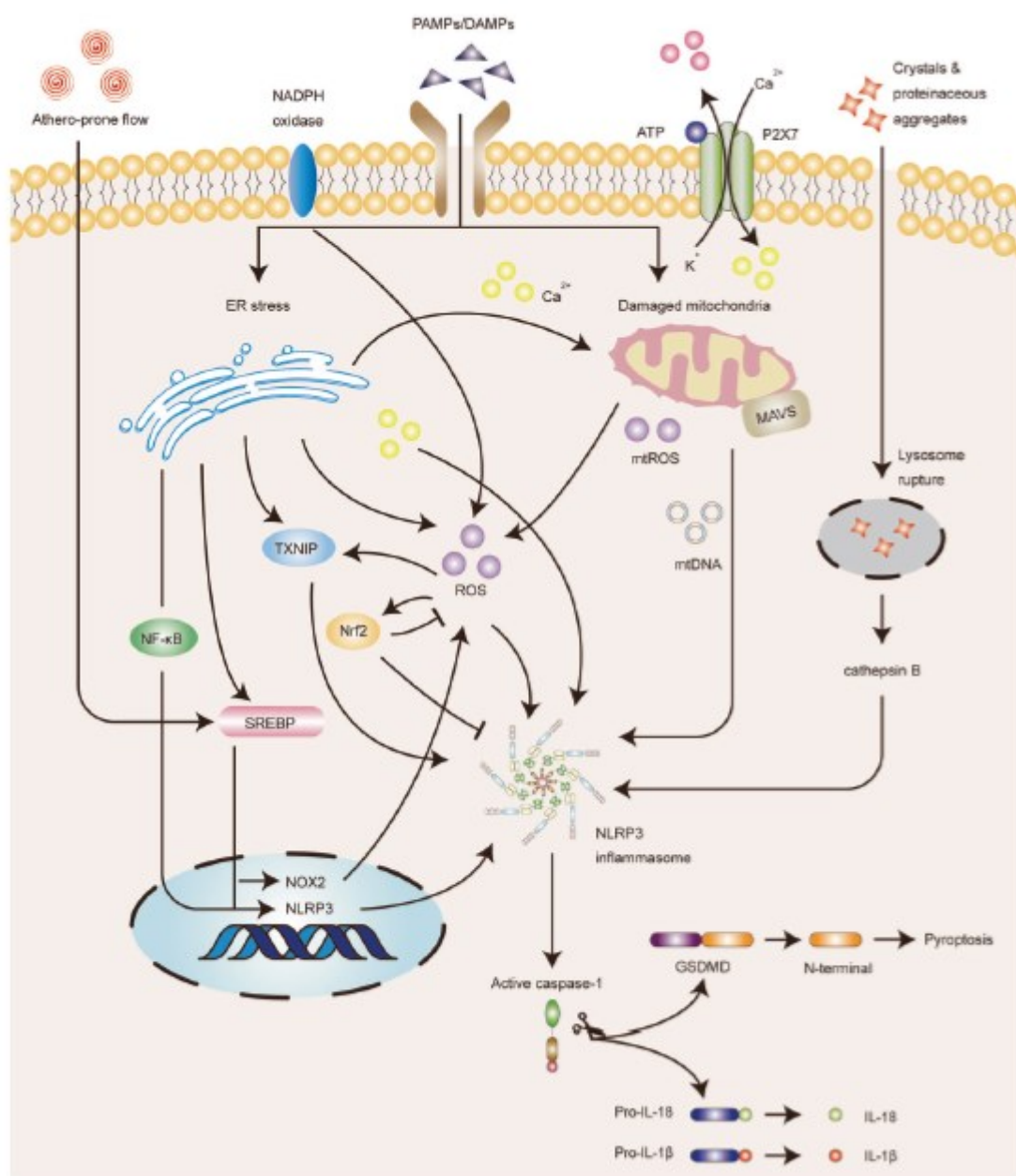


Figura 3 – Espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para a ativação do inflamassoma NLRP3 em células endoteliais. Athero-prone flow – fluxo anteropropenso; NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; PAMPs - Padrão Molecular Associado à Patógenos; DAMPs - Padrão Molecular Associado a Dano; ATP – trifosfato de adenosina; Ca^{2+} - cálcio; P2X7 – receptor purinérgico; TXNIP - Proteína de interação com tioredoxina; SREBP – Proteínas de ligação a elemento regulador de esterol; NOX2 – NADPH oxidase 2; GSDMD – gasdermina D; Nrf2 – Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (Fonte: Bai *et al.*, 2020)

2.4 Reação em cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) desenvolvida por Kary Mullis em 1985, baseia-se na amplificação em larga escala de fragmentos compostos por ácidos nucleicos de fita dupla (DNA) ou fita simples (RNA), gerando cópias idênticas que podem ser analisadas, fazendo com que haja a possibilidade de manipulação do material genético. Para que ocorra essa multiplicação, é utilizado um mix contendo dois primers, que são, basicamente, oligonucleotídeos, com sequências conhecidas, para flanquear a fita a ser replicada onde haverá a ligação da polimerase, além de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) contendo os 4 nucleotídeos para montagem das cadeias (A, T/U, C, G), uma polimerase termoestável, íons magnésio e solução tampão para que ocorra os ciclos, em termociclador, onde altas temperaturas são empregadas para separação (*melt*) das bandas da fita dupla, no caso de DNA, posteriormente a temperatura cai para que ocorra o anelamento dos primers e então a temperatura se estabiliza para que haja a extensão das fitas com a incorporação dos dNTPs (Kubista *et al.*, 2006).

A PCR em tempo real (qPCR) tem por objetivo distinguir e mensurar sequências de material genético específicos, mesmo que haja uma quantidade mínima na amostra, usando tecnologia de captação da fluorescência, já que durante a amplificação os sinais emitidos pela ligação do fluoróforo devem atingir níveis de limiar que se correlaciona com a sequência alvo original (Valasek e Repa, 2005).

A transcrição reversa de qPCR (RT-qPCR) tornou-se padrão na detecção e quantificação de alvos de RNA (Gibson, 1996), com vantagens atribuídas ao uso de fluoróforos para monitoramento da amplificação dos produtos durante os ciclos de PCR, em alguns casos, a combinação da detecção da amplificação de DNA em um único ensaio, além da diversidade de alvos que podem ser detectados em diferentes amostras, pouca variação entre os ensaios, o que gera resultados reproduzíveis, além da capacidade de realização de ensaios quantitativos além dos qualitativos (Halford *et al.*, 1999). Esta técnica se diferencia da qPCR porque necessita de um procedimento de conversão do RNA em DNA, através de uma DNA polimerase dependente de RNA, no caso, a transcriptase-reversa (Bustin, 2002). Após a transcrição reversa em DNA complementar (cDNA) realiza-se o ensaio de PCR para detecção dos alvos pretendidos. Através do termociclador, pode-se visualizar a amplificação em tempo real, quanto mais cedo aparecer a curva de amplificação do alvo, significa que o aumento de fluorescência foi detectado mais cedo, com isso, a

amostra possui concentrações maiores dos ácidos nucleicos de interesse (Bustin e Mueller, 2005).

Os fluoróforos de uso para detecção dos alvos podem ser não-específicos, como SYBR Green, que detectam fitas duplas de DNA (Morrison *et al.*, 1998), se ligam a elas e produzem maior fluorescência, detectável pelo aparelho, a desvantagem desse método é tornar a especificidade dependente somente dos *primers* da reação. Já sondas fluorescentes são feitas a partir de *amplicons* específicos que se ligam a parte do gene alvo e emite sinal fluorescente somente quando há hibridização com a fita complementar, isso faz com que sejam bem mais específicas ao gene de interesse (Bustin e Mueller, 2005).

Outro tipo de ensaio é o multiplex, que permite a detecção de diferentes alvos na mesma amostra, geralmente utilizando SYBR Green (Giglio *et al.*, 2003) ou sondas específicas (Johnson *et al.*, 2004). Também é possível a realização de *nested* qPCR, que consiste na amplificação de uma amostra que já foi amplificada, para detecções de amostras que possuem pouca quantidade do alvo, com o intuito de ter maior sensibilidade analítica (Max *et al.*, 2002), utiliza-se para a primeira reação dois primers externos e para a segunda, dois internos.

2.5 Justificativa e Objetivos

O conhecimento e a identificação de genes/moléculas cruciais no controle do carrapato *R. microplus*, logo nas fases iniciais de fixação na pele do hospedeiro, podem contribuir para a seleção de animais com perfil mais resistente à infestação, melhorando a produtividade animal. Ademais, a compreensão do papel dos inflamassomas NLRs em bovinos zebuínos e taurinos desafiados por infestações como a de *R. microplus* é importante para avanços no conhecimento que permitem desenvolver ferramentas biotecnológicas de combate ao carrapato, especialmente no âmbito da modulação da resposta imune inata e melhoramento genético animal. A ativação desregulada de NLRs pode levar a danos teciduais excessivos, aumentando os efeitos negativos da infestação para seus hospedeiros, além de ter um papel importante na transmissão vetorial de patógenos. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar o papel do inflamassoma em bovinos zebuínos e taurinos, infestados artificialmente e de forma controlada com larvas de *R. microplus*. A resposta inflamatória inata foi avaliada através da análise da expressão gênica em biópsias de

pele e células de *Buffy coat*, por meio de RT-qPCR, dos domínios *CARD*, *NOD2* e *PYD-CARD*, que são componentes dos inflamassomas de *NOD2*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4* e *AIM2*, além de alvos envolvidos na sua cascata de ativação, como *caspase-1*, *IL-1 β* , *NF- κ B*, e *NRROS*. A expressão gênica foi comparada entre animais taurinos e zebuínos e correlacionada com as quantidades de teleóginas presentes em cada animal para a caracterização fenotípica. As amostras foram coletadas antes e após a primeira e terceira exposição controlada, com quantidades conhecidas e mesma carga de larvas infestantes de *R. microplus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

A condução do experimento com animais e o delineamento experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, sob o protocolo nº 8798030820, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Wanessa Araújo Carvalho (CRMV-DF 087319). Esse mesmo processo foi aprovado pelo CEUA da Universidade Federal de Viçosa, em 10 de maio de 2023, sob o processo nº 24/2023, caracterizando a "não utilização de animais vivos para a utilização das amostras provenientes do experimento com animais vivos", sob a orientação do professor Dr. Artur Kanadani Campos (CRMV-MG 6542).

3.2 Local

O experimento com animais e a coleta de amostras biológicas foram realizados no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (LBMS) da Embrapa Gado de Leite, localizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), situado na Rodovia MG-133, Km 42, Zona Rural, Coronel Pacheco – Minas Gerais (MG). As extrações de RNA, RT-qPCR e qPCR foram realizadas na sede da Embrapa Gado de Leite, nos laboratórios de saúde animal e genética molecular, no município de Juiz de Fora - MG.

3.3 Animais

Foram utilizados 20 bezerros puros de origem (PO), não aparentados, provenientes de protocolo de Inseminação Artificial (IA) em 10 vacas da raça Gir e 10 vacas da raça Holandesa, para nascimentos contemporâneos. Houve acompanhamento pré-parto para evitar infestações por carrapatos ou o uso de medicamentos que pudessem alterar a resposta imune e metabólica no momento do parto. Para as matrizes da raça Gir, foi administrado carrapaticida *pour on* 60 dias antes da previsão de parto. Após isso, elas foram alocadas na baia maternidade, onde permaneceram sob constante avaliação. As matrizes da raça Holandesa permaneceram no *compost barn* da fazenda, onde houve vigilância no controle de carrapatos e menor infestação, devido às características do alojamento (Andrade, 2021).

3.3.1 Nascimento

Os bezerros, holandeses (7 fêmeas e 3 machos) e Gir (8 fêmeas e 2 machos), foram imediatamente separados das matrizes ao nascerem e transferidos para um galpão de alvenaria telado, a fim de evitar a entrada de possíveis parasitas hematófagos. As baias individuais foram previamente preparadas e limpas com desinfetantes (cloro ativo, formol 0,05%), carrapaticida e vassoura de fogo, para evitar contaminações por microrganismos, endo e ectoparasitas que pudessem influenciar na imunidade dos animais. Além disso, a área possuía medidas de segurança, barreira sanitária e manejo controlado de dejetos, com o objetivo de mantê-la livre de ectoparasitas hematófagos.

Ao chegarem ao galpão, foi realizada a cura do umbigo com tintura de iodo a 10%, a toailete com corte de pelos da cauda e orelhas, além da colostragem. Com o intuito de minimizar os efeitos da transferência de imunidade passiva (TIP) nos bezerros, padronizou-se a colostragem com Colostro Bovino em Pó (The Saskatoon Colostrum Company Ltd., importado pela Alta Genetics do Brasil LTDA), em duas fases: I) administração na primeira hora de vida, utilizando 800g da mistura, totalizando 200 mg de imunoglobulina; II) oito horas após a primeira administração, com a diluição de 400g da mistura, equivalente a 100 mg de imunoglobulina. Ambas as doses foram diluídas conforme as recomendações do fabricante e administradas por sonda esofágica (Alta Genetics do Brasil®) própria para bezerros. O colostro utilizado não possuía anticorpos contra carrapatos e doenças transmitidas por eles, visto que é importado do Canadá, onde não há problemas com infestações pelo parasito.

A eficiência da TIP foi avaliada por meio de refratômetro de proteína sérica (PS) e refratômetro de Brix, a partir do soro coletado 24 e 48 horas após a primeira administração do colostro, obtendo-se um resultado médio de PS de 6,29 g/dL, com desvio padrão (DP) de 0,79, enquanto o valor médio de Brix foi de 9,3%, com DP de 0,62.

3.3.2 Manejo de animais experimentais

Todos os animais foram identificados: os da raça Holandesa com a letra "H" seguida dos números "1 a 10", de acordo com a ordem de nascimento, e os da raça Gir com a letra "G", seguindo a mesma lógica numérica. Cada animal permaneceu em baia individual, separada por ripas de madeira, com balde instalado para livre acesso à água e concentrado contendo 19% de proteína bruta.

Diariamente, todos os bezerros receberam 6 litros de leite integral, divididos em duas refeições, uma pela manhã e outra à tarde, por meio de *milkbar*®, apoiados em suporte adequado nas baias, até os 60 dias de vida. Após o desmame, os animais passaram a receber silagem junto ao concentrado.

Quanto à limpeza, todas as baias foram higienizadas, com reposição da maravalha suja ou molhada, ao menos duas vezes ao dia, mantendo a altura adequada de 20 cm para o conforto dos animais. As demais áreas foram varridas ou lavadas, sempre que necessário, com água, sabão e água sanitária. Todos os *milkbar*® foram mantidos de molho em solução de cloro a 5% para desinfecção, após serem lavados com água e detergente, após cada refeição. Aos 30 dias de idade, todos os animais passaram por mochação (Adcock and Tucker, 2018), realizada com o bloqueio do nervo cornual com lidocaína, queima por ferro quente e administração, por dois dias, de anti-inflamatório (flunixin meglumine) para alívio da dor.

Uma bezerra da raça Holandesa faleceu devido a uma perfuração diafragmática após a realização de biópsias no fígado. Todos os animais passaram por essas coletas com o objetivo de avaliação para uma outra etapa do experimento. Um animal da raça Gir foi excluído das análises laboratoriais porque apresentou diversos problemas de cicatrização e desenvolvimento zootécnico abaixo do esperado em relação aos outros de sua raça. Portanto, o número de amostras avaliadas no experimento foi de nove animais em cada grupo.

A uniformização de todos os protocolos de manejo foi estabelecida com o propósito de mitigar interferências externas em cada espécime, visando minimizar o impacto iatrogênico nas análises subsequentes. Dessa forma, buscou-se avaliar as

discrepâncias genéticas e individuais de maneira mais precisa e isenta de influências externas.

3.3.3 Coletas e infestações

Todos os animais foram submetidos a três protocolos de infestação artificial com larvas de *R. microplus*, aproximadamente aos quatro, cinco e sete meses de vida. Na primeira infestação, utilizaram-se 10.000 larvas do carrapato, enquanto nas infestações subsequentes foram utilizadas 20.000 larvas. Todas as larvas empregadas nas infestações estavam livres dos agentes etiológicos responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina.

Devido à falta de recursos financeiros, este estudo realizou as análises de expressão gênica apenas na primeira e na terceira infestação. O objetivo foi caracterizar as respostas dos organismos à primeira exposição ao parasito e após infestações repetidas.

As coletas, realizadas imediatamente antes da infestação e 48 horas após, consistiram em amostras de sangue, obtidas por venopunção da jugular em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e em biópsias de pele através de *punch* dermatológico. Todas as amostras foram encaminhadas, sob refrigeração, para o laboratório na sede da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora – MG. A linha do tempo na Figura 4 demonstra as infestações e coletas:

Manutenção bezerros: área telada livre de carrapato.

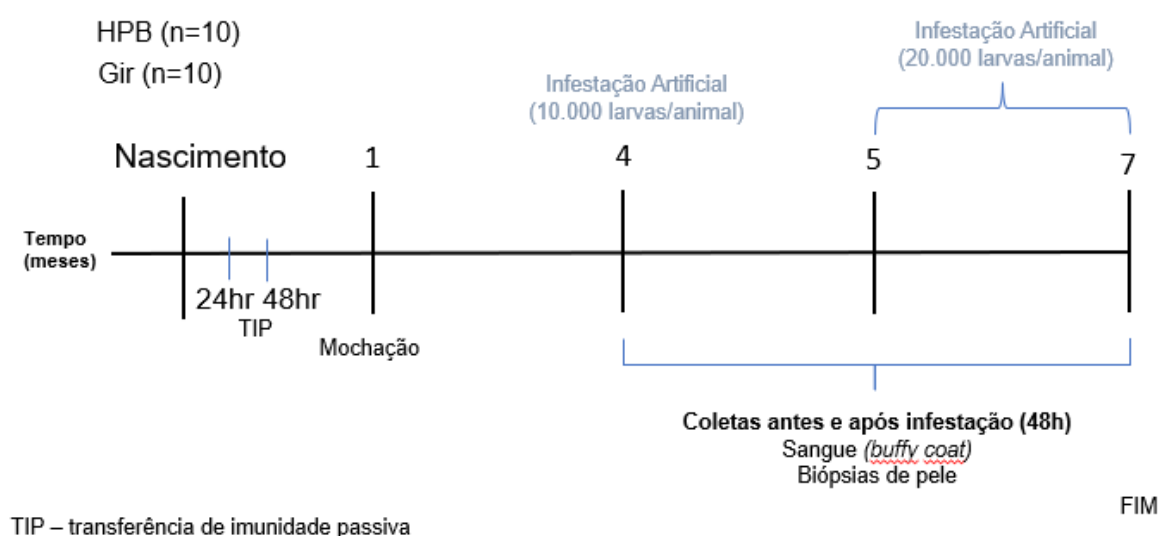


Figura 4 – Linha do tempo das infestações artificiais e coletas de amostras (Fonte: Elaboração própria)

Para a separação de leucócitos do sangue periférico (*buffy coat* ou camada leucocitária), os tubos coletados foram centrifugados a 2400 g/10 minutos (min) em temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, a camada leucocitária (aproximadamente 500 µL por tubo de coleta) foi cuidadosamente retirada e as células foram transferidas para um tubo de 50 mL, no qual se adicionaram quatro vezes o volume coletado de tampão ACK (0,144M de NH_4Cl + 0,01M de NH_4HCO_3). O tubo foi gentilmente agitado por inversão (30 vezes) e incubado por 2 minutos para a lise completa das hemácias. Em seguida, foi adicionado o dobro do volume de PBS para lavagem das células, seguido de nova centrifugação a 2400 g/10 min em TA. O sobrenadante foi descartado por inversão, e o procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez, seguido da ressuspensão das células em 1 mL de PBS contendo 1% de soro fetal bovino inativado. As células foram contadas em solução de azul de tripan, separando-se 5×10^6 células por amostra em microtubos de 1,5 mL. Os tubos foram novamente centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4 Graus Celsius (°C), o sobrenadante foi descartado por inversão e as células (5×10^6 por animal) foram ressuspensas em RNA Cell Protection ou RNA Later (1 mL por amostra). As células foram acondicionadas na geladeira por 24 horas e, posteriormente, congeladas a -80 °C para extração futura de RNA.

Além da coleta de sangue, foram realizadas biópsias de pele com *punch* dermatológico (6 milímetros), coletando-se fragmentos de pele de cada animal antes e após cada infestação (48 horas). As coletas antes e após a infestação foram realizadas em locais próximos à região principal de soltura dos carrapatos (tábua do pescoço). Antes da realização das biópsias, que possuem baixa invasividade, os pelos dos animais foram cortados com tesoura para reduzir a contaminação das amostras, sem, contudo, induzir qualquer lesão epitelial prévia. Em cada fragmento, foi adicionado RNA Later (1 mL por amostra, Ambion, Carlsbad, EUA), seguido de acondicionamento em geladeira por 24 horas e congelamento a -20 °C, para posterior extração de RNA e qRT-PCR com o objetivo de identificar os alvos pretendidos.

3.3.4 Contagem de teleóginas

Vinte e um dias após a infestação artificial, realizou-se a contagem de teleóginas no lado esquerdo dos animais do experimento, utilizando o Método Simplificado de Contagem (Veríssimo e Oliveira, 1994). Essa contagem foi efetuada por meio da inspeção individual de cada animal, obtendo-se os valores referentes à

quantidade de carrapatos ingurgitados, com o ciclo parasitário completo, para cada animal e infestação.

3.4 Metodologia da RT-qPCR

a. Extração de RNA em biópsias de pele

Para a extração do RNA da pele, foram realizados alguns testes com o objetivo de verificar qual metodologia resultaria em melhor aproveitamento e quantificação das amostras, uma vez que o tecido possui uma alta concentração de queratina e apresenta dificuldades para homogeneização. Assim, foram empregadas três técnicas de extração: o kit RNeasy Mini-Kit (Qiagen®), o kit RNeasy Fibrous Tissue (Qiagen®) e o método Trizol (fenol-clorofórmio) com auxílio do equipamento Tissue Ruptor (Qiagen®). Optou-se pela extração utilizando o método Trizol devido ao seu maior rendimento. Embora o método apresentasse mais impurezas nas amostras, as concentrações finais de RNA foram iguais ou superiores em comparação com o kit, além de ser economicamente mais viável (Apêndice A).

No protocolo de extração com Trizol e clorofórmio, pesaram-se 50 mg de cada biópsia de pele, que foram fragmentadas em pedaços menores com auxílio de uma tesoura cirúrgica e colocadas em microtubos contendo 1 mL de Trizol. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada com o Tissue Ruptor e incubada, em temperatura ambiente, por 5 minutos. Após isso, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, agitou-se manualmente durante 15 segundos e realizou-se uma incubação por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 11.000 g/15 min a 4 °C, separando-se a fase aquosa, onde permaneceu o RNA, para um novo microtubo. Adicionou-se 1,5 µL de glicogênio livre de RNase (fabricante) e 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 11.000 g por 10 minutos a 4 °C para formação do pellet de RNA. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 mL de etanol a 75% gelado, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. Após a remoção do álcool remanescente, que foi evaporado em temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de água ultrapura isenta de RNase. Incubaram-se as amostras em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Após essa etapa, as amostras

foram transferidas para microtubos menores e armazenadas, em alíquotas, em ultrafreezer a -80 °C.

b. Extração de RNA em células de *Buffy coat*

Para as amostras de *buffy coat*, seguiu-se o protocolo de extração de RNA utilizando o kit RNeasy Mini-Kit, conforme as recomendações do fabricante (Qiagen®). As amostras foram retiradas do freezer, descongeladas e centrifugadas por 10 minutos. O sobrenadante contendo RNA Later foi descartado, restando as células da capa leucocitária. Em seguida, para a ruptura das células, o microtubo foi colocado em nitrogênio líquido até o congelamento. Adicionou-se 600 µL do tampão de lise e utilizou-se uma agulha e seringa estéril (1 mL) para a homogeneização da amostra. Adicionou-se então 600 µL de etanol 70% e misturou-se bem com uma pipeta.

Transferiu-se 700 µL da amostra para uma coluna em um tubo de coleta de 2 mL, que foi centrifugada a 8.000 g por 30 segundos. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado e adicionou-se 350 µL de tampão RW1 à coluna, que foi centrifugada novamente a 8.000 g por 30 segundos. O líquido de coleta foi descartado. Adicionou-se 80 µL de DNase I (10 µL da solução estoque de DNase I em 70 µL de tampão RDD) e deixou-se agir por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 350 µL de tampão RW1 à coluna, que foi centrifugada a 8.000 g por 30 segundos, e o eluído foi descartado.

Acrescentou-se 500 µL de RPE à coluna, que foi centrifugada a 8.000 g por 30 segundos para a lavagem da coluna, e o conteúdo do tubo de coleta foi descartado. Adicionou-se mais 500 µL de RPE à coluna e centrifugou-se a 8.000 g por 2 minutos, descartando-se o conteúdo do tubo. A coluna foi removida cuidadosamente do tubo de coleta e colocada em um novo tubo de 2 mL. Centrifugou-se a coluna por um minuto na velocidade máxima para eliminar qualquer resíduo de RPE.

Para a eluição, transferiu-se a coluna para um tubo de coleta de 1,5 mL, pipetou-se 30 µL de água RNase-free diretamente no centro da membrana da coluna e centrifugou-se a 8.000 g por 1 minuto. Após a extração, manteve-se as amostras em freezer a -80 °C. Uma alíquota de 1 µL foi utilizada para quantificação no Nanodrop.

3.4.1 Quantificação e qualidade do RNA em amostras de pele e *Buffy coat*

A quantificação do RNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), o qual revelou concentrações adequadas de RNA em todas as amostras. A integridade e a qualidade do RNA foram avaliadas por meio de eletroforese capilar no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Os eletroferogramas gerados demonstraram perfis consistentes, com picos nítidos e ausência de sinais de degradação significativa. Para avaliar a degradação, o software do equipamento utilizou o cálculo do Índice de Integridade do RNA (RIN), baseado na eletroforese em gel capilar, que varia de 1 a 10, onde 1 indica uma amostra totalmente degradada e 10 indica uma amostra totalmente conservada. Foram considerados valores de alta qualidade aqueles entre 3 e 7 (Fleige e Pfaffl, 2006).

3.4.2 Síntese cDNA (DNA complementar)

Após a extração do RNA, as amostras foram submetidas à transcrição reversa para a síntese de cDNA. Utilizou-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada amostra, adicionaram-se 4 µL da amostra de RNA, 1 µL de primer Oligo dT e 1 µL de Água Nuclease-Free. A reação foi incubada a 70°C por 5 minutos, depois retirada e imediatamente colocada sobre gelo por 5 minutos. Em seguida, a placa de amostras foi centrifugada brevemente por 10 segundos.

Adicionou-se a cada amostra 4 µL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 1,5 µL de MgCl₂, 1 µL de PCR Nucleotide Mix, 0,5 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 µ/µL), 1 µL de GoScript™ Reverse Transcriptase e 7 µL de Nuclease-Free Water. A reação foi incubada em um termociclador nas seguintes condições: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos, para permitir a retrotranscrição eficiente do RNA em cDNA. Após a transcrição reversa, as amostras foram armazenadas em um freezer a -20 °C.

3.4.3 PCR em tempo real para amplificação de alvos

a. Alvos de amplificação e Primers

Os alvos pretendidos, tanto para análise quanto para controles endógenos, foram escolhidos com base no guia para realização de PCR (Bustin *et al.*, 2005). Para a padronização das biópsias de pele, optou-se pelos genes Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) e β -actina (Konnai *et al.*, 2003; McGuire *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2007), que apresentaram maior estabilidade e valor de M menor que

0,5. Esses genes também foram mencionados em trabalhos anteriores sobre expressão de citocinas e demonstraram boa estabilidade em fibroblastos bovinos (Toorani *et al.*, 2021). O GAPDH é uma enzima envolvida na glicólise e no metabolismo celular, sendo expressa de maneira constitutiva em muitos tipos celulares, o que a torna uma referência útil, por ser facilmente detectada e apresentar menor variabilidade de expressão em diferentes condições. A β -actina, envolvida no citoesqueleto celular, assim como o GAPDH, está presente em diversos tecidos, facilitando sua utilização como controle em diferentes tipos de amostras (Lin e Redies, 2012).

Para o *buffy coat*, os genes endógenos escolhidos foram Proteína Ribossomal Ácida 60S P0 (RPLP0) e Ubiquitina (Robinson *et al.*, 2007; Ragni *et al.*, 2013; Daibert *et al.*, 2020; Verma *et al.*, 2022). O RPLP0 é uma proteína ribossomal envolvida na síntese de proteínas, com função de tradução, e está frequentemente detectada devido à sua abundância e presença em diversos tecidos, facilitando a quantificação de RNA mensageiro (mRNA) (Ishii *et al.*, 2006). A ubiquitina, envolvida no processo de marcação para degradação proteica, é estável em diferentes tipos celulares (Ciechanover, 2015).

Os alvos escolhidos para a avaliação da cascata de oligomerização do inflamassoma NLR foram *NOD2* e *CARD*, componentes precursores da ativação. Foram analisadas também as estruturas dos inflamassomas do tipo NLRs, como o domínio *PYD-CARD* (NLRs), *FIIND* (NLRP1) e *HIN* (AIM2), com o objetivo de diferenciação, além de caspase-1 e IL-1 β , produtos diretos da ativação. Incluíram-se também *NF κ B* e *NRROS*, genes que podem estar relacionados à ativação de inflamassomas, além dos produtos gerados pela ativação, como *CASP1* e *IL-1 β* . Os genes de *NOD2* (NCBI Reference Sequence: XM_005218467.5), *CARD* (NCBI Reference Sequence: AB050006.1), *PYD-CARD* (Uniprot sequence: [https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8H XK9/entry#sequences])(https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8H XK9/entry#sequences); Éxons: [https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSBTAG00000020535;r=25:27285066-27286532])(https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSBTAG00000020535;r=25:27285066-27286532)) e *NLRP1* (Uniprot: [https://www.uniprot.org/uniprotkb/E1BNN6/entry])(https://www.uniprot.org/uniprotkb/E1BNN6/entry); Éxons:

[https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSBTAG0000020433;r=19:26027813-26059756](https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSBTAG00000020433;r=19:26027813-26059756) foram desenhados em regiões de junção éxon-éxon das proteínas, aumentando a possibilidade de detecção pela RT-qPCR, uma vez que as regiões removidas por *splicing* (introns) não são expressas em mRNA. O AIM2 (NCBI Reference Sequence: XM_024990372.1) foi desenhado a partir da sequência proteica encontrada para a região *HIN* específica do inflamassoma, utilizando a base de dados. A sequência proteica foi convertida em sequência gênica e os primers foram desenhados a partir da sequência de nucleotídeos. Como não foram encontradas sequências genéticas em bases de dados e não havia região para bovinos na época, os primers não amplificaram no teste de eficiência. A Figura 5 demonstra as junções proteicas que formam os inflamassomas.

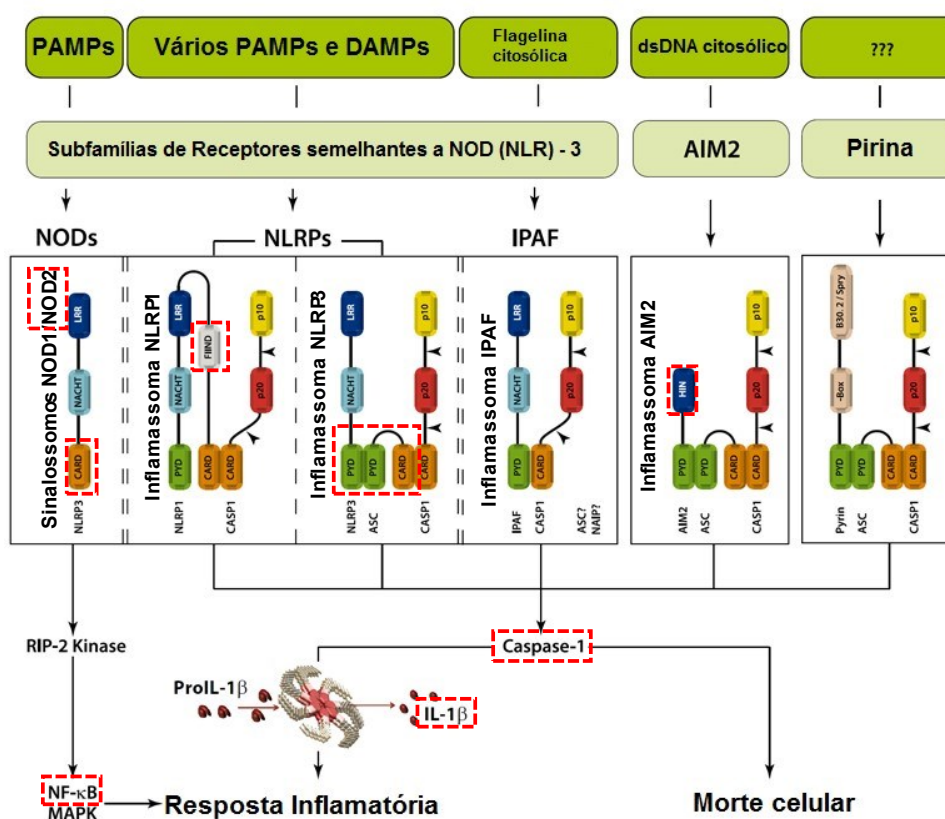


Figura 5 – Sinais de perigo ou componentes microbianos que levam a ativação de inflamassomas. Os desenhos dos *primers* foram realizados nas regiões destacadas em vermelho (Fonte: Adaptado de <https://adipogen.com/inflammasomes/>)

Para desenho dos primers, a sequência de aminoácidos das proteínas foi acessada através da base de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A3Q1MUY5/entry>), buscou-se também através do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), copiou-se todas as sequências FASTA para o domínio da proteína, seguidamente, utilizou-se o software Mega11 para determinação das regiões éxon-éxon, na molécula de cDNA, complementar ao mRNA, observando-se as regiões conservadas do gene. Realizou-se uma busca no GeneBank, mais uma vez, afim de encontrar as sequências de nucleotídeos dos domínios da proteína alvo, a partir disso, com o auxílio do código genético e da sequência conservada da proteína, buscou-se a região em que se encontrava a tradução do gene. Com a região da sequência de nucleotídeos encontrada, o desenho dos nucleotídeos para o RT-qPCR foram realizados pelo programa online Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>), em que as condições de anelamento, temperatura de dissociação, porcentagem dos ácidos nucleicos citocina e guanina (CG) foram verificados. Após a obtenção dos oligonucleotídeos, buscou-se a especificidade por sequências bovinas dos pares de *primers*, realizado pela ferramenta Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). *Primers* que mostraram alta similaridade de sequências com outras espécies foram descartados. As sequências de *CASP1*, *IL-1 β* , *NF κ B* e *NRROS* e os *primers* endógenos já haviam sido desenhadas anteriormente por Daibert *et al.* (2020). A Tabela 1 demonstra as sequências de primers utilizadas.

Tabela 1 – Sequências de primers utilizadas no experimento

Genes	Primers		Tm °C
<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 (NOD2)</i>	CCCTGGAAGAACTCTGCCTG AAGTGTTTCCTCGGAGCCAG	F R	60 60
<i>Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD)</i>	CACTTTGTGGACCAGCATCG CCAGGCTGGAGAAAAGCTGA	F R	59,5 60
<i>Pyrin domain (PYD) and caspase recruitment domain (CARD) (PYD-CARD)</i>	ACTATCTGGAGGCGTACGGT TTGTCCGAAGTAGTGCGCTC	F R	60,1 60,4
<i>Nod-Like Receptor family pyrin domain containing 1 (NLRP1)</i>	CCACCTCTACCTGATCCCCA AGCAGAGCTCCAATTCCTCG	F R	60 59,8
<i>Absent in Melanoma-2 (AIM2)</i>	GCTGAAGTGCCTCTGACAAA ACACACCAGGGAAATCAGCA	F R	58,4 59,5
<i>Interleucina 1-β (IL-1β)</i>	CAGTGCCTACGCACATGTCT	F	57,5

<i>Caspase-1 (CASP1)</i>	AGAGGAGGTGGAGAGCCTTC	R	58,2
	ACCCATACCATCCCTTGCTT	F	59,9
	GCTGGCATTGTGGGAAGAA	R	60
<i>Negative Regulator of Reactive Oxygen Species (NRROS) (NM_001034391.1)</i>	TCATATCCAGGAAGCGGAGACT	F	63,2
	CGAGAAGGGCCGGAAGAC	R	64,5
<i>Factor Nuclear kappa B (NF-Kb) (NM_001102101.1)</i>	ATCTTGGCAGGTCCCTCGTA	F	63,8
	CCAATGCGTGTGCCTGAA	R	64,7
<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0) (NM_001012682)</i>	CAACCCTGAAGTGCTTGACAT	F	62,9
	AGGCAGATGGATCAGCCA	R	63
Ubiquitina (XM_005217976)	GGCAAGACCATCACCTGGAA	F	66,3
	GCCACCCCTCAGACGAAGGA	R	67,5
<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (NM_001034034)</i>	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	F	56,8
	CCCTCCACGATGCCAAAGT	R	57,8
β -actina	AGCAAGCAGGAGTACGATGAGT	F	52,7
	ATCCAACCGACTGCTGTCA	R	53,5

T_m – Temperatura de *melting*; F – *forward*; R – *reverse* (Fonte: Elaboração própria)

b. Padronização PCR em tempo real e cálculos de expressão gênica

A padronização das reações de RT-qPCR visou o estabelecimento das condições de amplificação das amostras e *primers* utilizados (Tabela 2). Para tal, utilizou-se um pool equimolar das amostras de cDNA provenientes de das biópsias de pele e, outro para as células de *Buffy coat*. Foram testadas cinco quantidades de amostras de cDNA do pool, para *Buffy coat* utilizou-se 8 nanogramas (ng), 4 ng, 2 ng, 1 ng, 0,5 ng, já para pele 32 ng, 16 ng, 8 ng, 4 ng, 2 ng, com primers a 100 nM e 200 nM em triplicata. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos (90°C / 15 segundos, 63°C / 30 segundos e 60°C / 30 segundos). Após a conclusão de cada reação, a curva de dissociação (*melting point*) foi examinada para garantir que cada reação tenha amplificado um fragmento único. Os valores de Ct (*Cycle threshold*), por sua vez, indicaram o número de ciclos de PCR nos quais o sinal de fluorescência atingiu o limiar da curva de amplificação.

Para cada gene, foi selecionada a condição ótima de concentração de primer e amostra de cDNA, garantindo eficiência entre 90% e 110% para todos os genes, tanto os alvos quanto os controles endógenos conforme preconizado por Bustin *et al.* (2005). A eficiência da reação é indicativa de bom desempenho em RT-qPCR (Wong e Medrano, 2005). O cálculo da eficiência baseou-se em uma análise de regressão linear simples dos valores de Ct em relação ao logaritmo das concentrações de cDNA,

resultando no slope (inclinação da reta). A eficiência para cada conjunto de primers foi então calculada usando a seguinte equação:

$$E = (10^{-1/\text{slope}-1}) \times 100;$$

em que E é a eficiência da reação (Pfaffl, Horgan e Dempfle *et al.*, 2002).

Um slope de -3,32 indica reação de eficiência 2, ou seja, de 100%, sugerindo que a quantidade de produto formado deve dobrar a cada ciclo. Inclinações inferiores a -3,32 sinalizam reações com eficiência inferior a 100%, enquanto inclinações superiores a -3,32 podem indicar problemas de qualidade de amostra ou pipetagem (Applied Biosystems, 2004).

Após a estabilização das condições reacionais para o experimento, as amplificações foram realizadas, em duplicata, para cada alvo analisado. Cada reação possuiu volume total de 10 µL, contendo quantidades variáveis de cDNA, conforme estabelecido pelo teste de eficiência, *primers forward* e *reverse*, 5 µL de Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e água *nuclease free*. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos (90°C / 15 segundos, 63°C / 30 segundos e 60°C / 30 segundos) no termociclador ABI Prism 7500 fast (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

3.5 Avaliação estatística

Calculou-se os valores médios de Ct do gene alvo e dos controles endógenos para cada amostra do programa *ABI Real Time PCR 7500 v2.3* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Os resultados foram transferidos para uma planilha no *software Microsoft Excel* e realizou-se o cálculo dos valores de ΔCt . Para isso, a diferença entre o Ct alvo e a média geométrica dos Cts dos controles endógenos (Ct endógenos), tidos como referência, foram calculadas para cada tempo de infestação e animal conforme normalizando-se os dados de expressão através da fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógenos}.$$

Para comparação entre os tempos de infestação, em que cada animal era comparado a ele mesmo, entre o seu grupo antes e pós infestação específico, o resultado de ΔCt foi utilizado. Através dele, pelo *software GraphPad Prism* versão 8.4.2 (GraphPad Programa, La Jolla, Califórnia, EUA), realizou-se o teste de identificação de outliers, excluindo-os da análise quando presentes, e posteriormente

realizando o Teste pareado de T. Os dados de ΔCt foram correlacionados às contagens de carrapato individuais, pela Correlação de Spearman, por meio do software *Graphpad Prism* versão 8.4.2.

Para comparação da diferença de expressão apresentada entre as raças taurina e zebuína realizou-se o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, onde o ΔCt da amostra pós-infestação (ΔCt PI) foi subtraído do ΔCt da amostra antes da infestação (ΔCt AI), através da fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ PI} - \Delta Ct \text{ AI},$$

a partir disso, as médias da variação da expressão gênica foram analisadas no software *GraphPad Prism* versão 8.4.2 (GraphPad Programa, La Jolla, Califórnia, EUA) através do Teste não pareado de T, avaliando-se as médias dos grupos. Adotou-se $p < 0,05$ para representação das diferenças significativas analisadas. Dados outlier foram excluídos pelo programa pelo método de Rout ($Q=1\%$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transferência de Imunidade Passiva

Os resultados de TIP por PS demonstraram média de 6,29 g/dL, e desvio padrão (DP) de 0,79, enquanto em Brix a média permaneceu em 9,3% com DP de 0,62. Segundo a literatura, os pontos de corte estimados, para uma excelente TIP através da colostragem estão acima de 6,2 g/dL em refratômetro de proteína sérica e 9,4% em refratômetro de Brix em, pelo ao menos, 40% do rebanho. Valores entre 5,8 e 6,1 g/dL ou 8,9 e 9,3% atingem valores bons de colostragem, desde que atinja, ao menos, 30% do rebanho (Souza *et al.*, 2021). Valores abaixo do estabelecido são considerados regulares e ruins, o que foge ao padrão aconselhado de TIP e aos critérios de manejo estabelecidos na fazenda experimental. De acordo com os dados obtidos pelas análises, todos os animais do experimento obtiveram TIP satisfatória.

4.2 RT-qPCR

4.2.1 Quantificação do RNA em amostras de pele e Buffy coat

A quantificação do RNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific; Apêndice A), o qual revelou concentrações adequadas de RNA em

todas as amostras, indicando uma quantidade suficiente para as análises subsequentes tanto em pele (Tabela 2) quanto em *buffy coat* (Tabela 3).

Tabela 2 – Quantificação de RNA em ng/μL das amostras extraídas em pele pelo equipamento Nanodrop

Infestação	Amostra	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
AI1	G1	221,98	5,549	2,995	1,85	0,72
	G2	213,38	5,335	2,729	1,95	1,4
	G3	19	0,476	0,317	1,5	0,18
	G4	304,12	7,603	3,937	1,93	1,34
	G5	23,3	0,583	0,392	1,49	0,44
	G6	128,06	3,201	1,682	1,9	0,73
	G7	128,2	3,205	1,671	1,92	1,01
	G8	17,3	0,433	0,299	1,45	0,41
	G9	193,51	4,838	2,553	1,9	0,93
	H1	188,1	4,703	2,487	1,89	1,26
	H4	46,6	1,165	0,625	1,86	1,11
	H6	104	2,6	1,323	1,97	0,74
	H7	35,68	0,892	0,573	1,56	0,36
	H8	7,35	0,184	0,136	1,35	0,11
	H9	66,12	1,653	0,746	2,22	0,8
PI1	H1	16,95	0,424	0,187	2,26	0,97
	H4	188,88	4,722	2,403	1,97	1,3
	H6	66,65	1,666	0,871	1,91	1,23
	H7	9,41	0,235	0,099	2,37	0,21
	H8	206,62	5,165	2,684	1,92	1,7
	H9	280,58	7,014	3,723	1,88	0,88
	G1	175,05	4,376	2,305	1,9	0,53
	G2	180,55	4,514	2,387	1,89	0,54
	G3	21,3	0,532	0,332	1,6	0,76
AI3	G4	213,94	5,348	2,817	1,9	0,55
	G5	23,9	0,598	0,37	1,62	0,24
	G6	215,38	5,385	2,823	1,91	0,82
	G7	219,33	5,483	2,876	1,91	0,55
	G8	31	0,775	0,505	1,53	0,45
	G9	285,18	7,129	3,708	1,92	0,73
	G1	104,73	2,618	1,337	1,96	1,11
	G2	13,99	0,35	0,194	1,8	0,34
	G4	10,75	0,269	0,156	1,72	0,34
	G6	60,39	1,51	0,795	1,9	0,67
	G7	385,56	9,639	5,105	1,89	1,97
	G9	214,31	5,358	2,794	1,92	1,11
	H1	244,04	6,101	3,224	1,89	1,71

PI3	H2	180,6	4,516	2,54	1,78	0,53
	H4	322,28	8,057	4,171	1,93	1,75
	H6	317,55	7,939	4,17	1,9	1,11
	H7	290,59	7,265	3,832	1,9	1,12
	H8	229,07	5,727	3,032	1,89	1,14
	H9	238,09	5,952	3,137	1,9	1,48
	H10	113,2	2,831	1,653	1,71	0,34
	H11	312,3	7,806	4,007	1,95	1,12
	G1	217,1	5,427	2,847	1,91	1,34
	G2	22	0,549	0,299	1,83	0,29
	G4	33,2	0,83	0,437	1,9	0,59
	G6	112,2	2,806	1,482	1,89	1,02
	G7	186,8	4,671	2,496	1,87	1,13
	G9	357,1	8,928	4,661	1,92	1,27
	H1	366,3	9,157	4,97	1,84	1,28
	H2	107,9	2,698	1,623	1,66	0,46
	H4	371	9,275	4,958	1,87	1,14
	H6	296,2	7,406	3,921	1,89	1,36
	H7	179,8	4,495	2,349	1,91	0,91
	H8	282,9	7,073	3,68	1,92	1,51
	H9	736,5	18,411	9,405	1,96	1,84
	H10	58,2	1,454	0,886	1,64	0,37
	H11	162,9	4,073	2,341	1,74	0,81

AI-1 – antes da primeira infestação; PI-1 – após a primeira infestação; AI3 – antes da terceira infestação; PI3 – após a terceira infestação

Tabela 3 – Quantificação de RNA em ng/μL das amostras extraídas em *Buffy coat* pelo equipamento Nanodrop

Infestação	Amostra	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
AI1	G1	101,57	2,539	1,273	1,99	0,65
	G2	110,16	2,754	1,325	2,08	1,82
	G3	29,5	*	*	*	*
	G4	57,22	1,431	0,701	2,04	2,07
	G5	129	*	*	*	*
	G6	77,99	1,95	0,958	2,04	0,4
	G7	29,16	0,729	0,351	2,08	0,43
	G8	57	*	*	*	*
	G9	108,76	2,719	1,327	2,05	0,36
	H1	107,14	2,678	1,314	2,04	2,07
	H2	69,8	1,745	0,856	2,04	1,41
	H4	166,37	4,159	2,053	2,03	0,94
	H6	154,33	3,858	1,893	2,04	2,69
	H7	147,19	3,68	1,796	2,05	1,84
	H8	194,62	4,865	2,453	1,98	1,94

PI1	H9	105,14	2,629	1,293	2,03	2,37
	H10	217,7	*	*	*	*
	H11	97,8	*	*	*	*
	G1	94,72	2,368	1,17	2,02	1,69
	G2	79,22	1,981	0,982	2,02	1,31
	G3	86,6	2,166	1,031	2,10	0,92
	G4	80,9	2,022	1,007	2,01	1,47
	G5	91,5	*	*	*	*
	G6	68,72	1,718	0,877	1,96	1,36
	G7	93,06	2,327	1,157	2,01	0,91
	G8	78,9	*	*	*	*
AI3	G9	74,75	1,869	0,923	2,02	1,33
	H1	155,19	3,88	1,93	2,01	1,97
	H2	86,8				
	H4	107,28	2,682	1,298	2,07	1,5
	H6	161,34	4,034	2,018	2	2,25
	H7	46,43	1,161	0,544	2,13	1,78
	H8	69,78	1,744	0,859	2,03	1,92
	H9	45,97	1,149	0,561	2,05	0,46
	H10	55,9	*	*	*	*
	H11	57,6	*	*	*	*
	G1	119,42	2,985	1,415	2,11	1,75
PI3	G2	59,69	1,492	0,758	1,97	1,74
	H2	64	*	*	*	*
	G4	419,37	10,484	5,17	2,03	1,96
	G6	447,44	11,186	5,552	2,01	2,08
	G7	95,02	2,376	1,265	1,88	1,5
	G9	197,67	4,942	2,409	2,05	1,6
	H1	92,7	2,318	1,12	2,07	1,46
	H4	320,57	8,014	3,911	2,05	1,76
	H6	116,98	2,924	1,42	2,06	1,94
	H7	182,69	4,567	2,206	2,07	2,06
	H8	152,7	3,818	1,862	2,05	2,16
PI3	H9	273,34	6,834	3,321	2,06	2,24
	H10	23	*	*	*	*
	H11	85,3	*	*	*	*
	G1	187,2	4,68	2,272	2,06	2,29
	G2	108,18	2,704	1,308	2,07	1,71
	G3	86,6	*	*	*	*
	G4	256,71	6,418	3,141	2,04	1,87
	G5	71,3	*	*	*	*
	G6	175,61	4,39	2,155	2,04	2,27
	G7	24,41	0,61	0,333	1,83	1,57
	G8	61,1	*	*	*	*
PI3	G9	121,47	3,037	1,483	2,05	2,38
	H1	294,69	7,367	3,6	2,05	1,86

H2	38,2	*	*	*	*
H4	220,22	5,506	2,687	2,05	1,43
H6	170,61	4,265	2,114	2,02	1,98
H7	175,27	4,382	2,117	2,07	0,66
H8	139,27	3,482	1,702	2,05	1,94
H9	200,33	5,008	2,448	2,05	1,44
H10	58,3	*	*	*	*
H11	49,1	*	*	*	*

AI1 – antes da primeira infestação; PI1 – após a primeira infestação; AI3 – antes da terceira infestação; PI3 – após a terceira infestação; * – dados não demonstrados

A integridade e qualidade do RNA foram avaliadas em 20 amostras aleatórias de pele e 10 amostras de *buffy coat* por meio de eletroforese capilar no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Para a avaliação da degradação, o software do equipamento utiliza o cálculo do RIN, obtendo média de 5,2. Como o RIN considerado intacto é superior a 7,5 enquanto o degradado é inferior a 3 (Fleige *et al.*, 2006), pôde-se considerar que, para análises de RT-qPCR, as amostras estavam conservadas. Os eletroferogramas gerados demonstraram perfis consistentes (Figura 5), com picos 18s e 28s nítidos.

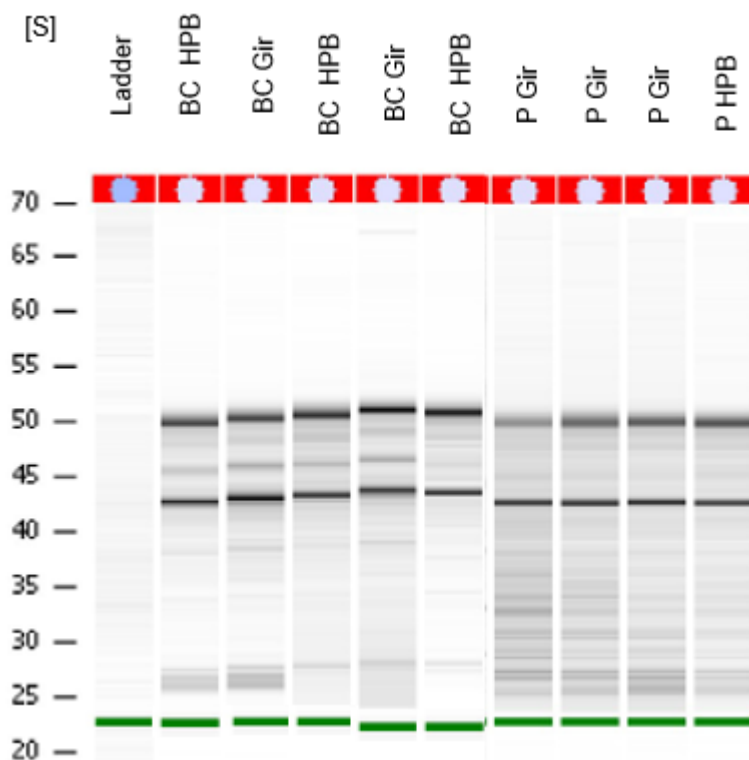


Figura 5 – Eletroforeograma representativo de amostras aleatórias de RNA de *Buffy coat* e pele gerados pelo Bioanalyzer 2100. As amostras de *Buffy coat* foram extraídas pelo Kit RNeasy e pele através do método de Trizol. HPB – Holandês Preto e Branco, BC – *Buffy coat*, P – pele.

4.2.2 Padronização dos alvos

Os valores obtidos para a eficiência dos *primers*, tanto endógenos quanto alvos de análise, estão elencados na Tabela 4, indicando as concentrações, volumes e temperaturas de *melting* averiguadas. Os *primers* para o inflamassoma AIM2 não amplificaram em pele ou *buffy coat*, apesar de os resultados *in silico* terem sido eficientes (Apêndice B). Em relação aos primers de *IL-1 β* , estes demonstraram eficiência em *buffy coat* (103,62%), mas foram ineficientes em pele (82,43%); portanto, a amplificação nessas amostras não foi realizada. Os primers para o alvo de *iNOS* foram ineficientes para ambas as amostras (11,7%).

Tabela 4 – Padronização da eficiência para reações de RT-qPCR para os alvos

Tecido	Alvo	Eficiência (%)	Primer (nM)	Amostra (ng)
Pele	<i>CARD</i>	94,41299	200	4
	<i>PYD-CARD</i>	94,23048	200	4
	<i>NLRP1</i>	99,1445	200	16
	<i>NOD2</i>	97,62436	200	4
	<i>Caspase-1</i>	102,13	200	8
	<i>NFκB</i>	87,15	100	16
	<i>NRROS</i>	105,90	200	16
	<i>GAPDH</i>	94,28	200	1
	<i>B-actina</i>	103,62	200	1
	<i>CARD</i>	104,687	200	2
<i>Buffy coat</i>	<i>PYD-CARD</i>	97,90793	200	2
	<i>NLRP1</i>	96,75576	200	4
	<i>NOD2</i>	91,23318	200	4
	<i>IL-1β</i>	90,66	200	2
	<i>Caspase-1</i>	99,25	200	2
	<i>NFκB</i>	94,59	200	2
	<i>NRROS</i>	103,01	200	2
	<i>RPLP0</i>	102	75	4,7
	<i>Ubiquitina</i>	102	300	3,8

% - porcentagem; nM – nanomolar; ng - nanogramas

Para todas as amostras analisadas, a curva de *melting* esteve dentro das curvas e temperaturas previstas. A Figura 6 representa a curva de *melting* (A) e o gráfico de amplificação (B) no alvo *PYD-CARD* em biópsia de pele.

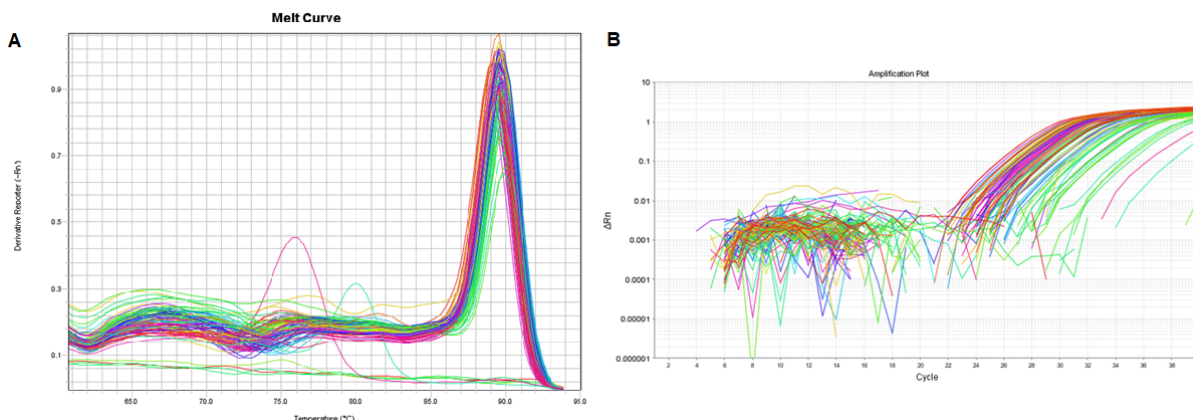


Figura 6 – Imagem da amplificação por RT-qPCR em biópsia de pele em bovinos das raças Gir e holandês. (A) Curva de *melting* do alvo *PYD-CARD* (B) gráfico de amplificação das amostras do alvo *PYD-CARD* (as amplificações foram padronizadas até o 40º ciclo).

4.3 Expressão gênica em biópsias de pele e células de *buffy coat*: efeito de uma ou repetidas infestações sobre a imunidade inata e inflamassomas

As expressões gênicas dos precursores (*CARD* e *NOD2*) e componentes dos inflamassomas (*PYD-CARD* e *NLRP1*) foram avaliadas em fragmentos de biópsias de pele e células de *Buffy coat*. Além desses alvos, foram analisadas citocinas relacionadas à iniciação da oligomerização (*NFκB* e *NRROS*) e produtos (*IL-1β* e *CASP1*) em parte desses animais. Foram escolhidos seis animais zebuínos, com menor contagem de carrapato, e seis animais taurinos, com maior contagem de carrapatos, com o intuito de avaliar a resposta dos padrões de maior resistência e suscetibilidade, respectivamente.

Como os dados sobre a ativação de inflamassomas em bovinos não são bem descritos (Ventras *et al.*, 2018), a análise das expressões de precursores e produtos é importante, pois pode indicar que essas vias estão sendo ativadas nesses animais. Embora não tenha sido possível realizar ensaios de imunodeteção, como Western blot ou ELISA por questões financeiras, para determinar essas proteínas no soro e confirmar a ativação real dessas vias, as diferenças nos padrões moleculares observadas permitem inferir a participação das vias de inflamassoma no parasitismo por *R. microplus*.

Para verificar a expressão gênica dos alvos em cada tempo de infestação, foi adotado o cálculo de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ que reflete a diferença entre o ΔCt do gene alvo e o ΔCt da média dos controles endógenos para cada amostra (Pfaffl, Horgan e Dempfle, 2002). Após a diferença individual, cada amostra foi subtraída do seu respectivo grupo controle, no período anterior à infestação (AI1, AI3) para cada raça (adaptado de Livak e Schmittgen, 2001). Os resultados foram comparados antes da primeira infestação (AI1), após a primeira infestação (PI1), antes da terceira infestação (AI3) e após a terceira infestação (PI3), tanto dentro da mesma raça quanto entre taurinos e zebuínos, nos diferentes tempos, conforme os tópicos a seguir.

a. Expressão gênica de *NOD2*, *CARD*, *NLRP1* e *PYD-CARD* em pele e *Buffy coat* de animais taurinos e zebuínos

As análises de expressão gênica em biópsias de pele para o alvo *NOD2* não apresentaram variações significativas em comparação entre infestações ou entre as raças (Figura 7A). Entretanto, para *Buffy coat*, animais Holandês Preto e Branco (HPB) demonstraram queda na expressão gênica após a primeira exposição ao carrapato ($P= 0,0354$) enquanto os animais Gir apresentaram um aumento após a terceira infestação ($P= 0,0412$) (Figura 7B).

O *NOD2* é um gene codificador de proteínas que faz parte de uma família de receptores de PRRs, capazes de levar à ativação de inflamassomas (Kelley *et al.*, 2019). Apesar dos dados obtidos acerca da expressão gênica de *NOD2* em pele não diferirem significativamente, as células do *Buffy coat* mostraram um declínio na expressão dessa molécula em animais HPB após a primeira exposição ao carrapato. Por outro lado, os animais zebuínos apresentam um aumento na expressão gênica na terceira infestação controlada (Figura 7B). Esses resultados sugerem que a expressão de *NOD2* pode ser determinante para a amplificação de padrões específicos de inflamação, influenciando tanto a formação de memória celular, mediante liberação de citocinas pró-inflamatórias produzidas pela ativação de NF κ B, quanto a sobrevivência celular, medida pela expressão de *CASP1* e *IL-1 β* (Trindade e Chen, 2020). Vale destacar que a citocina IL-1 β também participa da amplificação da inflamação por meio de proteínas de fase aguda, que já foram descritas como participantes ativas e diferenciais na resposta imune contra o carrapato bovino em animais taurinos e zebuínos (Tabor *et al.*, 2017). Mais estudos precisam ser conduzidos para verificar a produção de citocinas e a imunodeteção de quantificação do inflamassoma de *NOD2*

em tecidos infestados. A modulação dessas vias pode representar avanços significativos no controle do parasita em animais suscetíveis em áreas tropicais e subtropicais.

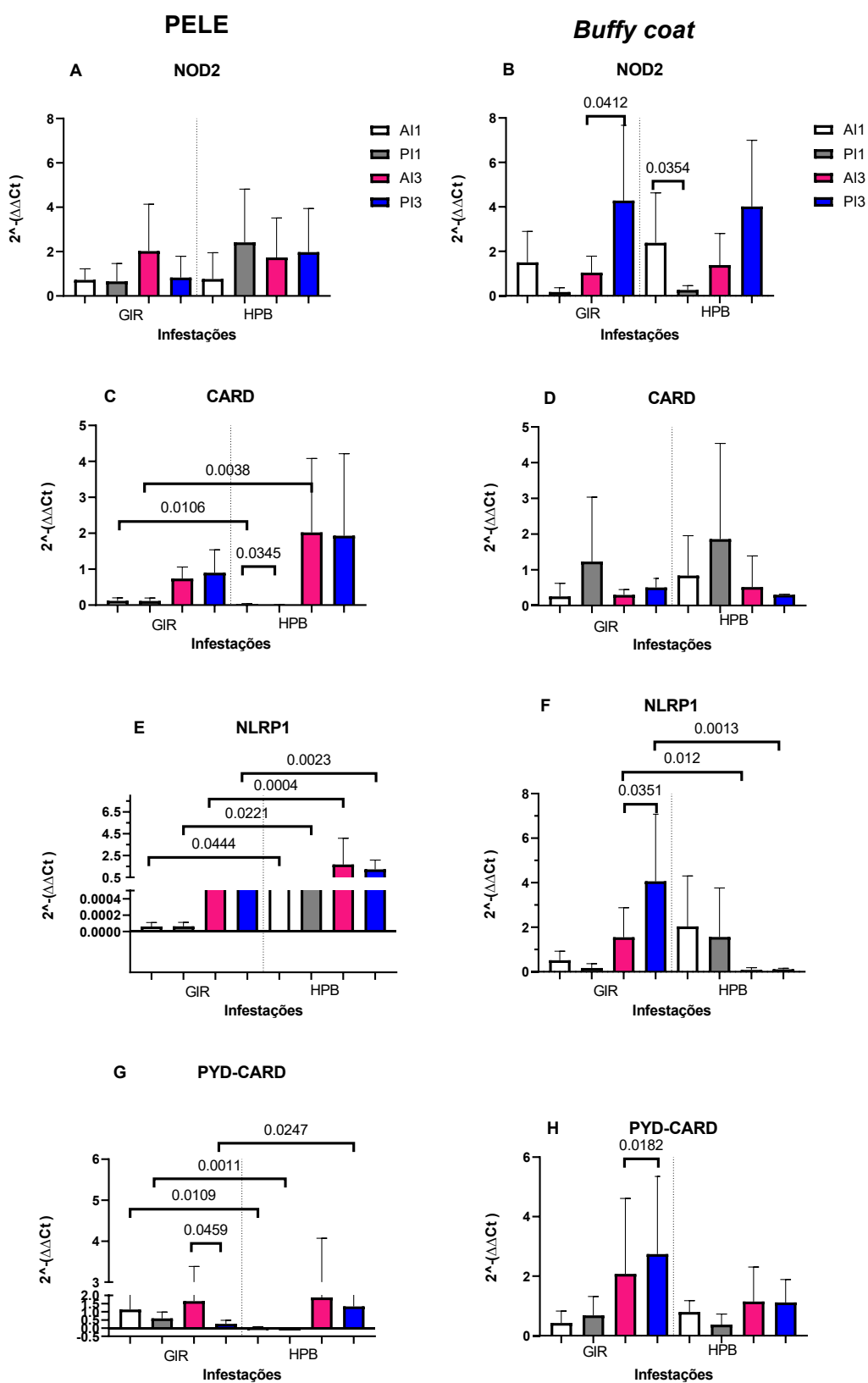


Figura 7 – Expressão gênica de alvos do inflamossoma na pele em buffy coat de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos. (A) Níveis de expressão gênica de Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 na pele (NOD2), (B) Níveis de expressão gênica de NOD2 na camada leucocitária, (C) Níveis de expressão de CARD na pele, (D) Expressão gênica de Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD) na camada leucocitária, (E) Expressão gênica de Nod-

Like Receptor family pyrin domain containing 1 (NLRP1) na pele, (F) Níveis de expressão gênica de NLRP1 na camada leucocitária, (G) Níveis de expressão de Pyrin-domain (PYD) and caspase recruitment domain (CARD) (PYD-CARD) na pele e (H) Níveis de expressão de PYD-CARD na camada leucocitária de bovinos holandeses (n=9) e gir (n=9), analisados antes e depois da 1ª e 3ª infestações por carrapatos. Um nível de significância de 5% foi usado com testes T pareados e não pareados. B11: antes da primeira infestação, A11: após a primeira infestação, B13: antes da terceira infestação, A13: após a terceira infestação.

Os níveis de expressão do gene *CARD*, que codifica um dos domínios relacionados a diferentes inflamassomas, sugeriram que os carrapatos desencadearam uma ativação diferencial da resposta imune inata em animais taurinos e zebuínos, principalmente na pele, local de fixação das larvas (Figura 7C e D). Os resultados demonstraram níveis baixos de expressão de *CARD* em animais HPB, que diminuíram significativamente após a primeira infestação ($P = 0,0345$; Figura 7C). Animais resistentes apresentaram menor expressão gênica de *CARD* antes da terceira exposição ao carrapato ($P = 0,0106$). No *buffy coat*, não houve diferenças significativas na expressão desse gene. O gene *CARD* está associado à ativação de inflamassomas, pois é responsável pelo recrutamento de caspase-1 (Zhao *et al.*, 2020). O aumento da expressão desse gene em organismos pode indicar maior produção de IL-1 β e IL-18, alterando vias de sinalização pró-inflamatórias ou apoptóticas por ativação de caspase-1 (Pelegrín, 2011). A diminuição da expressão de *CARD* após a primeira exposição ao carrapato em animais HPB, bem como o aumento da produção após a terceira exposição em animais Gir, podem indicar o envolvimento de vias apoptóticas e pró-inflamatórias mais exacerbadas nesses animais, com uma participação importante dos inflamassomas na resposta imune ao carrapato nos diferentes fenótipos de resistência apresentados pelos bovinos.

A expressão de *NLRP1* foi verificada a partir do gene que codifica o domínio FIIND, exclusivo desse inflamassoma (Yu *et al.*, 2018). Já a expressão do gene que codifica a junção entre os éxons que compõem os domínios *PYD-CARD* está associada a inflamassomas de NLRP3, NLRC4, AIM2 e Pirina (De Alba, 2019). A literatura descreve a ativação de NLRP3 (De Biase *et al.*, 2021; Escobar-Chavarría *et al.*, 2023) e NLRC4 (Wu *et al.*, 2018) em bovinos, porém não há estudos publicados sobre o inflamassoma AIM2 e Pirina. A hipótese deste trabalho é que a expressão gênica de *PYD-CARD* esteja relacionada ao inflamassoma NLRP3, pois a ativação desse inflamassoma ocorre por muitos estímulos moleculares e celulares, como influxo de íons, disfunções mitocondriais, danos lisossomais e produção de ROS (Kelley *et al.*, 2019).

Nossos resultados demonstraram que o alvo *NLRP1* não apresentou diferenças na expressão entre os tempos de infestação na pele, mas exibiu perfis de expressão gênica diferenciados entre animais resistentes e suscetíveis ao carrapato (Figura 9C). Animais HPB apresentaram maior expressão de *NLRP1* em biópsias de pele do que animais Gir em todos os tempos avaliados ($P < 0,05$). Em células do *buffy coat*, os animais HPB também expressaram menos *NLRP1* que os Gir antes e após a terceira infestação ($P < 0,05$). No entanto, esses últimos responderam com maior expressão de *NLRP1* após a terceira infestação por carrapato ($P = 0,0351$; Figura 7F).

O gene *NLRP1* esteve aumentado em todas as fases das infestações em animais taurinos comparados a zebuínos na pele. O inflamassoma NLRP1, em bovinos, parece não estar intimamente relacionado à ativação por antraz, mas a parasitas, como *T. gondii*, e por depleção de ATP celular (Vrentas *et al.*, 2020), apesar da mesma autora afirmar que é ativado por essas vias (Ventras *et al.*, 2018). A ativação desse inflamassoma também não está relacionada à ativação de receptores TLR e sinalização por NFκB. Gibson *et al.* (2016) demonstraram que vacas Pardo-Suíça produzem maiores níveis de ROS quando comparadas às HPB, associando essa maior produção à inibição da ativação de inflamassomas e, consequentemente, à menor liberação de IL-1β, enquanto há um padrão oposto na outra raça. No presente estudo, observou-se um perfil semelhante em animais Gir, que demonstraram maiores níveis de produção de ROS pós-infecção, porém sem ativação de inflamassoma, principalmente na primeira exposição. Além disso, mesmo a nível sistêmico, *NLRP1* manteve maior expressão gênica em animais taurinos, corroborando esses achados.

Em relação à expressão dos genes *PYD-CARD* na pele, foi observada uma menor expressão ($P = 0,0459$) na raça Gir após a terceira infestação (Figura 7G). Comparando a expressão gênica entre as raças, os animais resistentes apresentaram maior expressão do que os suscetíveis antes ($P = 0,0109$) e após a primeira infestação ($P = 0,0011$). Entretanto, após a terceira infestação, os animais HPB mostraram uma expressão gênica maior que os animais Gir ($P = 0,0247$). No *buffy coat* (Figura 7H), os zebuínos apresentaram níveis mais elevados de expressão após a terceira infestação ($P = 0,0182$).

Observa-se que animais taurinos e zebuínos apresentam perfis de inflamação associados a inflamassomas do tipo NLR, com expressões gênicas diferenciadas entre as raças estudadas e as diferentes infestações. Entretanto, são necessários

estudos com testes sorológicos para avaliar as proteínas ativadas nesses animais, a fim de desvendar a atuação nas linhagens estudadas.

- b. Expressão gênica de *NFκB*, *NRROS*, *IL-1β* e *CASP1* em pele e *Buffy coat* de animais taurinos e zebuínos

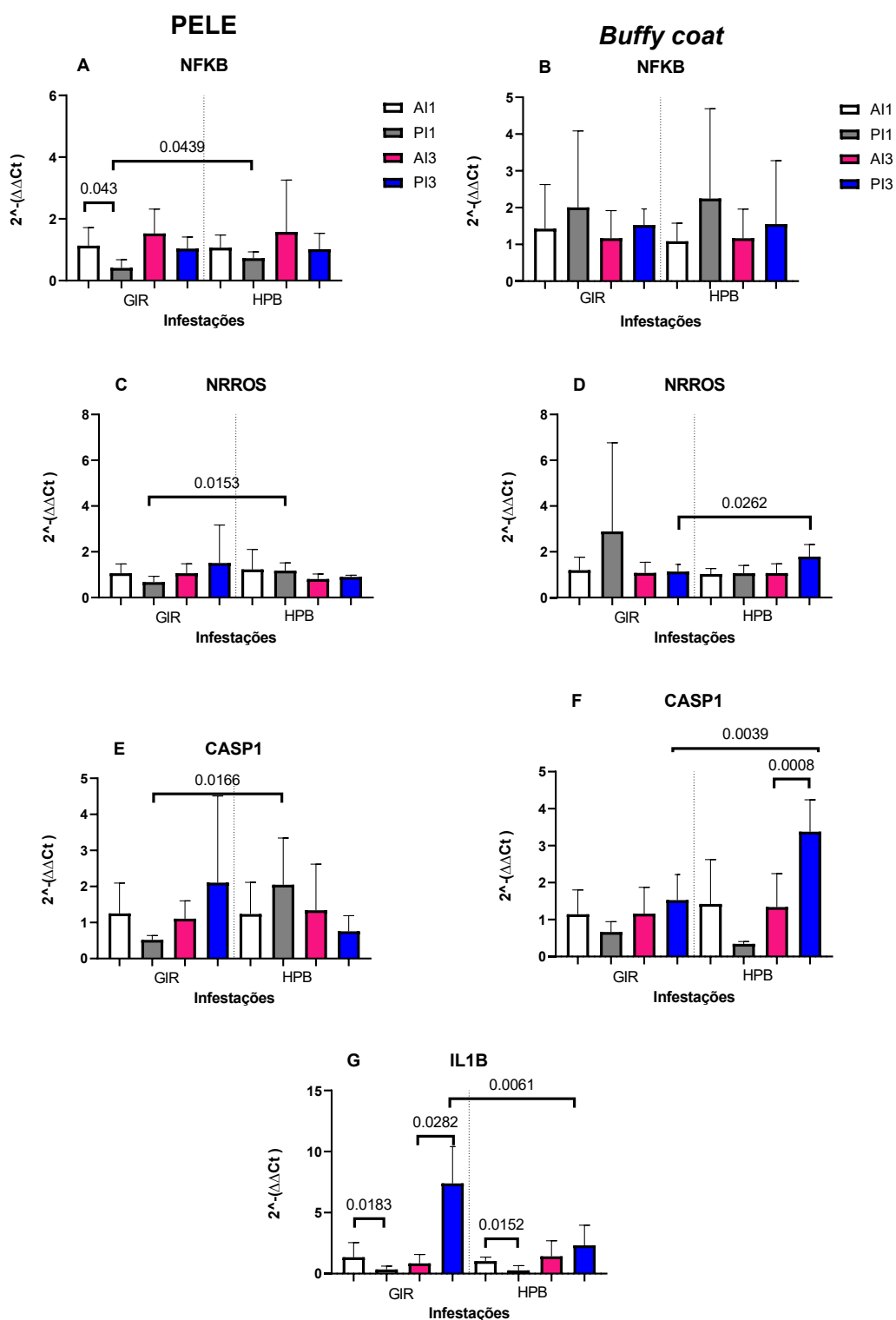


Figura 8 – Expressão gênica de alvos de resposta imune na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos. (A) Níveis de expressão gênica de genes Factor Nuclear kappa B (NF-Kb) na pele, (B) Níveis de expressão gênica de NFkB na camada leucocitária, (C) Níveis de expressão de Negative Regulator of Reactive Oxygen Species (NRROS) na pele, (D) Expressão gênica de NRROS na camada leucocitária, (E) Expressão gênica de Caspase-1 (CASP1) na pele, (F) Níveis de expressão gênica de CASP1 na camada leucocitária e (G) Níveis de expressão de Interleucina 1- β (IL-1 β) na camada leucocitária de bovinos holandeses (n=6) e gir (n=6), analisados antes e depois da 1ª e 3ª infestações por carrapatos. Um nível de significância de 5% foi usado com testes T pareados e não pareados. BI1: antes da primeira infestação, AI1: após a primeira infestação, BI3: antes da terceira infestação, AI3: após a terceira infestação.

A expressão de *NFkB* na pele demonstrou um declínio na primeira infestação em animais Gir ($P = 0,043$). A comparação entre as raças revelou que animais resistentes apresentaram menor expressão gênica de *NFkB* do que os suscetíveis após a primeira exposição ao carrapato ($P = 0,0439$) na pele (Figura 8A), enquanto no *buffy coat* não foram observadas diferenças significativas. A expressão do gene que codifica a enzima *NRROS* esteve aumentada em animais taurinos em relação aos zebuínos após a primeira infestação ($P = 0,0153$) (Figura 8C) na pele, enquanto, no *Buffy coat*, o aumento ocorreu após a terceira infestação ($P = 0,0262$) (Figura 8D).

O NFkB é um fator de transcrição pró-inflamatório que regula uma diversidade de genes associados ao desenvolvimento inflamatório da imunidade inata e adaptativa (Merighi *et al.*, 2022). Por meio da via canônica, esse fator estimula a liberação de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) ou IL-1 β , além da ativação de diversos PAMPs (Mulero *et al.*, 2019). Moré *et al.* (2019) e Piper *et al.* (2008) descrevem que animais de origem taurina têm maior expressão gênica, em pele infestada, de IL-1 β e NFkB do que animais resistentes. Nossos resultados corroboram esses estudos, visto que, comparando animais Gir e HPB, após a primeira infestação, observou-se o mesmo padrão em pele para *NFkB* (Figura 8A). No *buffy coat*, não houve alterações significativas na expressão de *NFkB* (Figura 8B), sugerindo uma atividade inflamatória local. Franzin *et al.* (2017) correlacionam o aumento da expressão de *NFkB* aos receptores do tipo Toll em gado suscetível; no entanto, neste estudo, não avaliamos alvos de TLR.

A ativação de NFkB leva ao aumento da transcrição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas células endoteliais e à liberação de óxido nítrico (NO), que exerce um feedback negativo impedindo a ativação de NFkB (Kelleher *et al.*, 2011; Baig *et al.*, 2015), inclusive em bovinos (Grumbach *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, tentamos amplificar o gene que codifica a enzima iNOS; no entanto, os *primers* não demonstraram boa eficiência e, portanto, não conseguimos realizar as amplificações.

Dessa forma, alternativamente, verificamos a expressão da Enzima Repressora de Óxido Nítrico Sintase (NRROS), responsável por causar feedback negativo na produção de reativos de oxigênio, de forma a evitar danos teciduais (Noubade *et al.*, 2014). Em nossas análises, animais suscetíveis apresentaram níveis de expressão de NRROS superiores aos resistentes após a primeira exposição controlada ao carrapato na pele, e após a terceira infestação no *buffy coat*. Resultados preliminares de nossa equipe sobre a produção de reativos de oxigênio no soro dos mesmos animais que participaram do nosso experimento demonstraram que animais Gir apresentam maiores concentrações de reativos de oxigênio do que animais HPB (Moreira *et al.*, 2023; Gráfico Anexo A). Sugere-se que o aumento da expressão do gene que codifica o NRROS possa estar associado à regulação de uma resposta inflamatória mediada pelo aumento de reativos de oxigênio no soro de animais suscetíveis, de forma a controlar os danos teciduais causados por essas moléculas. Uma vez que existem outras vias canônicas, além da via dos inflamassomas, que podem ativar a produção de reativos de oxigênio e a ativação de NFkB, novos estudos são necessários para avançar o conhecimento sobre a modulação imunológica apresentada por animais taurinos e zebuínos frente à infestação por carrapatos.

Em relação ao gene de caspase-1 (*CASP1*), verificou-se que, em biópsias de pele, esse gene apresentou maior expressão em HPB após a primeira infestação ($P = 0,0166$) quando comparado aos Gir (Figura 8E). Já no *buffy coat* (Figura 8F), animais taurinos aumentaram a expressão gênica após a terceira infestação ($P = 0,0008$), além de expressarem maior quantidade do que zebuínos nesse mesmo momento ($P = 0,0039$).

A expressão gênica de *interleucina-1 β* (*IL-1 β*) não pôde ser avaliada em biópsias de pele, como mencionado. No entanto, em células de *buffy coat* (Figura 8G), a expressão de *IL-1 β* foi significativamente variável entre as raças e os tempos de infestação. Em animais resistentes, após a primeira exposição, houve declínio na expressão de *IL-1 β* ($P = 0,0183$), enquanto após a terceira infestação houve um aumento considerável ($P = 0,0282$). Em animais suscetíveis, também houve declínio após a primeira infestação ($P = 0,0152$). Comparando animais Gir e HPB, os zebuínos apresentaram maior expressão gênica desse alvo após a terceira infestação ($P = 0,0061$).

Embora a expressão de *PYD-CARD* entre Gir e HPB após a primeira infestação tenha demonstrado uma queda na raça taurina, o oposto ocorreu na

expressão de *NLRP1*, em que animais taurinos apresentaram maior expressão gênica desse inflamassoma. Como a expressão gênica de *NLRP1* é específica pelo domínio FIIND (Fenini *et al.*, 2020), pode-se inferir que há ativação dessa via de inflamassoma em animais suscetíveis, enquanto em animais resistentes pode haver o envolvimento de outra via de inflamassoma. O gene *CASP1* também demonstrou aumento em animais taurinos, o que reafirma o envolvimento dessa via pró-inflamatória, principalmente em relação à terceira infestação. O gene *CASP1* está relacionado à clivagem dos precursores da citocina IL-1; no entanto, neste estudo, não foi possível avaliar *IL-1 β* em biópsias de pele. A *IL-1 β* esteve mais expressa em animais zebuínos, principalmente na terceira infestação (Figura 8G), o que corrobora o estado de maior ativação inflamatória nesses animais.

A *IL-1 β* em animais Gir pode indicar que houve ativação, principalmente de maneira sistêmica, de inflamassomas NLRs na terceira infestação, visto que os animais apresentaram aumento da expressão dos genes *NOD2* (Figura 7B), *PYD-CARD* (Figura 7G e H) e *IL-1 β* (Figura 8G) concomitantemente. A IL-1 β é um dos principais mediadores da inflamação; sua liberação resulta em um aumento da resposta inflamatória.

A maior expressão de *CASP1* em animais taurinos e a maior expressão de *IL-1 β* em zebuínos podem estar relacionadas ao momento da coleta das amostras. O aumento de *IL-1 β* nos zebuínos pode ser consequência dos níveis elevados de *CASP1* em um momento anterior, enquanto nos taurinos a clivagem citoplasmática de *IL-1 β* ainda não ocorreu, resultando em respostas mais retardadas nesses animais.

4.4 Variações na expressão gênica de alvos: comparação proporcional entre animais Gir e HPB

Para verificar a modulação da expressão gênica em cada raça, frente a infestação por carrapatos, seja ela a primeira ou a terceira exposição, foi adotado o cálculo da diferença entre o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (*fold change*) das amostras experimentais, após infestação, e o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ da amostra antes de cada infestação, tida como controle. Essa metodologia visa demonstrar que podem existir diferenças significativas entre o que animais expressam fisiologicamente, sem a infestação por carrapatos, e passam a expressar após a exposição controlada em cada raça.

- a. Alteração da expressão de *NOD2*, *CARD*, *NLRP1* e *PYD-CARD* em pele e *Buffy coat* de animais taurinos e zebuínos expostos ao carrapato pela primeira vez ou após três infestações

NOD2 é um membro da família de proteínas receptoras do tipo NOD, responsável por iniciar as respostas inflamatórias quando tais receptores são ativados no citosol (Strober *et al.*, 2008). Ele desempenha um papel fundamental na ativação de inflamassomas da família NLR. Ao verificarmos o *fold change* da expressão dos genes que codificam *NOD2*, *NLRP1* e *PYD-CARD*, além de inflamassomas que contêm o domínio CARD, em células do *buffy coat*, observamos que animais Gir apresentaram variações positivas na expressão frente à exposição por carrapatos significativamente maiores quando comparados aos HPB (Figura 9). Isso demonstra a participação ativa e diferencial de inflamassomas na ativação da resposta imune em animais taurinos e zebuínos frente à infestação por carrapatos, sugerindo sua ampla influência sobre os padrões de inflamação desenvolvidos por essas raças. A maior participação dos inflamassomas em animais Gir pode estar associada a uma maior resistência à infestação por carrapatos apresentada por raças zebuínas, o que também pode envolver a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18, ativadas por essas vias de inflamassoma. Isso pode afetar a produção de proteínas de fase aguda e a migração de células para o sítio de fixação do carrapato, mediando uma resposta imune mais efetiva no controle desse parasita. A expressão gênica na pele não apresentou padrões de variação significativos entre as raças nos tempos avaliados. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo de coleta, feito 24 horas após a infestação, momento em que a expressão dos genes pode não ter sido detectada. De qualquer forma, novos estudos devem ser realizados para identificar os produtos da expressão gênica e validar os resultados obtidos. De forma preliminar, podemos sugerir que a modulação da ativação de inflamassoma por animais taurinos e zebuínos pode estar influenciando o desfecho da infestação, afetando o ciclo reprodutivo do carrapato.

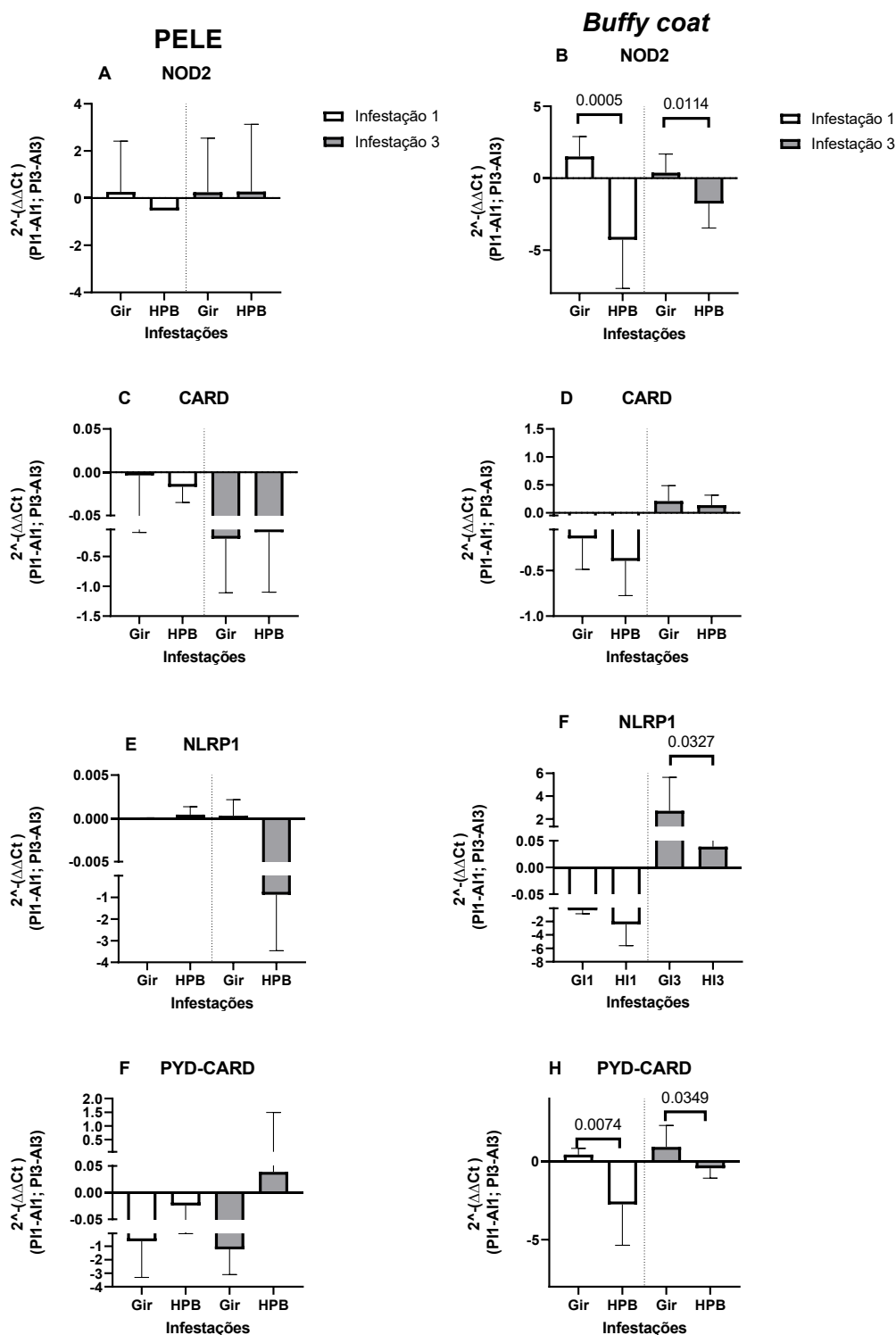


Figura 9 – Variação na expressão gênica de alvos do inflamossomo na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos. (A) Níveis de expressão gênica de Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 (NOD2) na pele, (B) Níveis de expressão gênica de NOD2 na camada leucocitária, (C) Níveis de expressão de Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD) na pele, (D) Expressão do gene CARD na camada leucocitária, (E) Expressão do gene Nod-Like Receptor family pyrin domain containing 1 (NLRP1) na pele, (F) Níveis de expressão gênica de NLRP1 na camada leucocitária, (G) Níveis de expressão de Pyrin-domain

(PYD) and caspase recruitment domain (CARD) (PYD-CARD) na pele e (H) Níveis de expressão de PYD-CARD na camada leucocitária de bovinos holandeses (n=9) e gir (n=9), analisados antes e depois da 1ª e 3ª infestações por carrapatos. Um nível de significância de 5% foi usado com testes T pareados e não pareados.

- b. Alteração da expressão de *NFκB*, *NRROS*, *CASP1* e *IL-1β* em pele e *Buffy coat* de animais taurinos e zebuínos expostos ao carrapato pela primeira vez ou após três infestações

A avaliação dos precursores (*NFκB* e *NRROS*) não apresentou diferenças significativas entre as raças avaliadas. Entretanto, os produtos (*CASP1* e *IL-1β*) mostraram diferenças a nível sistêmico entre as linhagens taurina e zebuína, com a *caspase-1* evidenciando níveis elevados em taurinos e *IL-1β* em zebuínos na terceira infestação. O aumento desses produtos está relacionado à ativação de inflamassomas, embora de maneiras distintas. Animais Gir parecem ter uma resposta mais rápida, com níveis de expressão de *IL-1β* mais elevados nessa linhagem, enquanto a *CASP1*, sendo seu precursor, pode estar associada a uma atividade mais lenta e menos pró-inflamatória em HPB.

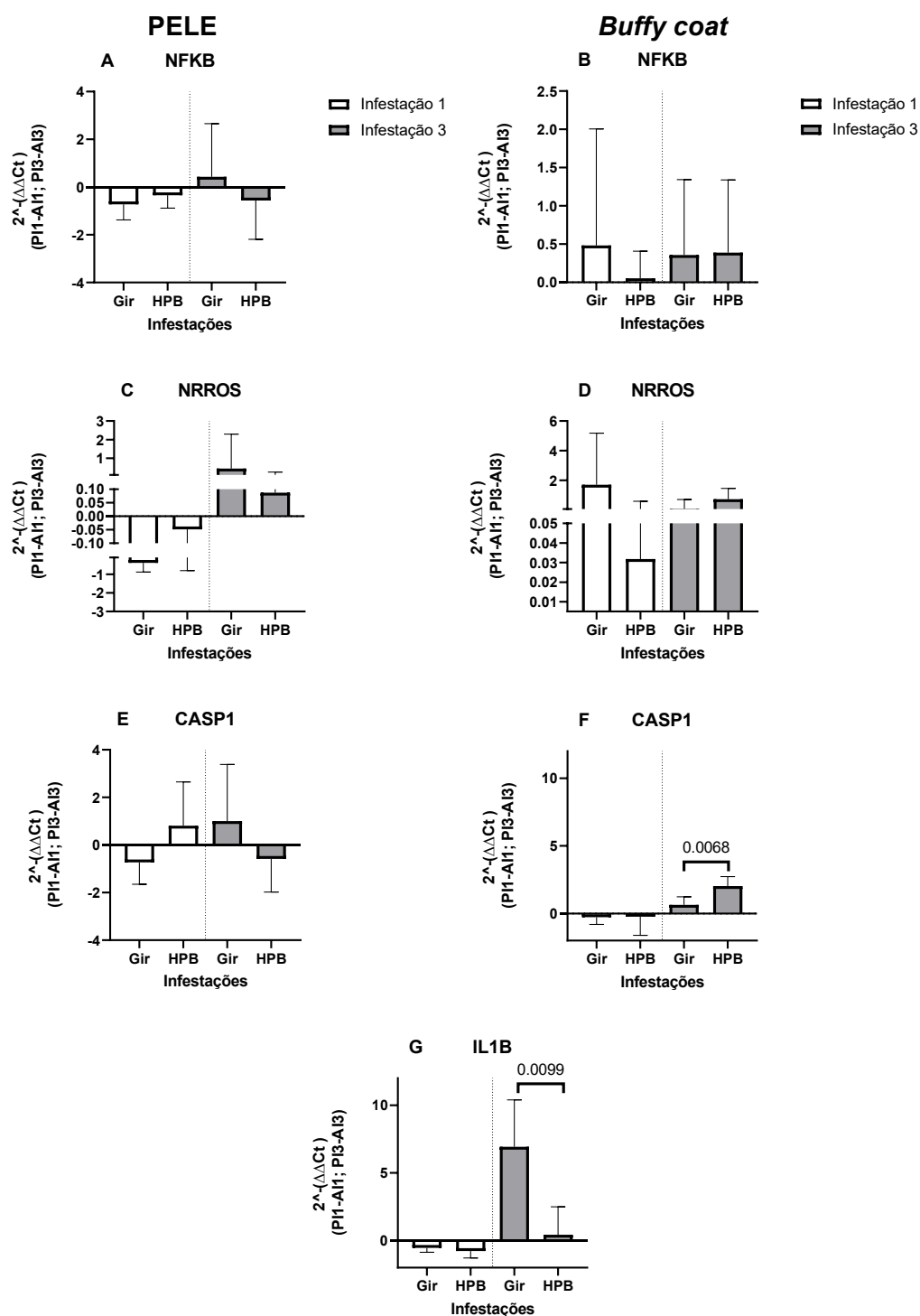


Figura 10 – Variação na expressão gênica de alvos de resposta imune na pele e na camada leucocitária de bovinos holandeses e gir antes e depois de infestações por carrapatos. (A) Níveis de expressão gênica de Factor Nuclear kappa B (NF-Kb) na pele, (B) Níveis de expressão gênica de NFκB na camada leucocitária, (C) Níveis de expressão de Negative Regulator of Reactive Oxygen Species (NRROS) na pele, (D) Expressão gênica de NRROS na camada leucocitária, (E) Expressão gênica de Caspase-1 (CASP1) na pele, (F) Níveis de expressão gênica de CASP1 na camada leucocitária e (G) Níveis de expressão de Interleucina 1-β (IL-1β) na camada leucocitária de bovinos

holandeses (n=6) e gir (n=6), analisados antes e depois da 1ª e 3ª infestações por carrapatos. Um nível de significância de 5% foi usado com testes T pareados e não pareados.

4.5 Correlação entre as contagens de teleóginas e expressões gênicas

A contagem de teleóginas, ao final de 21 dias após a primeira e terceira exposição as larvas de carrapatos *R. microplus* (Tabela 4), foi correlacionada com o *fold change* da expressão dos alvos avaliados [$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$], tanto em pele quanto células do *buffy coat* (Tabela 5).

Tabela 5 – Contagem das teleóginas em cada animal na primeira e terceira infestação controlada com larvas infestantes de *R. microplus*

Animal	I1	I3
G1	52	14
G2	24	48
G3	14	72
G4	40	43
G6	39	17
G7	99	17
G8	37	35
G9	13	10
H1	745	257
H2	143	118
H4	506	136
H6	404	47
H7	307	118
H8	189	294

H9	238	292
H10	250	86
H11	37	86

I1 – Infestação 1; I3 – Infestação 3.

Em pele, os alvos correlacionados positivamente na primeira infestação, foram *NFkB*, *NRROS*, *NLRP1* e *CASP1*. Assim, quando a contagem de parasitas diminuía, a expressão gênica desses alvos também diminuía, e quando aumentava, a expressão gênica seguia o comportamento oposto. Por outro lado, os alvos que mostraram correlação negativa foram *CARD* e *PYD-CARD*, indicando que quanto menor a contagem de parasitas, maior era a expressão gênica, e vice-versa. Na terceira infestação, *NLRP1* apresentou correlação positiva, enquanto *CASP1* apresentou correlação negativa.

Tabela 6 – Correlação entre as contagens de carrapato e expressão gênica

Gene		I1		I3	
		R	P	R	P
Pele	<i>NOD2</i>	0,3147	0,3194	-0,1646	0,6074
	<i>NFkB</i>	0,6503	0,0257*	-0,2506	0,4548
	<i>NRROS</i>	0,6900	0,0157*	0,07719	0,8110
	<i>CARD</i>	-0,7971	0,0004***	0,01757	0,9448
	<i>PYD-CARD</i>	-0,6147	0,013*	0,4669	0,0698
	<i>NLRP1</i>	0,9066	<0,0001****	0,6404	0,0118*
	<i>CASP1</i>	0,6923	0,0155*	-0,6410	0,0280*
Buffy coat	<i>NOD2</i>	0,1848	0,5243	0,1842	0,4917
	<i>NFkB</i>	-0,1885	0,5997	-0,09457	0,7704
	<i>NRROS</i>	0,1727	0,6147	0,4588	0,1350
	<i>CARD</i>	0,000	>0,9999	-0,4055	0,2159
	<i>PYD-CARD</i>	-0,3607	0,1870	-0,3914	0,1492
	<i>NLRP1</i>	0,2834	0,3456	-0,4751	0,0555

<i>CASP1</i>	-0,6442	0,0712	0,9112	0,0002***
<i>IL-1β</i>	-0,2909	0,3863	-0,4488	0,1350

I1- Infestação 1; I3 – Infestação 3; R – Coeficiente de correlação; P – Significância; (*, **, ***) p $\leq$ 0,05

Em células de *buffy coat*, a única correlação entre a contagem de carrapatos e expressão gênica, ocorreu com *CASP1* na terceira infestação, onde os animais exibiram maior contagem com maior expressão desse gene.

A correlação positiva apresentada por *NFkB* e *NRROS* indicou que, quanto maior o número de carrapatos, maior a expressão gênica desses alvos. Como *NFkB* tem papel na ativação de muitas vias pró-inflamatórias, o parasitismo por *R. microplus* atua nessas vias, aumentando a produção em animais suscetíveis. Piper *et al.* (2008), demonstra esse aumento em bovinos suscetíveis por RT-PCR em animais infestados por larvas desse carrapato, evidenciado pela suprarregulação de TLRs. Em relação a *NRROS* em pele, os animais taurinos mostraram elevação na expressão desse gene, responsável pela regulação de ROS. Daibert *et al.* (2020), observaram que, no *buffy coat*, os animais Gir demonstraram aumento desse gene, possivelmente como um processo de regulação para limitar danos teciduais devido ao aumento do processo inflamatório. No entanto, nossos resultados para *buffy coat* não mostraram correlação para esses dados. Como Moreira *et al.* (2023) avaliou a expressão de ROS nos animais desse experimento e observaram que os animais Gir apresentaram níveis mais elevados em todas as infestações (Gráfico Anexo A). Além disso, *NRROS* foi expressado de forma diferente entre as raças após a primeira infestação (Figura 7 E; P= 0.0153), corroborando que os animais *B. taurus* pode ter maior inibição de ROS por essa via.

Os alvos de *NLRP1* e *CASP1* em pele, também foram apresentaram correlação positiva na primeira infestação, indicando que os animais HPB demonstraram maior expressão gênica e maior contagem de carrapatos. Por outro lado, os alvos *CARD* e *PYD-CARD*, com correlação negativa, mostraram maior expressão gênica em animais com menor contagem de carrapatos, ou seja, em animais zebuínos. Podemos inferir que os animais suscetíveis parecem ter um perfil inflamatório um pouco diferenciado em relação a ativação de inflamassomas, mais relacionado à *NLRP1*, enquanto os animais resistentes estão mais relacionados a *PYD-CARD*. Dado que *PYD-CARD* está associado a *NLRP3*, e suas características de ativação incluem aumento de ROS e danos teciduais, isso pode corroborar essa

associação. Na terceira infestação, *NLRP1* continuou com correlação positiva, indicando o envolvimento da ativação desse inflamassoma e a quantidade de parasitas em pele. Por outro lado, *CASP1* apresentou correlação negativa, sugerindo que o perfil de expressão gênica mudou em relação a quantidade de parasitas. No *buffy coat*, *CASP1* manteve correlação positiva, o que indica o envolvimento do perfil inflamatório relacionado aos inflamassomas. No entanto, não é possível afirmar o envolvimento diferencial de caspase-1 nas linhagens, sendo necessários estudos adicionais que incluam a avaliação sorológica das proteínas em questão.

4.6 Resumo dos resultados em vias de ativação de inflamassomas: modulação e seus potenciais efeitos sobre a carga parasitária em animais taurinos e zebuínos

Apesar de estudos envolvendo a expressão de inflamassomas, em bovinos, ainda serem incipientes, já é relatada a ativação de NLRP3 em tecido epitelial mamário com consequente aumento de IL-1 β frente a estresse celular (Li *et al.*, 2019), em mastite bacteriana por *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2022), endometrite associada a LPS (lipopolissacarídeo) (Wu *et al.*, 2023) e macrófagos infectados por *Mycobacterium bovis* (Escobar-Chavarría *et al.*, 2023). Além de NLRP3, NLRC4 também foi avaliado em mastite bovina por *Escherichia coli* através de western-blot (Wu *et al.*, 2018). Evidências na ativação do inflamassoma NLRP1 são limitadas. Ventras *et al.* (2020) demonstra que a ativação desse inflamassoma é menos comum, necessitando de estímulos específicos nessa espécie.

O que foi encontrado no presente estudo possibilitou traçar duas vias de ativação desse aspecto da imunidade inata em bovinos parasitados por *R. microplus*. Animais zebuínos demonstram maior expressão gênica de precursores *NOD2* e *CARD* de inflamassomas da família NLR, com consequente maior expressão de *PYD-CARD* e *IL-1 β* , como resultado dessa ativação. Por outro lado, animais taurinos apresentaram níveis mais elevados de *NLRP1* e *CASP1*. A Figura 15 demonstra as vias de inflamassomas ativadas pelas diferentes raças bovinas:

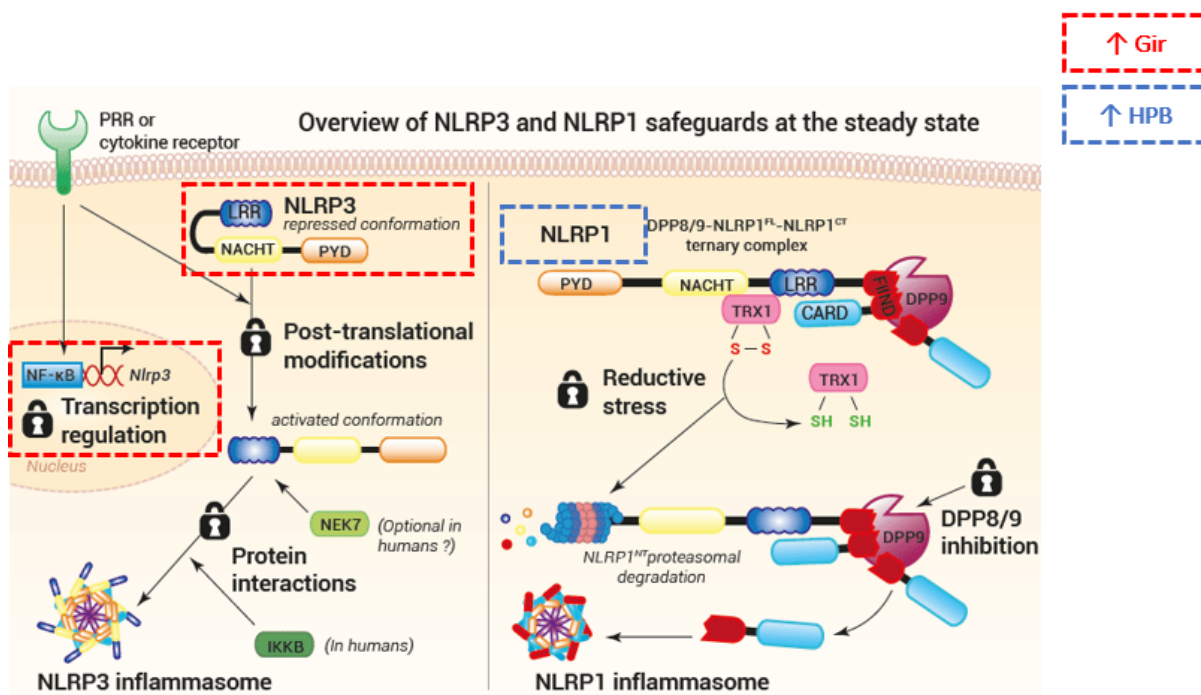


Figura 11 – Visão geral dos mecanismos de ativação dos inflamassomas em animais Gir e HPB. Quadros tracejados vermelhos representam a via de maior expressão gênica em zebuínos (Gir), enquanto o quadro tracejado azul representa o de maior expressão em taurinos (HPB) (Fonte: Adaptado de Tschopp e Schroder, 2010).

Em relação a pele, a ativação de inflamassomas da família NLR pode ser correlacionada ao fato de haver lesão epidérmica. Ao inocular o hipostômio para realização da hematofagia, o carrapato causa, além de rompimento de capilares e injúria tecidual, inoculação de moléculas salivares contendo fatores imunomoduladores que podem destruir a matriz extracelular, levando a ativação de DAMPs e, conseqüentemente, à ativação do inflamassoma, por meio de sinalização de TLRs e aumento de NFκB e conseqüente liberação de IL-1.

As moléculas liberadas por *R. microplus* durante o repasto sanguíneo estimulam tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, e a habilidade de resposta do hospedeiro é crucial para a diferença na resistência ao parasita. Além disso, a saliva contém substâncias que atuam contra as defesas naturais e leucócitos do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2011). Proteínas inibitórias salivares de *R. microplus*, citadas por Chen *et al.* (2014), Wang *et al.* (2015), Wang (2016) e Jmel *et al.* (2021), descrevem a sialostatina L2 como responsável por inibir a formação de inflamassomas, apesar de descreverem essa ação em *Anaplasma phagocytophilum*, isso pode estar relacionada à injúria tecidual causada pela fixação do parasito e ativação de DAMPs.

Nascimento *et al.* (2009), relataram que, em biópsias de pele de animais mestiços (1/2 holandês: 1/2 Gir), resistentes e suscetíveis, houve aumento de S100A7, gene envolvido em canais cálcio-dependentes, em pele lesionada, aumento de proteína ligante de cálcio (TPT1) devido a presença de moléculas anti-histamínicas da saliva do carrapato, além de elevação dos níveis de EcaC2 – canal de cálcio epitelial 2 (TRPV6), colaborando com o perfil inflamatório de pele parasitada, induzindo migração leucocitária. Houve aumento de cistatina (CST6) em animais suscetíveis, gene que é responsável por afetar a atividade proteolítica no local de inflamação, o que demonstra um perfil anti-inflamatório frente a sialostatina-L, presente na saliva do carrapato, fazendo com que o hospedeiro iniba a ação de linfócitos T citotóxicos, aumentando a permanência do hospedeiro e sucesso alimentar, por isso, mantendo maior carga parasitária e hipersensibilidade em animais suscetíveis. Bagnall *et al.* (2009), também relata que, um aumento significativo de genes dependentes de cálcio, podem estar associados a resposta imune do hospedeiro.

Essas evidências demonstram que, embora ocorra um aumento significativo em genes pró-inflamatórios de animais suscetíveis, a resposta imunológica de animais zebuínos tende a ser mais agressiva e a iniciar mais rapidamente (Franzin *et al.*, 2017), fazendo com que o animal tente eliminar a infestação de forma mais agressiva, aliada a outros fatores como espessura de pele, papilas da língua e odores menos atrativos que animais europeus.

Além disso, os dados de *IL-1 β* , demonstram que animais zebuínos apresentaram suprarregulação desse gene, enquanto os animais taurinos não mostraram diferenças significativas em suas expressões. *Bos indicus* demonstrou expressar um perfil inflamatório mais agressivo; portanto, o inflamassoma NLRP3 pode ser um dos mecanismos celulares utilizados para controlar a infestação por carrapatos. Por outro lado, animais taurinos parecem expressar um perfil inflamatório menos intenso, envolvendo a via de inflamassoma de NLRP1.

5. CONCLUSÃO

As vias de inflamassomas desempenham um papel crucial na atividade inflamatória em resposta à infestação por *R. microplus* em bovinos, com diferenças

observadas entre raças resistentes e suscetíveis. *NOD2* e *PYD-CARD* foram mais expressos em animais resistentes (Gir), sugerindo um papel central na resposta inflamatória robusta observada nesses bovinos. Por outro lado, o inflamassoma NLRP1 foi associado ao perfil inflamatório menos intenso observado em animais taurinos (HPB), onde citocinas e interleucinas parecem ser suprimidas. Os mecanismos subjacentes à ativação diferencial das vias de inflamassomas em bovinos com diferentes perfis de infestação requerem investigações mais detalhadas para elucidar sua contribuição à resposta imune. O avanço no conhecimento desses mecanismos pode fomentar o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas de imunomodulação visando combater efetivamente carrapato bovino.

REFERÊNCIAS

- ABAIS, J. M.; XIA, M.; ZHANG, Y.; BOINI, K. M.; LI, P. L. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 13, p. 1111-29, 2015. DOI: 10.1089/ars.2014.5994.
- ANAND, P. K.; MALIREDDI, R. K. S.; LUKENS, J. R.; VOGEL, P.; BERTIN, J.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 389-393, 2012. DOI:10.1038/nature11250.
- ANDRADE, Rafaella Resende. **Ambiência e bem-estar animal na produção intensiva de leite em sistemas Compost Barn fechados para a tipologia construtiva e clima do Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, p.159, 2021.
- ANDREI, C.; MARGIOCCO, P.; POGGI, A.; LOTTI, L. V.; TORRISI, M. R.; RUBARTELLI, A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9745-50, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0308558101.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- AOKI, V.; SOUSA JX Jr; FUKUMORI, L. M.; PÉRIGO, A. M.; FREITAS, E. L.; OLIVEIRA, Z. N. Direct and indirect immunofluorescence. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010. DOI: 10.1590/s0365-05962010000400010.
- AOUNALLAH, H.; BENSAOUD, C.; M'GHIRBI, Y.; FARIA, F.; CHMELAŘ, J.; KOTSYFAKIS, M. Tick Salivary Compounds for Targeted Immunomodulatory Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. DOI:10.3389/fimmu.2020.583845.
- BAGNALL, N.; GOUGH, J.; CADOGAN, L.; BURNS, B.; KONGSUWAN, K. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 177-87, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01092.x.
- BAI, B.; YANG, Y.; WANG, Q.; LI, M.; TIAN, C.; LIU, Y.; AUNG, L. H. H.; LI, P. F.; YU, T.; CHU, X. M. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. **Cell Death Disease**, v. 11, n. 9, p. 776, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-02985-x.
- BAIG, M. S.; ZAICHICK, S. V.; MAO, M.; DE ABREU, A. L.; BAKHSHI, F. R.; HART, P. C.; SAQIB, U.; DENG, J.; CHATTERJEE, S.; BLOCK, M. L.; VOGEL, S. M.; MALIK, A. B.; CONSOLARO, M. E.; CHRISTMAN, J. W.; MINSHALL, R. D.; GANTNER, B. N.; BONINI, M. G. NOS1-derived nitric oxide promotes NF- κ B transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 10, p. 1725-38, 2015. DOI: 10.1084/jem.20140654.
- BAUERNFEIND, F. G.; HORVATH, G.; STUTZ, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B. G.; FITZGERALD, K. A.; HORNUNG, V.; LATZ, E. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3

expression. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 787-91, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0901363.

BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta: A Friend or Foe in Malignancies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2155, 2018. DOI: 10.3390/ijms19082155.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; ROSA, R. L.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SANTI, L. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 208, p. 107812, 2020. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.107812.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. L. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Arquivos de Zootecnia**, v. 61, p. 1-11, 2012.

BOWMAN, A. S.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 388-396, 1996. DOI: 10.1016/0169-4758(96)10061-2.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Rebanho bovino brasileiro alcançou recorde de 234 milhões de animais em 2022**: Todos os efetivos animais apresentaram crescimento à exceção de codornas. Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária, 25 set. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/rebanho-bovino-brasileiro-alcancou-recorde-de-234-4-milhoes-de-animais-em-2022>>. Acesso em: 13 jul. 2024.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301-15, 2015. DOI: 10.14202/vetworld.2015.301-315.

BURROW, H. M.; MANS, B. J.; CARDOSO, F. F.; BIRKETT, M. A.; KOTZE, AC.; HAYES, BJ.; DJIKENG, A. Towards a new phenotype for tick resistance in beef and dairy cattle: a review. **Animal Production Science**, 2019. DOI:10.1071/an18487.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002. DOI: 10.1677/jme.0.0290023.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 365-79, 2005. DOI: 10.1042/CS20050086.

CARVALHO, W. A.; BECHARA, G. H.; MORÉ, D. D.; FERREIRA, B. R.; DA SILVA, J. S.; SANTOS, I. K. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 587-91, 2008. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.10.006.

CARVALHO, W. A.; DOMINGUES, R.; DE AZEVEDO PRATA, M. C.; DA SILVA, MV.; DE OLIVEIRA, G. C.; GUIMARÃES, S. E.; MACHADO, M. A. Microarray analysis of

tick-infested skin in resistant and susceptible cattle confirms the role of inflammatory pathways in immune activation and larval rejection. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 307-17, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.07.018.

CARVALHO, W. A.; FRANZIN, A. M.; ABATEPAULO, A. R.; DE OLIVEIRA, C. J.; MORÉ, D. D.; DA SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 260-73, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.09.028.

CARVALHO, W. A.; IANELLA, P.; ARNOLDI, F. G.; CAETANO, A. R.; MARUYAMA, S. R.; FERREIRA, B. R.; CONTI, L. H.; DA SILVA, M. R.; PAULA, J. O.; MAIA, A. A.; SANTOS, I. K. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. **Immunogenetics**, v. 63, n. 5, p.319-324, 2011. DOI: 10.1007/s00251-011-0515-y

CHAE, J. J.; WOOD, G.; MASTERS, S. L.; RICHARD, K.; PARK, G.; SMITH, B.J.; KASTNER, D.L. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9982-7, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0602081103.

CHAVARRÍA-SMITH, J.; VANCE, R.E. The NLRP1 inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 22-34, 2015. DOI: 10.1111/imr.12283.

CHEN, G.; WANG, X.; SEVERO, M.S.; SAKHON, O.S.; SOHAIL, M.; BROWN, L.J.; SIRCAR, M.; SNYDER, G.A.; SUNDBERG, E.J.; ULLAND, T.K.; OLIVIER, A.K.; ANDERSEN, J.F.; ZHOU, Y.; SHI, G.P.; SUTTERWALA, F.S.; KOTSYFAKIS, M.; PEDRA, J.H. The tick salivary protein sialostatin L2 inhibits caspase-1-mediated inflammation during *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2553-64, 2014. DOI: 10.1128/IAI.01679-14.

CIECHANOVER, A. The unravelling of the ubiquitin system. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 322-324, 2015. DOI: 10.1038/nrm3982.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEW-TABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus* indicus and *Bos taurus* taurus cattle. **International Journal of Parasitology**, v. 40, n. 7, p. 865-875, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.01.004.

DAI, J.; NARASIMHAN, S.; ZHANG, L.; LIU, L.; WANG, P.; FIKRIG, E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, p. e1001205, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001205.

DAIBERT, R. M. P.; DE BIAGI JUNIOR, C. A. O.; VIEIRA, F. O.; DA SILVA, M. V. G. B.; HOTTZ, E. D.; MENDONÇA PINHEIRO, M. B.; FAZA, D. R. L. R.; PEREIRA, H. P.; MARTINS, M. F.; BRANDÃO, H. M.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, W. A. Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of

immune response to infections. **PLoS One**, v. 15, n. 11, p. e0241861, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0241861.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983.

DE ALBA, E. (2019). Structure, interactions and self-assembly of ASC-dependent inflammasomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 630, p. 15-31, 2019. DOI: 10.1016/j.abb.2019.05.023

DE BIASE, D.; PIEGARI, G.; PRISCO, F.; CIMMINO, I.; D'AQUINO, I.; BALDASSARRE, V.; ORIENTE, F.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O. Implication of the NLRP3 Inflammasome in Bovine Age-Related Sarcopenia. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 7, 2021. DOI: 10.3390/ijms22073609.

DE BIASE D.; PIEGARI G.; PRISCO F.; CIMMINO I.; D'AQUINO I.; BALDASSARRE V.; ORIENTE F.; PAPPARELLA S.; PACIELLO O. Implication of the NLRP3 Inflammasome in Bovine Age-Related Sarcopenia. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 7, 2021. DOI: 10.3390/ijms22073609.

DE CASTRO, J. J.; CUNNINGHAM, M. P.; DOLAN, T. T.; DRANSFIELD, R. D.; NEWSON, R. M.; YOUNG, A. S. Effects on cattle of artificial infestations with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Parasitology**, 1985.

DE MENEGHI, D.; STACHURSKI, F.; ADAKAL, H. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 239, 2016. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00239.

DE TORRE-MINGUELA, C.; MESA DEL CASTILLO, P.; PELEGRÍN, P. The NLRP3 and Pyrin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 43, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00043.

DÉRUAZ, M.; FRAUENSCHUH, A.; ALESSANDRI, A. L.; DIAS, J. M.; COELHO, F. M.; RUSSO, R. C.; FERREIRA, B. R.; GRAHAM, G. J.; SHAW, J. P.; WELLS, T. N.; TEIXEIRA, M. M.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 9, p. 2019-2031, 2008. DOI: 10.1084/jem.20072689.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

DINARELLO, C. A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 2, p. S370-384, 2003. DOI: 10.1086/374751.

DING, J.; WANG, K.; LIU, W.; SHE, Y.; SUN, Q.; SHI, J.; SUN, H.; WANG, D. C.; SHAO, F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 111-116, Jul. 2016. DOI: 10.1038/nature18590.

ESCOBAR-CHAVARRÍA, O.; BENITEZ-GUZMAN, A.; JIMÉNEZ-VÁZQUEZ, I.; CARRISOZA-URBINA, J.; ARRIAGA-PIZANO, L.; HUERTA-YÉPEZ, S.; BAAY-GUZMÁN, G.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J. A. Necrotic Cell Death and Inflammasome NLRP3 Activity in *Mycobacterium bovis*-Infected Bovine Macrophages. **Cells**, v. 12, n. 16, p. 2079, 2023. DOI: 10.3390/cells12162079.

FANG, R.; DU, H.; LEI, G.; LIU, Y.; FENG, S.; YE, C.; LI, N.; PENG, Y. NLRP3 inflammasome plays an important role in caspase-1 activation and IL-1 β secretion in macrophages infected with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 207-213, 2019. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.03.019.

FANG, R.; LEI, G.; JIANG, J.; DU, H.; LIU, Y.; LEI, Z.; YE, C.; LI, N.; PENG, Y. High- and low-virulent bovine *Pasteurella multocida* induced differential NLRP3 inflammasome activation and subsequent IL-1 β secretion. **Veterinary Microbiology**, v. 243, p. 108646, 2020. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108646.

FERREIRA, B. R.; SZABÓ, M. J.; CAVASSANI, K. A.; BECHARA, G. H.; SILVA, J. S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35-48, 2003. DOI: 10.1016/s0304-4017(03)00190-0.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-39, 2006. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; NÚÑEZ, G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 792-6, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0900173.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, n. 1, p. 1-16, 2006. DOI: 10.1016/j.cca.2005.12.027.

FRANZIN, A. M.; MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; RIBEIRO, J. M.; BISHOP, R.; MAIA, A. A.; MORE, D. D.; FERREIRA, B. R.; SANTOS, I. K. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 51, 2017. DOI: 10.1186/s13071-016-1945-z.

GARCIA, G. R.; MARUYAMA, S. R.; NELSON, K. T.; RIBEIRO, J. M.; GARDINASSI, L. G.; MAIA, A. A.; FERREIRA, B. R.; KOOYMAN, F. N.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 144, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2077-9.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-18, 2013. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.

GIGLIO, S.; MONIS, PT.; SAINT, CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. **Biotechniques**, v.33, n, 22, 2003. DOI: 10.1093/nar/gng135.

GILL, H. S. Kinetics of mast cell, basophil, and eosinophil populations at Hyalomma anatolicum anatolicum feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. **Parasitology**, v. 93, n. Pt 2, p. 305-315, 1986. DOI: 10.1017/s0031182000051477.

GOMES, R. C. **Obtenção e caracterização de microcápsulas à base de cardanol para liberação de óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Maranhão. São Luís – MA, p. 74, 2022.

GONG, H.; QIN, S.; WAN, X.; ZHANG, H.; ZHOU, Y.; CAO, J.; XUAN, X.; SUZUKI, H.; ZHOU, J. Immunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression and binding specificity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4387-4395, 2014. DOI: 10.1007/s00436-014-4115-2.

GONZALEZ, K.; CALZADA, J. E.; CORBETT, C. E. P.; SALDAÑA, A.; LAURENTI, M. D. Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 9278931, 2020. DOI: 10.1155/2020/9278931.

GUO, H.; TING, J. P. Inflammasome Assays In Vitro and in Mouse Models. **Current Protocols in Immunology**, v. 131, n. 1, p. e107, 2020. DOI: 10.1002/cpim.107.

HALFORD, W. P.; FALCO, V. C.; GEBHARDT, B. M.; CARR, D. J. The inherent quantitative capacity of the reverse transcription-polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 181-191, 1999. DOI: 10.1006/abio.1998.2913.

HARRIS, J.; HARTMAN, M.; ROCHE, C.; ZENG, S. G.; O'SHEA, A.; SHARP, F. A.; LAMBE, E. M.; CREAGH, E. M.; GOLENBOCK, D. T.; TSCHOPP, J.; KORNFIELD, H.; FITZGERALD, K. A.; LAVELLE, E. C. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9587-9597, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.202911.

HE, W. T.; WAN, H.; HU, L.; CHEN, P.; WANG, X.; HUANG, Z.; YANG, Z. H.; ZHONG, C. Q.; HAN, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research**, v. 25, n. 12, p. 1285-1298, 2015. DOI: 10.1038/cr.2015.139.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 326-333, 2015.

HONER, M. R.; GOMES, A. **O manejo integrado de mosca dos chifres, berne e carrapato em gado de corte.** Campo Grande – MS, EMBRAPA-CNPGC, 1990. 60 p. (EMBRAPA – CNPGC. Circular Técnica, 22).

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M.; GIBBS, H. A.; REID, S. W.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437-441, 1999. DOI: 10.1136/vr.144.16.437.

ISHII, K.; WASHIO, T.; UECHI, T.; YOSHIHAMA, M.; KENMOCHI, N.; TOMITA, M. Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes. **BMC Genomics**, v. 7, p. 37, 2006. DOI: 10.1186/1471-2164-7-37.

JAIN, Parag; SATAPATHY, Trilochan; PANDEY, Ravindra Kumar. *Rhipicephalus microplus*: A parasite threatening cattle health and consequences of herbal acaricides for upliftment of livelihood of cattle rearing communities in Chhattisgarh. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101611, 2020.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 628-631, 2010. DOI: 10.1007/s10875-010-9440-3.

JMEL M. A.; AOUNALLAH H.; BENSOUUD C.; MEKKI I.; CHMELAR J.; FARIA F.; M'GHIRBI Y.; KOTSYFAKIS M. Insights into the Role of Tick Salivary Protease Inhibitors during Ectoparasite-Host Crosstalk. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n.2, p. 892, 2021. DOI: 10.3390/ijms22020892. PMID: 33477394; PMCID: PMC7831016.

JOHNSON, S. C.; SHERRILL, C. B.; MARSHALL, D. J.; MOSER, M. J.; PRUDENT, J. R. A third base pair for the polymerase chain reaction: inserting isoC and isoG. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 6, p. 1937-1941, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh522.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; FABRIGOULE, M.; BOULAY, V.; BENOLIEL, A. M.; BONGRAND, P.; KAPLANSKI, S.; FARNARIER, C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). **Blood**, v. 92, n. 4, p. 1259-1267, 1998.

KELLEHER, Z. T.; POTTS, E. N.; BRAHMAJOTHI, M. V.; FOSTER, M. W.; AUTEN, R. L.; FOSTER, W. M.; MARSHALL, H. E. NOS2 regulation of LPS-induced airway inflammation via S-nitrosylation of NF- κ B p65. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 301, n. 3, p. L327-L333, 2011. DOI: 10.1152/ajplung.00463.2010.

KELLEY, N.; JELTEMA, D.; DUAN, Y.; HE, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3328, 2019. DOI: 10.3390/ijms20133328.

KITSON, C.; FIKRIG, E.; PAL, U. Tick host immunity: vector immunomodulation and acquired tick resistance. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 7, p. 554-574, 2021. DOI: 10.1016/j.it.2021.05.005.

KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 283-294, 2003. DOI: 10.1016/s0378-1135(03)00119-6.

KOTÁL, J.; LANGHANSOVÁ, H.; LIESKOVSKÁ, J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCIS-CHETTI, I. M.; CHAVAKIS, T.; KOPECKÝ, J.; PEDRA, J. H.; KOTSYFAKIS, M.; CHMELÁŘ, J. Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58-68, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.07.005.

KRAUSE, P. J.; GRANT-KELS, J. M.; TAHAN, S. R.; DARDICK, K. R.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; BOUCHARD, K.; VISINI, C.; DERISO, C.; FOPPA, I. M.; WIKEL, S. Dermatologic changes induced by repeated *Ixodes scapularis* bites and implications for prevention of tick-borne infection. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 6, p. 603-610, 2009. DOI: 10.1089/vbz.2008.0091.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON M.; FAROOTAN A.; JONÁK J.; LIND K.; SINDELKA R.; SJÖACK R.; SJÖGREEN B.; STRÖMBOM L.; STÅHLBERG A. ZORIC N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LI, C.; WANG, X.; KUANG, M.; LI, L.; WANG, Y.; YANG, F.; WANG, G. UFL1 modulates NLRP3 inflammasome activation and protects against pyroptosis in LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. **Molecular Immunology**, v. 112, p. 1-9, 2019. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.04.023.

LI L.; WANG X. C.; GONG P. T.; ZHANG N.; ZHANG X.; LI S.; LI X.; LIU S. X.; ZHANG X. X.; LI W.; LI J. H.; ZHANG X. C. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation participates in the response against *Neospora caninum* infection. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 449, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04331-8.

LIN, J.; REDIES, C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. **Development Genes and Evolution**, v. 222, n. 6, p. 369-376, 2012. DOI: 10.1007/s00427-012-0420-x.

LIU, H. D.; LI, W.; CHEN, Z. R.; HU, Y. C.; ZHANG, D. D.; SHEN, W.; ZHOU, M. L.; ZHU, L.; HANG, C. H. Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 10, p. 2072-2083, 2013. DOI: 10.1007/s11064-013-1115-z.

LIU, X.; ZHANG, Z.; RUAN, J.; PAN, Y.; MAGUPALLI, V. G.; WU, H.; LIEBERMAN, J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153-158, 2016. DOI: 10.1038/nature18629.

LIU, K.; ZHOU, X.; FANG, L.; DONG, J.; CUI, L.; LI, J.; MENG, X.; ZHU, G.; LI, J.; WANG, H. PINK1/parkin-mediated mitophagy alleviates *Staphylococcus aureus*-induced NLRP3 inflammasome and NF- κ B pathway activation in bovine mammary epithelial cells. **International Immunopharmacology**, v. 112, p. 109200, 2022. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109200.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LOFTUS, R. T.; ERTUGRUL, O.; HARBA, A. H.; EL-BARODY, M. A.; MACHUGH, D. E.; PARK, S. D.; BRADLEY, D. G. A microsatellite survey of cattle from a centre of

origin: the Near East. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 12, p. 2015-2022, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1999.00805.x.

LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 7, p. 2757-2761, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2757.

LU, A.; MAGUPALLI, V. G.; RUAN, J.; YIN, Q.; ATIANAND, M. K.; VOS, M. R.; SCHRÖDER, G. F.; FITZGERALD, K. A.; WU, H.; EGELMAN, E. H. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1193-1206, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.008.

LUKENS, J. R.; GURUNG, P.; SHAW, P. J.; BARR, M. J.; ZAKI, M. H.; BROWN, S. A.; VOGEL, P.; CHI, H.; KANNEGANTI, T. D. The NLRP12 Sensor Negatively Regulates Autoinflammatory Disease by Modulating Interleukin-4 Production in T Cells. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 654-664, 2015. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.03.006.

MACEDO-RIBEIRO, S.; ALMEIDA, C.; CALISTO, B. M.; FRIEDRICH, T.; MENTELE, R.; STÜRZEBECKER, J.; FUENTES-PRIOR, P.; PEREIRA, P. J. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1624, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0001624.

MALIK, A. M.; MIGUEZ, R. A.; LI, X.; HO, Y. S.; FELDMAN, E. L.; BARMADA, S. J. Matrin 3-dependent neurotoxicity is modified by nucleic acid binding and nucleocytoplasmic localization. **eLife**, v. 7, p. e35977, 2018. DOI: 10.7554/eLife.35977.

MAN, S. M.; KANNEGANTI, T. D. Regulation of inflammasome activation. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 6-21, 2015. DOI: 10.1111/imr.12296.

MANJI, G. A.; WANG, L.; GEDDES, B. J.; BROWN, M.; MERRIAM, S.; AL-GARAWI, A.; MAK, S.; LORA, J. M.; BRISKIN, M.; JURMAN, M.; CAO, J.; DISTEFANO, P. S.; BERTIN, J. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 11570-11575, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M112208200.

MANS, B. J.; LOUW, A. I.; NEITZ, A. W. Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21371-21378, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M112060200.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3.

MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Non-parasitic life cycle of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Panicum maximum* pastures in northern Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 138-145, 2017. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.03.009.

MASUMOTO, J.; TANIGUCHI, S.; AYUKAWA, K.; SARVOTHAM, H.; KISHINO, T.; NIIKAWA, N.; HIDAKA, E.; KATSUYAMA, T.; HIGUCHI, T.; SAGARA, J. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 33835-33838, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.48.33835.

MAX, N.; WOLF, K.; THIEL, E.; KEILHOLZ, U. Quantitative nested real-time RT-PCR specific for tyrosinase transcripts to quantitate minimal residual disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 317, n. 1-2, p. 39-46, 2002. DOI: 10.1016/s0009-8981(01)00737-9.

MCGUIRE, K.; MANUJA, A.; RUSSELL, G. C.; SPRINGBETT, A.; CRAIGMILE, S. C.; NICHANI, A. K.; MALHOTRA, D. V.; GLASS, E. J. Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata*-infected cell lines derived from resistant and susceptible cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 99, n. 1-2, p. 87-98, 2004. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.01.003.

MERIGHI, S.; NIGRO, M.; TRAVAGLI, A.; GESSI, S. Microglia and Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12990, 2022. DOI: 10.3390/ijms232112990.

MIAO, EA.; LEAF, IA.; TREUTING, PM.; MAO, DP.; DORS, M.; SARKAR, A.; WARREN, SE.; WEWERS, MD.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature Immunology**, v. 11, n. 12, p. 1136-42, 2010. DOI: 10.1038/ni.1960.

MISHRA, BB.; RATHINAM, VA.; MARTENS, GW.; MARTINOT, AJ.; KORNFELD, H.; FITZGERALD, KA.; SASSETTI, CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . **Nature Immunology**, v. 14, n. 1, p. 52-60, 2012. DOI: 10.1038/ni.2474.

MOREIRA, L. S.; SOUZA, P. E. A.; HONÓRIO, N. T. B. S.; CARVALHO, C. V.; DOMINGUES R.; GASPAR E. B.; MARTINS, M. F.; FRANCO, A. L.; FAZA, D. L. R.; BRANDÃO, H. M.; MACHADO, M. A.; CAMPOS, M. M.; SOARES, G. O.; CARVALHO, W. A.; PRATA, M. C. A. Produção de reativos de oxigênio em resposta à infestação pelo carrapato *R. microplus* em animais taurinos e zebuínos: um mecanismo imune importante para controle do parasita. In: **Workshop de Iniciação Científica da EMBRAPA Gado de Leite**, 28., 2023, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2024. p. 65-69. (Embrapa Gado de Leite. Eventos Técnicos & Científicos, 1). PIBIC/Fapemig.

MORRISON, TB.; WEIS, JJ.; WITTEWER, CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, n. 6, p. 954-8, 960, 962, 1998.

NASCIMENTO, CS.; MACHADO, MA.; GUIMARÃES, SE.; GUIMARÃES, MF.; PEIXOTO, JO.; FURLONG, J.; PRATA, MC.; VERNEQUE, RS.; TEODORO, RL.; LOPES, PS. Expressed sequenced tags profiling of resistant and susceptible Gyr x Holstein cattle infested with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 1974-9, 2009. DOI: 10.4238/vol9-4gmr905.

NOUBADE, R.; WONG, K.; OTA, N.; RUTZ, S.; EIDENSCHENK, C.; VALDEZ, PA.; DING, J.; PENG, I.; SEBRELL, A.; CAPLAZI, P.; DEVOSS, J.; SORIANO, RH.; SAI, T.; LU, R.; MODRUSAN, Z.; HACKNEY, J.; OUYANG, W. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. **Nature**, v. 509, n. 7499, p. 235-9, 2014. DOI: 10.1038/nature13152.

OSTERKAMP, J.; WAHL, U.; SCHMALFUSS, G.; HAAS, W. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 185, n. 1, p. 59-67, 1999. DOI: 10.1007/s003590050366.

PAIVA, R. M. **Avaliação, in vitro, da resposta inflamatória e metabolismo lipídico de macrófagos em animais taurinos e zebuínos estimulados com saliva do carapato *Rhipicephalus microplus***. Tese de doutorado, Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora – MG, p. 164, 2019.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L.; SILVA A. C.; SILVA, R. M.; SEVENINI L. A.; MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO J.; QUIRICO-SANTOS T. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 1, p. 96-102, 2010.

PASCOETI, R.; SOLDÁ, N. M. SCZESNY T. R.; MACHADO, G.; REGINATO C. Z.; CAMILLO G.; VOGEL, F. F.; SIMIONI F. J.; LOPES L. S.; FÁVERO J. F.; SILVA A. S. Parasites in dairy cattle farms in southern Brazil. **Revista MVZ Córdoba**, v. 21, n. 2, p. 5304-5315, 2016.

PELEGRÍN, Pablo. Inflammasome activation by danger signals. **The Inflammasomes**. Basel: Springer Basel, 2011. p. 101-121.

PEREIRA, DFS.; RIBEIRO, HS.; GONÇALVES, AAM.; DA SILVA, AV.; LAIR, DF.; DE OLIVEIRA, DS.; BOAS, DFV.; CONRADO, IDSS.; LEITE, JC.; BARATA, LM.; REIS, PCC.; MARIANO, RMDS.; SANTOS, TAP.; COUTINHO, DCO.; GONTIJO, NF.; ARAUJO, RN.; GALDINO, AS.; PAES, PRO.; MELO, MM.; NAGEM, RAP.; DUTRA, WO.; SILVEIRA-LEMO, DD.; RODRIGUES, DS.; GIUNCHETTI, RC. *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 1, p. 101828, 2022. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2021.101828.

PFAFFL, MW.; HORGAN, GW.; DEMPFL, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.9.e36.

PIPER E. K.; JACKSON L. A.; BIELEFELDT-OHMANN H.; GONDRO C.; LEW-TABOR A. E.; JONSSON N. N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431-441, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.09.009. PMID: 19852965.

PIPER, E. K.; JACKSON, LA.; BAGNALL, NH.; KONGSUWAN, KK.; LEW, AE.; JONSSON, NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested

with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2010.

PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M. E.; JACKSON, L. A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1074-1085, 2009. DOI: 10.1128/CVI.00157-09.

PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; VANCE, M. E.; LEW-TABOR, A.; JACKSON, L. A. Peripheral cellular and humoral responses to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in Santa Gertrudis cattle. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 1, 2017. DOI: 10.1111/pim.12402.

PY, B. F.; KIM, M. S.; VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; YUAN, J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 331-338, 2013. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.009.

RAGNI, E.; VIGANÒ, M.; REBULLA, P.; GIORDANO, R.; LAZZARI, L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 168-180, 2013. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01660.x.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; DOS SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-136, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.01.012.

RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; ROBINSON, D. R. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. **Journal of Parasitology**, v. 74, n. 6, p. 1068-1069, 1988.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 3, p. 532-550, 1962.

ROBINSON, TL.; SUTHERLAND, IA.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 160-5, 2007. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.09.012.

RODRIGUEZ-VALLE, M.; LEW-TABOR, A.; GONDRO, C.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.; GUERRERO, FD.; BELLGARD, M.; JORGENSEN, W. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **BMC Genomics**, v. 11, p. 437, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-437.

RODRIGUEZ-VIVAS, RI.; JONSSON, NN.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 3-29, 2018. DOI: 10.1007/s00436-017-5677-6.

SAHOO, M.; CEBALLOS-OLVERA, I.; DEL BARRIO, L.; RE, F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. **Scientific World Journal**, 2011. DOI: 10.1100/2011/212680.

SAINI, SS.; FARRUGIA, W.; MUTHUSAMY, N.; RAMSLAND, PA.; KAUSHIK, AK. Structural evidence for a new IgG1 antibody sequence allele of cattle. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, n. 1, p. 32-8, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01865.x.

SANTOS JÚNIOR, J.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Control of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in dairy farm systems of the physiographic microrregion of grande Rio. Rio de Janeiro, Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 305-311, 2000.

SCHLEGER, AV.; LINCOLN, DT.; MCKENNA, RV.; KEMP, DH.; ROBERTS, JA. *Boophilus microplus*: cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5-6, p. 499-512, 1976. DOI: 10.1071/bi9760499.

SESTER, D. P.; THYGESEN, S. J.; SAGULENKO, V.; VAJJHALA, P. R.; CRIDLAND, J. A.; VITAK, N.; CHEN, K. W.; OSBORNE, G. W.; SCHRODER, K.; STACEY, K. J. A novel flow cytometric method to assess inflammasome formation. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 455-462, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1401110.

SHI, C. S.; SHENDEROV, K.; HUANG, N. N.; KABAT, J.; ABU-ASAB, M.; FITZGERALD, K. A.; SHER, A.; KEHRL, J. H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 255-263, 2012. DOI: 10.1038/ni.2215.

SINGH, A. K.; UPADHYAY, R. C.; CHANDRA, G.; KUMAR, S.; MALAKAR, D.; SINGH, S. V.; SINGH, M. K. Genome-wide expression analysis of the heat stress response in dermal fibroblasts of Tharparkar (zebu) and Karan-Fries (zebu $\times$ taurine) cattle. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 2, p. 327-344, 2020. DOI: 10.1007/s12192-020-01076-2.

SIQUEIRA, F.; BLECHA, I. M.; CARDOSO, F. F. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos: Capítulo 17 – Variabilidade genética da resistência bovina ao carrapato**. EMBRAPA, Campo Grande – MS, 2019.

SONEL, B.; TUTKAK, H.; DÜZGÜN, N. Serum levels of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies. **Joint Bone Spine**, v. 69, n. 5, p. 463-7, 2002. DOI: 10.1016/s1297-319x(02)00431-1.

SOUSA, G. A. **Eficácia de antiparasitários sobre *Amblyomma sculptum* in vitro e no semicampo: Estudo comparativo a *Rhipicephalus microplus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal -SP, p. 81, 2022.

SPICKETT, AM.; DE KLERK, D.; ENSLIN, CB.; SCHOLTZ, MM. Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a Bushveld region of South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 245-50, 1989.

STUTZER, C.; MANS, B.J.; GASPAR, A.R.; NEITZ, A.W.; MARITZ-OLIVIER, C. *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 318-27, 2009. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.04.007.

SZABÓ, M.P.; BECHARA, G.H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental & Applied Acarology**, v. 23, n. 11, p. 915-28, 1999. DOI: 10.1023/a:1006347200373.

TABOR, A.E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A.F.; MALLARDO, T.; JONSSON, N.N. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 506, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00506.

TOORANI, T.; MACKIE, P. M.; MASTROMONACO, G. F. Validation of reference genes for use in untreated bovine fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 10253, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-89657-8.

TRINDADE B. C.; CHEN G. Y. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases. **Immunological Reviews**, v. 297, n. 1, p. 139-161, 2020. DOI: 10.1111/imr.12902.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 210–215, 2010. DOI:10.1038/nri2725

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 4, p. 885, 1978. DOI: 10.1071/ar9780885.

VAJJHALA, P. R.; MIRAMS, R. E.; HILL, J. M. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41732-41743, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.381228.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005. DOI: 10.1152/advan.00019.2005.

VAN DEN KERKHOF, D. L.; NAGY, M.; WICHAPONG, K.; BROUNS, S. L. N.; HEEMSKERK, J. W. M.; HACKENG, T. M.; DIJKGRAAF, I. Inhibition of platelet adhesion, thrombus formation and fibrin formation by a potent $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin inhibitor from ticks. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 1, p. 231-242, 2020. DOI: 10.1002/rth2.12466.

VERÍSSIMO, C. J.; CARDOSO, V. L.; PINHEIRO, M. G. Haircoat characteristics and tick infestation on gyr (zebu) and crossbred (holstein x gyr) cattle. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, n. 195, p. 389-392, 2002.

VERMA, P. *et al.* Identification of Internal Reference Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Cattle Populations Adapted to Hot Arid Normoxia and Cold Arid Hypoxia Environments. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fgene.2021.730599.

VRENTAS, C. E. *et al.* Characterization of the NLRP1 inflammasome response in bovine species. **Innate Immunity**, v. 26, n. 4, p. 301-311, 2020. DOI: 10.1177/1753425919886649.

VRENTAS, C. E. *et al.* Inflammasomes in livestock and wildlife: Insights into the intersection of pathogens and natural host species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 201, p. 49-56, 2018. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.05.008.

WAMBURA, P. N. *et al.* Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 63-70, 1998. DOI: 10.1016/s0304-4017(97)00229-x.

WANG W.; CHENG L.; YI J.; GAN J.; TANG H.; FU M. Z.; WANG H.; LAI S. J. Health and production traits in bovine are associated with single nucleotide polymorphisms in the NOD2 gene. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 3570-3578, 2015. DOI: 10.4238/2015.April.17.6. PMID: 25966125.

WANG X.; SHAW D. K.; SAKHON O. S.; SNYDER G. A.; SUNDBERG E. J.; SANTAMBROGIO L.; SUTTERWALA F. S.; DUMLER J. S.; SHIREY K. A.; PERKINS D. J.; RICHARD K.; CHAGAS A. C.; CALVO E.; KOPECKÝ J.; KOTSYFAKIS M.; PEDRA J. H. F. The Tick Protein Sialostatin L2 Binds to Annexin A2 and Inhibits NLRC4-Mediated Inflammasome Activation. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 6, p.1796-1805, 2016. DOI: 10.1128/IAI.01526-15. PMID: 27045038; PMCID: PMC4907130.

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 1-22, 1996. DOI: 10.1146/annurev.en.41.010196.000245.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005. DOI: 10.2144/05391RV01.

WU Q.; ZHU Y. H.; XU J.; LIU X.; DUAN C.; WANG M. J.; WANG J. F. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Ameliorates *Escherichia coli*-Induced Activation of NLRP3 and NLRC4 Inflammasomes With Differential Requirement for ASC. **Frontiers in Microbiology**, v. 24, n. 9, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01661.

WU, Z. *et al.* MiR-495-3p attenuates cell pyroptosis and endometritis through inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in bovine. **Molecular Immunology**, v. 163, p. 75-85, 2023. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.09.007.

YESSINOU, R. E. *et al.* Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 6, p. 408-414, 2016.

Yu CH, Moecking J, Geyer M, Masters SL. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 2, p. 142-152, 2018. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.07.012.

ZAKI, M. H. *et al.* *Salmonella* exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 385-390, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1317643111.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156-171, 2015. DOI: 10.1111/imr.12291.

ZHANG, F. K. *et al.* Expression profiles of genes involved in TLRs and NLRs signaling pathways of water buffaloes infected with *Fasciola gigantica*. **Molecular Immunology**, v. 94, p. 18-26, 2018. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.12.007.

APÊNDICE A

Tabela Apêndice A – Amostras de pele aleatórias submetidas a extração de RNA por Kit RNeasy, Trizol (Fenol-clorofórmio) e Kit Fibrous Tissue avaliadas por Nanodrop

Amostras	Método	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
H10	Kit RNeasy	3,44	0,086	0,053	1,62	0,16
H3	Kit RNeasy	4,88	0,122	0,106	1,15	0,17
G10	Kit RNeasy	6,88	0,172	0,096	1,79	0,35
G4	Kit RNeasy	6,92	0,173	0,088	1,95	0,11
G4	Trizol	6,44	0,161	0,106	1,52	0,06
H10	Trizol	7,12	0,178	0,106	1,68	0,25
G4	Trizol	7,16	0,179	0,112	1,61	0,14
G10	Trizol	8,6	0,215	0,132	1,62	0,14
H3	Trizol	8,92	0,223	0,15	1,49	0,28
H3	Trizol	15,44	0,386	0,225	1,72	0,18
G10	Trizol	17,64	0,441	0,282	1,57	0,29
G10	Trizol	41,08	1,027	0,578	1,78	0,26
H10	Trizol	50,6	1,265	0,718	1,76	0,36
G1	Kit Fibrous Tissue	24,1	0,603	0,293	2,06	0,78
G5	Kit Fibrous Tissue	35	0,678	0,802	1,25	0,68
G1	Kit Fibrous Tissue	84,4	2,109	1,140	1,25	1,32
G6	Kit Fibrous Tissue	38,7	0,968	0,493	1,96	0,27
H11	Kit Fibrous Tissue	27,7	0,692	0,432	1,72	0,53

ng: nanograma; μl: microlitro

APÊNDICE B

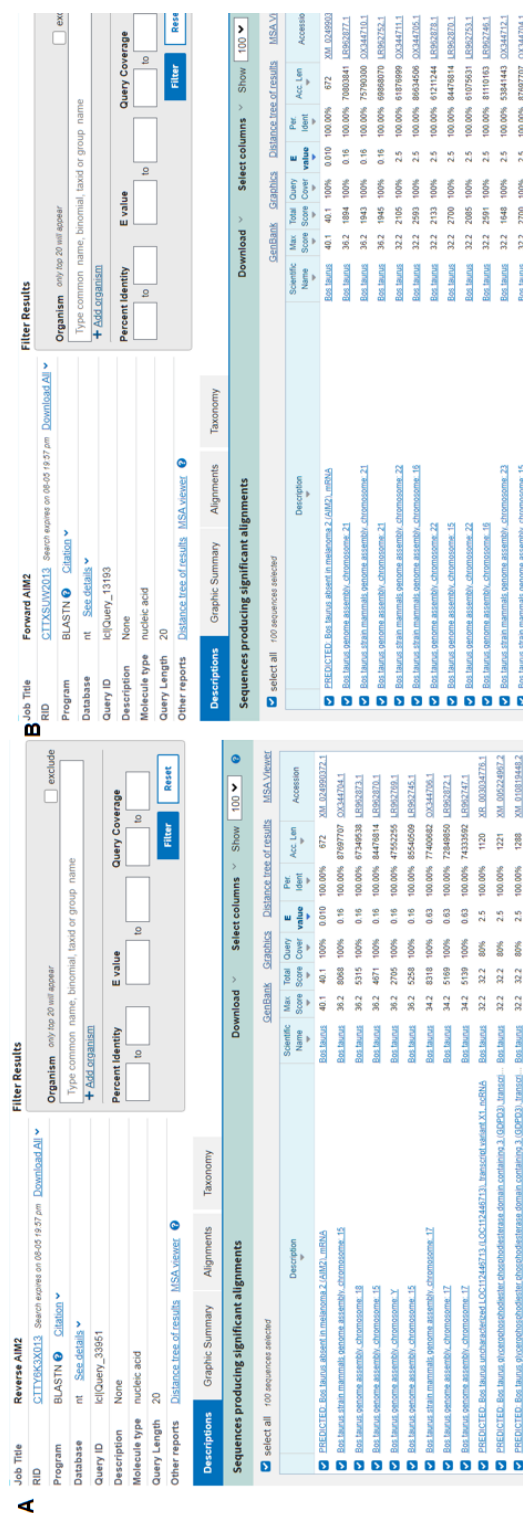
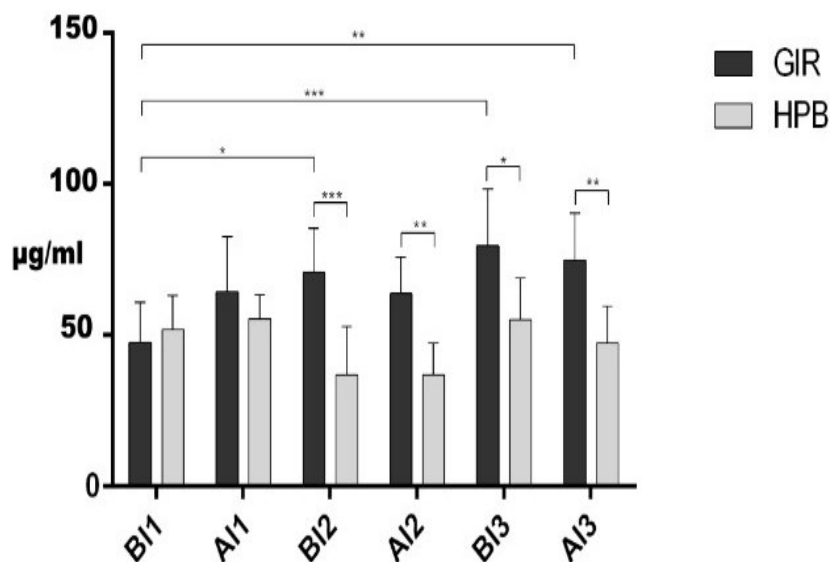


Figura Apêndice B – Experimento in silico do primer de AIM2 (Blast). A. *Primer reverse*; B. *Primer forward*.

ANEXO A

Gráfico Anexo A – Concentração de ROS convertido em nitrito no soro de animais taurinos e zebuínos desafiados com carrapatos



Soro de animais Gir (n=6) e HPB (n=6) foram coletados antes (BI) e após (AI) as três diferentes infestações artificiais com larvas infestantes de *R. microplus*. No eixo Y, concentração de nitrito (ug/ml). Os asteriscos (*, **, ***) indicam $P < 0,05$, Two-way ANOVA.

Fonte: Moreira *et al.*, (2023)