

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE BOVINOS NELORE E CRUZADOS,
SENEPOL X NELORE E ANGUS X NELORE, INFESTADOS COM CARRAPATO
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

ADRIANA MÉRCIA GUARATINI IBELLI

SÃO CARLOS – SP

2012

ADRIANA MÉRCIA GUARATINI IBELLI

(Bióloga)

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE BOVINOS NELORE E CRUZADOS,
SENEPOL X NELORE E ANGUS X NELORE, INFESTADOS COM CARRAPATO**

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

ORIENTADORA:

LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO CARLOS – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

I125ar

Ibelli, Adriana Mércia Guaratini.

Avaliação da resposta de bovinos Nelore e cruzados, Senepol x Nelore e Angus X Nelore, infestados com carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Adriana Mércia Guaratini Ibelli. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
126 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética animal. 2. Expressão gênica. 3. Bovinos - parasitas. 4. Carrapato. I. Título.

CDD: 591.15 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE BOVINOS NELORE E CRUZADOS,
SENEPOL X NELORE E ANGUS X NELORE, INFESTADOS COM
CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**

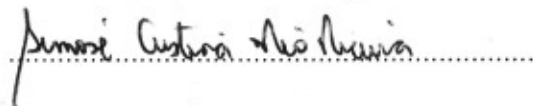
Tese de Doutorado de
ADRIANA MÉRCIA GUARATINI IBELLI

Banca Examinadora:

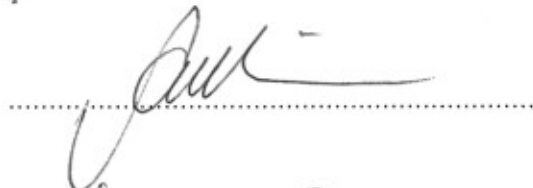
Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano



Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura



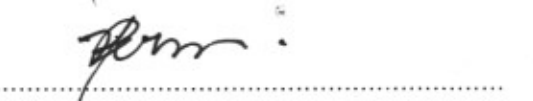
Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha



Profa. Dra. Andrea Roberto Bueno Ribeiro



Profa. Dra. Poliana Fernanda Giachetto



**À Deus,
aos meus pais Ana Maria e Adilson,
ao meu irmão Adilson**
Dedico

“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar.

A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana Correia de Almeida pela orientação, confiança, apoio, amizade, paciência e pelos ensinamentos.

A Dr^a Márcia Cristina de Sena Oliveira pelo apoio em todas as fases do projeto, confiança e todos os ensinamentos.

Aos pesquisadores: Dr. Fernando Flores Cardoso, Dr. Roberto Higa, Dr^a. Poliana Fernanda Giachetto e Dr. Michel Eduardo Beleza Yamagishi por toda disponibilidade nas análises dos dados de microarranjos.

A Prof. Dra. Rosimeri O. Vasconcelos por me ensinar e auxiliar em toda a técnica de imunistoquímica.

A Dra. Andrea Roberto Bueno Ribeiro pela amizade, mesmo de longe e por todo o auxílio nas análises de comportamento.

Ao Dr. Henrique Nunes de Oliveira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Rui Machado pela assistência durante os experimentos de campo.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Doutorado durante o período de Setembro de 2008 a Abril de 2011.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Doutorado Sanduíche durante o período de Maio a Dezembro de 2011.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução por permitir todo o crescimento que tive desde o mestrado.

Às secretárias do PPGGEv Ivanildes e Greissi pela atenção em todos os momentos.

Ao amigo Rodrigo Giglioti pela amizade construída desde os primeiros estágios

realizados na Embrapa Pecuária Sudeste em 2005 e por toda ajuda nas análises comportamentais, projetos fantasmas, análises estatísticas, conversas e conselhos.

A Dr^a Simone Cristina Méo Niciura pelas sugestões, amizade e pela sempre disponibilidade em me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal (Embrapa – Pecuária Sudeste): Gisele Batista Veneroni, Sarah Laguna Meirelles, Marcela Maria de Souza, Polyana Cristine Tizioto, Gustavo Gasparin, Marina Ibelli Pereira Rocha, Adriana Somavilla, Suelen Scarpa de Mello, Juliana Gracielle Gonzaga Gromboni e Ana Luisa Paçó.

A Flávia Aline Bressani Donatoni e Gilbertinho pela amizade, ajudas e risadas por todo esse tempo. Ao Wilson Malagó Jr. por todas as conversas científicas e não científicas.

Aos alunos do Laboratório de Imunoistoquímica, Márcio, Pâmela e Claudia.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste pela colaboração.

Às Dra Mônica Correa Ledur e Dra. Jane de Oliveira Peixoto pelo apoio e incentivo.

A Embrapa Suínos e Aves por me permitir iniciar um novo caminho e pela liberação para a defesa.

A meus pais Adilson e Ana Maria e meu irmão Adilson pela paciência, amor, carinho e incentivo inesgotável.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada!!!

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURA	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA	19
1.1. A Bovinocultura de corte no Brasil	19
1.2. Importância das infestações por carrapatos	20
1.3. Biologia do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	22
1.4. Controle	24
1.5. Diferenças de resistência entre raças de bovinos	27
1.6. Mecanismos de resistência de bovinos ao carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	33
1.7. Evasão do sistema de defesa pelo carrapato	40
1.8. Ferramentas de Biologia Molecular no estudo da resistência de bovinos ao carrapato	43
2. Objetivos	50
3. Material e Métodos	51
3.1. Animais	51
3.2. Infestação artificial por carrapatos	51
3.3. Obtenção das amostras	52
3.4. Análise histológica da pele e hematologia	53
3.5. Imunoistoquímica	54
3.6. Avaliação de características estruturais do pelame	55
3.7. Análise comportamental	56
3.8. Extração de RNA	57

3.9. <i>Análise de expressão gênica em larga escala (Microarranjos)</i>	58
3.10. <i>Validação dos genes por PCR em tempo real</i>	62
4. Resultados e Discussão	67
4.1. <i>Contagem de carrapatos</i>	67
4.2. <i>Análises histológicas</i>	69
4.3. <i>Análises de características do pelo e pelame</i>	74
4.4. <i>Análise de comportamento</i>	76
4.5. <i>Análise de expressão gênica</i>	81
5. Conclusões	95
Apêndice	120

RESUMO

Entre os principais problemas da pecuária brasileira está o parasitismo por carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de bovinos de três grupos genéticos infestados com *R. microplus*. Para isso, amostras de pele de fêmeas Nelore (NX) e cruzadas, Senepol x Nelore (SN) e Angus x Nelore (TA), foram coletadas, antes e após a infestação artificial com larvas de *R. microplus* para análises de expressão gênica e de histologia. Foram também coletados pelos e realizada análise comportamental visando relacioná-los com a carga parasitária dos animais. Foi verificada diferença significativa ($P < 0,01$) para a contagem de carrapatos entre os três grupos avaliados, sendo que os animais TA ($0,92 \pm 0,07$) apresentaram maiores médias e o grupo NX ($0,28 \pm 0,07$), a menor média. Na contagem diferencial de leucócitos, animais TA tiveram maiores ($P < 0,05$) quantidades de monócitos que NX, não diferindo de SN. Não houve diferença significativa para os outros leucócitos avaliados. Entretanto, o grupo genético NX teve maiores médias ($P < 0,01$) de mastócitos que SN e TA. NX apresentou mais células TCD4 que TA, não diferindo de SN. Foi observada correlação negativa entre o número de carrapatos e de células TCD4. Nas análises de pelo e pelame, o grupo genético TA apresentou maiores valores das características comprimento médio de pelo (CP) e densidade de massa (DM) dos pelos que SN e NX ($p < 0,05$), que não diferiram entre si. Já para as características de número de pelos por amostra e número de pelos/cm², NX apresentou maiores médias ($p < 0,05$) que SN e TA, que não diferiram entre si. Os resultados da correlação de Pearson indicaram que CP e DM têm correlação positiva ($P < 0,05$) com a contagem de carrapatos. Na análise de comportamento foi possível observar que o total dos eventos de auto-limpeza (*grooming*) avaliados influenciou a contagem de carrapatos e que há correlação negativa com o número de carrapatos, auxiliando a redução desse parasita, especialmente na raça Nelore e que nos dias 1, 4, 6 e 7 após a infestação e nos horários das 7:00, 9:00 e 12:00 h os animais realizaram mais eventos de *grooming*, quando comparados aos outros períodos. De acordo com os resultados de expressão gênica em larga escala das amostras de pele, não foi possível observar influência do grupo genético na expressão dos genes. A comparação entre os grupos antes e depois da infestação mostrou que

1502 genes foram diferencialmente expressos. Desses, 851 foram ativados e 651 tiveram sua expressão reduzida após o desafio. Os resultados encontrados no experimento de microarranjos foram validados por PCR quantitativo em tempo real. Entre os genes e vias metabólicas ativados na resposta ao carrapato destacaram-se as quimiocinas, os genes de sinalização das vias MAPK e Jak-Stat, os receptores de citocinas, do complemento e de moléculas de adesão focal. Tais vias e genes podem ser apontados como candidatos a desempenhar papel de proteção do hospedeiro bovino nesse período do ciclo parasitário. Dessa maneira, foi possível observar que mecanismos como, comportamento de auto-limpeza e aumento no número de mastócitos devem conferir resistência ao carrapato. Além disso, foram encontradas vias metabólicas ainda não descritas na literatura que podem ser novos alvos para o desenvolvimento de estratégias de combate ao carrapato, como vacinas e fármacos.

ABSTRACT

Infestations caused by ectoparasites are among the main problems that affect stock raising in tropical countries, and in Brazil, the *Rhipicephalus (Boophilus)* tick is responsible for substantial losses in the animal production. The aim of this study was to evaluate the response of three genetic groups of cattle artificially infested with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. For this, skin samples from Nellore (NX) and crossbreeds, Senepol x Nellore (SN) and Angus x Nellore (TA) heifers were collected before and 24 hours after the last artificial infestation with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae for gene expression analysis and histology. We collected hair and performed behavioral analysis in order to relate them to the cattle parasite load. There were significant differences ($P < 0.01$) for the tick count within three studied groups. TA animals (0.92 ± 0.07) had higher mean and the NX group (0.28 ± 0.07), the lowest mean. In the differential leukocyte count, TA animals had higher numbers of monocytes than NX ($P < 0.05$), not differing from SN. No significant differences were evaluated for other leukocytes. However, the NX genetic group had higher mean for mast cells than SN and TA ($P < 0.01$). NX had more CD4 cells than TA that did not differ from SN. Negative correlation was observed between the number of ticks and CD4 T cells. In the hair and haircoat analysis, TA showed the higher values of haircoat mean (CP) and mass density (MD) of hair than SN and NX ($p < 0.05$), which did not differ from each other. For the number of hairs per sample and number of hair/cm², NX had larger mean ($p < 0.05$) than SN and TA, which did not differ. Results of Pearson correlations indicated that CP and DM have a positive correlation ($p < 0.05$) with tick count. Regarding grooming behavior it has been observed that the total of self-grooming, as well as, allogrooming events influenced the tick count evaluated, and that there is a negative correlation with the tick number, helping to reduce this parasite, especially in Nellore. On 1, 4, 6 and 7 days after infestation and at the times 7:00, 9:00 and 12:00 h animals performed more grooming events when compared to other periods. According to the large scale gene expression results, there was no difference within genetic groups. The comparison between the groups before and after 24 hours infestation showed that 1,502 genes were differentially expressed. Of these, 851 were activated and 651 had reduced expression after challenge. The microarray experiment was validated by quantitative real time PCR.

Among the genes and pathways activated in response to tick, the chemokine genes, MAPK signaling pathways and Jak-Stat, cytokine receptors, complement and focal adhesion molecules as well as calcium channel genes stood out. Such genes and pathways can be identified as candidates to play the role of host protection at this time of bovine parasitic cycle. In this way, it was observed that mechanisms as grooming and increase of mast cells should confer resistance to tick. Furthermore, we found metabolic pathways that were not previously described in the literature may be novel targets for the development of strategies prevent tick infestation, as vaccines and drugs.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Fotografia de um animal da raça Nelore	29
Figura 2. Fotografia de um animal da raça Angus	30
Figura 3. Fotografia de um animal da raça Senepol.	31
Figura 4. Etapas de desenvolvimento de uma sonda GeneChip, Affymetrix	47
Figura 5. Grupos genéticos utilizados no experimento. (A) Angus x Nelore; (B) Senepol x Nelore; (C) Nelore	51
Figura 6. Preparação das amostras de RNA, utilizando o kit OneCycle análise de expressão genica utilizando Bovine GeneChip.	60
Figura 7. Média do número de carrapatos de acordo com cada infestação e grupo genético.	68
Figura 8. Fotomicrografia da pele de bovinos desafiados artificialmente com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (A) Intensidade do processo inflamatório (*) na derme superficial (Obj. 10x). (B) Os linfócitos foram o tipo celular predominante (setas, Obj. 40x). Hematoxilina e eosina.	71
Figura 9. Fotomicrografia da pele de bovino desafiado artificialmente com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> . (A) Os eosinófilos também foram observados no infiltrado inflamatório (seta, Obj. 40x, Hematoxilina e eosina, NX). (B) Os mastócitos foram observados associados aos linfócitos e eosinófilos (setas, Azul de Toluidina, Obj. 40x).	72
Figura 10. Eventos de auto-limpeza, self-grooming (S1), fazendo allogrooming (FA), recebendo allogrooming (RA) e o total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$ distribuídos ao longo dos 10 dias de análise (Figura 10a) e de acordo com os horários do dia (Figura 10b).	78
Figura 11. Eventos de auto-limpeza total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$	79

de acordo com o grupo genético (Nelore - NX, Senepol x Nelore – SN e Angus x Nelore – TA).

Figura 12. Gráfico segundo o programa *Genorm*, mostrando a ordem da 84 estabilidade dos genes

Figura 13. Qualidade do RNA submetido à análise dos microarranjos em gel 86 de agarose 1% e após a análise de hibridização dos microarranjos.

Figura 14. Heatmap mostrando a distribuição dos genes entre os grupos 88 (antes da infestação e após a infestação) estudados. O destaque em amarelo evidencia os genes responsáveis pela diferenciação dos dois grupos.

Figura 15. Vias metabólicas com maior número de genes relacionados a 90 resposta ao carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Figura 16. Razão de expressão gênica em pele de bovinos antes e após a 91 infestação entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizada para um gene referência (RPL-27). As barras representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos (C e D) em relação ao gene referência. As linhas pontilhadas representam a média de expressão gênica. As linhas representam as observações máxima e mínima. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,10$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase em tempo real.	63
Tabela 2. Genes Constitutivos utilizados neste trabalho.	65
Tabela 3. Médias estimadas para porcentagem de retorno transformada (PRtrans) e $\log_{10}(n+1)$ da contagem do número de carrapatos (CTT), de acordo com grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore and TA-Angus x Nelore) e infestação.	67
Tabela 4. Estimativa das médias de leucócitos sanguíneos transformadas em $\log_{10}(n+1)$, de acordo cada grupo genético (Nelore - NX, Senepol x Nelore, SN e Angus x Nelore - TA).	70
Tabela 5. Estimativa das médias do número de mastócitos na pele de acordo com o grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA-Angus x Nelore)	73
Tabela 6. Estimativa das médias do número de linfócitos TCD4 e TCD8 na pele de acordo com o grupo genético (NX– Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA-Angus x Nelore)	73
Tabela 7. Estimativa das médias das características transformadas em $\log_{10}(n+1)$ do comprimento médio dos pelos (CP, mm), espessura do pelame (EP,mm), número de pelos/cm ² (NPA, pelos/cm ²), número de pelos por amostra (NP, pelos) e densidade de massa dos pelos (DM, g/cm ²), de acordo com o grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA-Angus x Nelore)	74
Tabela 8. Correlação de Pearson obtida entre as medidas de pelo e pelame, comprimento de pelo médio (CP), espessura do pelame (EP), número de pelos (NP), número de pelos por amostra (NPA), densidade da amostra (DM) e número de carrapatos transformados TTC, considerando todos os grupos genéticos e por grupo. Os valores indicam a coeficiente de correlação e o	76

valor de p.

Tabela 9. Estimativa das médias do número de carrapatos transformados em $\log_{10}(n+1)$ (CTT) e porcentagem de retorno transformada (PRtrans) para os 24 animais analisados no experimento de comportamento. 77

Tabela 10. Estimativa das médias dos eventos de auto-limpeza, self-grooming (S1), fazendo allogrooming (FA), recebendo allogrooming (RA) e o total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$ 77

Tabela 11. Correlação de Pearson obtida entre comportamentos de *grooming* self-grooming (S1), fazendo allo-grooming (FA), recebendo allo-grooming (RA) e *grooming* total (TG) e porcentagem de retorno transformada (PRtrans) e contagem total de carrapatos (CTT). Os valores indicam a coeficiente de correlação e o valor de p. 80

Tabela 12. Resultados da análise pelo programa Bestkeeper indicando o melhor gene constitutivo. (N – tamanho amostral, MG – média geométrica; M. Ar. – média aritmética, SD – desvio padrão, e CV – coeficiente de variação) 83

Tabela 13. Resultados da análise pelo programa Normfinder indicando o melhor gene constitutivo. 83

LISTA DE ABREVIATURAS

NX – Nelore
 SN – Senepol x Nelore
 TA – Angus x Nelore
 CP – comprimento de pelo médio
 DM – densidade de massa
 AVA – anastomose arteriovenosa
 Th1 – Células T auxiliadora tipo 1
 Th2 – Células T auxiliadora tipo 2
 IgG – Imunoglobulina G
 QTL – *locus* de característica quantitativa
 IL-2 – interleucina 2
 MHC – complexo de histocompatibilidade
 cDNA – DNA complementar
 mRNA – RNA mensageiro
 NPA – número de pelos por amostra
 NP – número de pelos/cm²
 EP – espessura do pelame
 GG – grupo genético
 CTT – número total de carrapatos transformados em log₁₀ (n+1)
 PRtrans – porcentagem de retorno de carrapatos transformados
 ANKRD1 – ankirin 1
 AQP – aquaporina
 BRB - *brain ribonuclease*
 CHI3L2 – *chitinase 3 -like 2*
 CXCL5 – precursores da quimiocina (CXC) 5
 HSD17B13 - *17-beta hydroxysteroid dehydrogenase*
 IGHG1 - *immunoglobulin heavy constant gamma 1*
 ISG15 - *interferon-stimulated gene product 17*
 PGLYRP1 - *peptidoglycan recognition protein 1*
 Serpine 2 – inibidor de serino protease 2
 qPCR – PCR quantitativo
 GAPDH – gliceraldeído fosfato desidrogenase

RPL19 – proteína ribossomal L19

RPL27 – proteína ribossomal L27

RPS9 – proteína ribossomal R9

YWHAZ - *tyrosine 3-monooxygenase*

Ct - Ciclo de início da detecção do produto amplificado

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E JUSTIFICATIVA

1.1. *A Bovinocultura de corte no Brasil*

O Brasil possui o maior rebanho comercial mundial de bovinos (ABIEC, 2012a; USDA, 2012) com aproximadamente 210 milhões de cabeças, contrastando com 38 milhões de suínos, 16 milhões de ovinos e 9 milhões de caprinos (IBGE, 2012). Aproximadamente 20 % encontra-se na região Norte do país, 14 % na Nordeste, 18% na Sudeste, 13 % na Sul e 34 % na Centro-Oeste, sendo que Mato Grosso, São Paulo e Mato Grosso do Sul são os principais Estados em número de animais abatidos (IBGE, 2012). Dessa maneira, evidencia-se que a bovinocultura é uma das principais atividades econômicas geradoras de empregos e riqueza para o país (MILLEN et al., 2011).

Quanto às exportações, é o maior exportador de carne mundial, seguido por Austrália, Índia, Nova Zelândia e Canadá (ABIEC, 2012b), com mais de 1 milhão de toneladas de carne industrializada, o que movimenta aproximadamente 5,1 bilhões de dólares anuais (ABIEC, 2012a). No mercado interno, o consumo de carne bovina é ainda superior ao de outras carnes, como suínos e ovinos, com aproximadamente 30 kg/pessoa/ano, o que corresponde a 34% das carnes consumidas (ANUALPEC, 2012).

Apesar da grande importância que a bovinocultura exerce tanto na economia nacional quanto internacional, sua produtividade ainda não atingiu níveis máximos. Ainda é o segundo país em produção de carne bovina (ABIEC, 2012b) e, com o aumento da produção e competitividade de produtos produzidos por Austrália e Índia, seu primeiro lugar em exportação também pode estar ameaçado (USDA, 2012). Vários são os fatores que afetam a produtividade brasileira, sendo possível citar os métodos de produção, o manejo, a alimentação, o potencial genético e os problemas com a sanidade animal. Dentre os principais problemas relacionados à saúde animal, destacam-se as infestações por ectoparasitas, especialmente as causadas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

1.2. Importância das infestações por carrapatos

Os carrapatos são considerados um dos parasitas mais importantes, tanto para a saúde pública quanto para a sanidade animal, sendo também vetores de doenças causadas por microrganismos patogênicos como bactérias, protozoários, rickettsia, vírus, entre outros (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* está distribuído amplamente pelo mundo, sendo um dos principais ectoparasitas de importância econômica, afetando as áreas tropicais e subtropicais na Ásia, Austrália, África e Américas do Norte e do Sul (KESSLER; SCHENCK; 1998; PRUETT et al., 2008). De Castro (1997) estimou que as perdas anuais globais causadas por esse ectoparasita são de aproximadamente 13 a 18 bilhões de dólares, enquanto que no Brasil, acredita-se que 80% dos bovinos são infestados por esse carrapato, levando a perdas anuais de 800 milhões a 2 bilhões de dólares (HONER; GOMES, 1990; GRISI et al, 2002; MARTINEZ et al., 2006), aproximadamente US\$ 12 dólares por animal. Por isso, o carrapato tornou-se um dos principais alvos de programas de controle e erradicação em alguns países da América Latina (NARI, 1995).

Os danos econômicos causados pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* podem ser divididos em diretos e indiretos. Os diretos são advindos da hematofagia intensa realizada pelas fêmeas teleóginas, da desvalorização do couro, da perda no ganho de peso e no crescimento e da diminuição da produção de leite. Já as perdas indiretas são relacionadas aos altos gastos com insumos, como a utilização de acaricidas e com o aumento da demanda de trabalho em campo do pessoal envolvido (GRISI et al., 2002, FRIZZO, 2005). Foi estimado na Austrália, que das perdas anuais na criação de bovinos, 49% seria devido às despesas relacionadas ao controle do carrapato (JONSSON, 2000).

Acredita-se que cada fêmea teleóquina tenha a capacidade de sugar cerca de 2 a 3 mL diários de sangue dos bovinos (GONZALES, 1975), sendo responsáveis pela diminuição da produção de 8,9 mL de leite e 1 grama de peso por dia (JONSSON et al., 1998). Riek (1957) encontrou que novilhas *Bos taurus* submetidas à infestação artificial apresentaram alto grau de anemia, com alteração

do hematócrito de 34 para 15 % quando infestadas com 50.000 larvas de carrapato. Com a perda de sangue, também é observada perda na ingestão de alimento, testando também à redução do ganho de peso vivo (LITTLE, 1963). Em um experimento tentando verificar a relação entre a presença de carrapatos e a diminuição da ingestão de alimento, dois grupos de animais Hereford, um submetido e outro livre da infestação com carrapato, foi possível encontrar que o grupo não infestado apresentou média de ingestão de 5,66 kg de matéria seca por dia enquanto que o outro, 4,75 kg de matéria seca por dia (O'KELLY et al, 1971; SPRINGELL et al, 1971).

Horn (1983) estimou que os prejuízos causados pelo carrapato no Brasil eram decorrentes, em pequena parte, da morte de animais (1%), da diminuição do ganho de peso em aproximadamente 6 kg/animal/ano e diminuição da produção de leite em cerca de 1,5 bilhão de litros/ano. Bianchin et al. (2007) verificaram, na região Central do Brasil, que animais não tratados com carrapaticidas apresentavam média de 13 Kg de peso a menos do que animais tratados, ou seja, o ganho de peso foi menor em cerca de 20 g/dia. De forma geral, cerca de 40 % das perdas são relacionadas à produção de leite, 11 % ao desempenho reprodutivo, 5% à redução no ganho de peso e 10% aos gastos com acaricidas (BRITO, 2008).

A produção de couro no Brasil também é afetada pela presença endêmica do carrapato e pelas as lesões por ele causadas. Essas lesões podem diminuir a resistência do material, além de gerar uma aparência ruim, o que pode inviabilizar a utilização na indústria do couro (GONZALES, 1974; 1975). O couro de primeira qualidade praticamente não existe no país, sendo que 80% do couro brasileiro enquadra-se de 6ª a 7ª categoria. No entanto, estima-se que se o controle do carrapato fosse eficiente, 40% do couro classificado nessas duas categorias poderia ser agrupado ao couro de 5ª qualidade, agregando pelo menos 25% de valor ao produto (KOLLER, 2009). Quando se compara o Brasil com os EUA, observa-se que apenas 8,5% do couro produzido aqui são de primeira qualidade, contra os 85% produzidos nos EUA (CARDOSO et al., 2001).

Além disso, o prejuízo causado pelo hematofagismo é agravado pela irritação provocada pela picada do ácaro, pela transmissão de outros agentes etiológicos, como *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma* spp, causadores da

tristeza parasitária (RIBEIRO, 1989; REGITANO et al., 2006). Estes agentes estão distribuídos por toda América Latina, e devido à ampla distribuição do carrapato no Brasil (LIMA et al, 2000) sua presença é considerada endêmica e de difícil erradicação. O complexo causador da tristeza parasitária é conhecido por infectar exclusivamente os eritrócitos, causando sintomas como, febre, anemia hemolítica, anorexia, letargia, homoglobinúria, taquicardia e icterícia. A presença de *Babesia bovis* é responsável por causar sintomas mais severos, causando a babesiose cerebral, em que se observam convulsões, paralisia e sequestro dos parasitas para o cérebro, podendo levar à morte dos animais (BROWN;PALMER, 1999; SUAREZ; NOH, 2011). Decorrem da presença de *Anaplasma marginale* outros sintomas, como altos índices de bacteremia no sangue, fraqueza, reduzidas taxas de crescimento, de produção de leite e aborto (KOCAN et al., 2010). Apesar de não existirem estimativas das perdas causadas por esses agentes infecciosos no Brasil, a situação deve ser similar à que ocorre em outros países, como Austrália, por exemplo, em que as perdas chegam a US\$ 20 milhões de dólares anuais, US\$ 21 milhões de dólares na África do Sul e US\$ 20 milhões de dólares na Índia (MCLEOD;KRISTJANSON, 1999).

1.3. Biologia do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A subordem Ixodida é composta por 870 espécies de carrapatos já descritas. Dessas, 685 espécies compõem a família Ixodidae, conhecida como “carrapatos duros”, composta por ácaros hematófagos obrigatórios, com uma fase do ciclo de vida livre e outra fase parasitária (MARCONDES, 2001; PEREIRA et al., 2008). Nessa família, está incluída a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conhecida como o carrapato do boi, única espécie do subgênero *Boophilus* presente no Brasil. Originária da Ásia, está amplamente distribuída por quase todas as áreas tropicais e subtropicais, América Latina (exceto Chile), África e Ásia. No Brasil, é encontrada por todo o território brasileiro, e o parasitismo ocorre ao longo do ano todo (FONSECA et al., 1997).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* apresenta apenas um

hospedeiro e duas fases no seu ciclo de vida: a fase parasitária e a fase de vida livre. O ciclo de vida não parasitário pode se estender de 41 dias a 300 dias, dependendo das condições ambientais. Se inicia quando a fêmea fecundada e ingurgitada cai no solo, procura por áreas protegidas dos raios solares e inicia o que se chama de período pré-postura, que dura aproximadamente 3 dias e é necessário para que haja maturação dos ovos e a postura dos primeiros ovos. Essa fase é dependente de temperaturas favoráveis (acima de 20 °C) e a fêmea se utiliza do sangue, produzindo grandes quantidades de compostos nitrogenados que ficam armazenados até a morte da fêmea do carrapato. Inicia-se então o período de postura, que dura cerca de quinze dias, ocorrendo a produção dos ovos, massivamente, no 5º dia. Aproximadamente no 7º dia após o fim da postura, há a eclosão das larvas no solo. Cada fêmea tem capacidade de originar mais de 3.000 larvas. Essas, que inicialmente são quiescentes, tornam-se infestantes após sete dias, e então, aglomeram-se nas pontas do capim. Elas apoiam-se com os segundo e terceiro pares de patas no capim, enquanto ficam movimentando o primeiro par de patas, provavelmente para localizar o hospedeiro (PEREIRA et al., 2008).

Uma vez em contato com o bovino, inicia-se a fase parasitária, que é menos afetada pelas alterações climáticas e de umidade que a fase de vida livre. Essas larvas se movimentam nas primeiras horas e então se fixam principalmente em locais como períneo, coxas, barbela, tábua do pescoço, pavilhão auricular e região inguinal, provavelmente devido à espessura da pele e à temperatura adequada. Inicia-se a penetração e fixação das larvas, que se alimentam primeiramente de linfa, sofrem a primeira muda após o 8º dia da fixação, transformando-se em ninfas. Essas alimentam-se de sangue, e sofrem nova muda na qual ocorre a maturação sexual. Os machos então percorrem todo o corpo do hospedeiro, fecundando várias fêmeas jovens. No 18º dia, as fêmeas já são partenóginas, continuando o seu repasto e ingurgitando-se totalmente no fim do ciclo, que ocorre do 21º ao 25º dia, sendo que os dias modais geralmente ocorrem entre o 22º ao 23º dia, em que podem ser chamadas de teleóginas. As teleóginas ingerem de 2 a 3 mL de sangue e transformam cerca de 60% da sua massa corporal em ovos, de modo que um grama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem aproximadamente 20.000 ovos (GONZALES et al, 1993). O ciclo se reinicia quando essas fêmeas caem nas pastagens (HITCHCOCK, 1955; PEREIRA et al.,

2008).

É importante notar durante o ciclo do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que apesar de cada fêmea ter a capacidade de originar mais de 3.000 larvas, normalmente, apenas aproximadamente 5% da população está na fase parasitária, enquanto que 95% das fêmeas ingurgitadas, em fase de pré-postura, postura dos ovos e eclosão das larvas encontram-se nas pastagens, atuando como fonte de re-infestação para os animais (PEREIRA et al., 2008).

Devido à fase parasitária ser geralmente curta, se completando em torno dos 22 dias (em condições ideais), o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pode apresentar em média, quatro gerações anuais no Sudeste e Centro-Oeste e três no Sul do país. Isso se deve à mudança de temperatura ao longo das estações do ano, sendo que nas estações mais quentes o ciclo se completa mais rapidamente. A umidade relativa do ar ótima para os ovos é de 80%, sendo que quando essa umidade é baixa, há alta mortalidade desses ovos. A presença de vegetação, como capim braquiária, por exemplo, também é muito importante para a formação de microclima favorável, pois mesmo em períodos muito secos, a temperatura e a umidade são favoráveis sob a vegetação (PEREIRA et al., 2008).

1.4. Controle

O principal método de controle contra os carrapatos, desde que introduzido na década de 1950, é a utilização de carrapaticidas (PRUETT, 1999). No entanto, a utilização indiscriminada desses químicos tem gerado aumento na resistência genética dos parasitas, reduzindo a sua eficácia. Essa resistência dá-se não apenas pelo uso constante, mas principalmente, pelo manejo inadequado, já que grande parte do uso dos acaricidas dá-se pela utilização de tratamentos curativos, em que, observado o carrapato banha-se os animais. Além disso, não são consideradas as quantidades corretas a serem aplicadas, diluições adequadas, os padrões raciais, o ciclo do carrapato, entre outros fatores que acarretam a resistência (GEORGE et al., 2000; BIANCHI et al., 2003; ROCHA et al., 2006). Além disso, a maioria dos países não tem um programa oficial para controle de

carrapatos, o que ajuda a agravar o problema da resistência (NARI; HANSEN, 1999).

A resistência de carrapatos à maioria dos compostos químicos disponíveis no mercado brasileiro, sendo eles, organoclorados, organofosforados, piretróides ou amitraz, já foi verificada (ANDREOTTI et al., 2011, ARANTES et al., 1996; FURLONG et al., 2002; VARGAS et al., 2003; KLAFKE et al., 2006), sendo que os primeiros relatos de resistência a compostos arsênicos ocorreram ainda na década de 1950 (FREIRE, 1953; OLIVEIRA et al., 1986). Furlong (1999) verificou que, para grande parte dos carrapaticidas comercializados no país, não há eficácia superior a 75%. Apesar da grande quantidade de compostos químicos no mercado, a aquisição de resistência tem sido cada vez detectada mais rapidamente nos rebanhos, fazendo com que a descoberta de novos compostos não seja possível na mesma velocidade em que são feitos os relatos de resistência (PEREIRA et al., 2008). Para isso, tem-se priorizado a utilização de carrapaticidas associados a tratamentos racionais, com controle estratégico e levando em consideração o ciclo do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizando rotação de pastagens (para diminuição de larvas nas pastagens) e tentando fazer um manejo da resistência, em que o uso de carrapaticidas é diminuído, com manutenção de parasitas susceptíveis, introdução de raças de bovinos resistentes e utilização correta desses produtos (ANDRADE, 2001; PEREIRA et al, 2008; AMARAL et al., 2011).

Com o aumento de um mercado consumidor exigente, tanto interno quanto devido às exportações, cresce a preocupação com os efeitos desses produtos químicos na carne e no leite. Além das exigências do mercado consumidor, há também maior preocupação com o acúmulo desses compostos no meio ambiente e com o desequilíbrio ecológico causado pela grande quantidade de resíduos gerados (HERNÁNDEZ et al., 1987), o que tem levado ao aumento na busca por novos métodos alternativos de controle à utilização desses acaricidas.

Entre as metodologias alternativas, a utilização de plantas medicinais, o controle biológico com bactérias e fungos, o desenvolvimento de vacinas e o melhoramento genético de bovinos, este último aliado à técnicas de biologia molecular e genômica estão entre as mais estudadas (LABARTHE, 1994; FRISCH, 1999; LEAL et al, 2003; SAMISH et al., 2004)

A utilização de plantas medicinais é uma alternativa potencial, dada a grande diversidade biológica aqui encontrada. Além disso, o desenvolvimento de

resistência dos carrapatos contra os extratos de planta deve ser mais demorado, dado ao fato que esses extratos possuem uma variedade de compostos atuando conjuntamente, enquanto os acaricidas encontrados comercialmente se baseiam em um ou poucos princípios ativos (CHAGAS et al, 2012). Resultados promissores de testes avaliando extrato de plantas contra parasitas têm sido encontrados. Em um estudo verificando a atividade de extratos de semente de Nim (*Azadirachta indica*) em fêmeas ingurgitadas foi encontrada atividade acaricida, inibindo as taxas de ovipostura e eclodibilidade das larvas (GIGLIOTI et al, 2011). Chagas et al. (2012), encontraram resultados similares estudando as plantas *Cymbopogon martinii*. Além de atividade nas fêmeas adultas, acredita-se que as plantas ainda tenham atividade repelente, inibindo a alimentação e sucção, desenvolvimento de ovos, assim como desregulando a maturação sexual e a formação de quitina (KETOH et al., 2006). No entanto, muitas vezes os estudos realizados *in vivo* não corroboram os dados já descritos *in vitro*, sendo necessário um maior número de estudos em como aplicar essas substâncias *in vivo* (BENAVIDES et al., 2001).

Por não apresentar perigo à saúde humana e animal e também com o aumento do mercado de alimentos orgânicos, o controle biológico pode se tornar uma alternativa ao problema de infestação por carrapatos (SAMISHI et al., 2004). O controle biológico se utiliza de bactérias e fungos, muitas vezes predadores naturais, para realizar o controle dos carrapatos. No entanto, as pesquisas com esses agentes ainda não têm resultados conclusivos, e a maioria das pesquisas têm sido realizadas com outras espécies de carrapato. Mauleon; Barre; Panoma (1993) observaram que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não foi sensível à presença de nematóides entomopatogênicos, diferentemente das outras espécies estudadas.

A vacinação dos bovinos seria uma alternativa viável, limpa, sustentável e que poderia ser usada para diversos hospedeiros (WILLADSEN et al, 2004). Atualmente, existem duas vacinas disponíveis contra o carrapato bovino que são comercializadas: uma produzida na Austrália desde 1994, denominada Tick-Gard e outra, desenvolvida em Cuba, chamada Gavac (DE LA FUENTE et al., 2007). Ambas as vacinas utilizam uma glicoproteína do intestino do carrapato, chamada Bm86, que atua como um antígeno oculto, ou seja, um antígeno que não está presente durante o parasitismo natural, de forma que a proteção se dá pela lise das células do intestino do carrapato, havendo a ruptura do intestino e diminuindo o peso e taxa de fecundação da fêmea ingurgitada (WILLADSEN;JONGEJAN, 1999;

DE LA FUENTE et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). A eficácia de ambas as vacinas já foi demonstrada em vários países como Austrália, México e até mesmo em países da América do Sul (DE LA FUENTE et al., 2007). No entanto, a eficácia muitas vezes não ultrapassa os 50 % (MASSARD et al., 1995), de forma que sua utilização isoladamente não é suficiente para o controle do carrapato, sendo necessária a associação concomitante de carrapaticidas. Isso encarece os gastos de produção, e muitas vezes inviabilizam o seu uso. Além disso, já foi verificado em alguns países, como a Argentina, que polimorfismos no gene Bm86 resultam em uma proteína solúvel, reduzindo a eficácia da resposta vacinal fazendo com que esses animais sejam resistentes à vacinação (GARCIA-GARCIA et al., 2000; PARIZI et al., 2009). Por isso, novas estratégias, como a utilização do alelo Bm95, e vacinas de DNA têm sido testadas com a finalidade de aumentar a recorrente imunização parcial encontrada (DE ROSE et al., 1999; PARIZI et al., 2009). Os desafios para o desenvolvimento de uma vacina com alta capacidade imunogênica faz com que seja necessário um melhor entendimento da interação parasita-hospedeiro, e a descoberta de novas proteínas do parasita torna-se essencial para que isso seja possível. Além disso, novas metodologias como a utilização de RNA de interferência podem auxiliar nessas novas descobertas.

Por fim, a variação genética entre e dentro de raças tem sido estudada visando entender quais são os genes e mecanismos envolvidos na resistência ou suscetibilidade das raças bovinas ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MORRIS, 2006). Essa resistência pode estar associada à estabilidade endêmica destas raças (MATTIOLI et al., 2000), e a introdução de genótipos resistentes ao carrapato torna-se uma alternativa viável para o controle desse parasita.

1.5. Diferenças de resistência entre raças de bovinos

A origem do gado doméstico ainda não está bem estabelecida (LOFTUS et al., 2004; CARAMELI, 2006). Classicamente, estão separadas em duas espécies: *Bos indicus*, que apresenta cupim, também chamada de gado indiano ou zebu; e *Bos taurus*, que não apresenta cupim, e é popularmente conhecida como gado europeu (BARBOSA, 1998). No entanto, a falta de isolamento reprodutivo

sugere que elas poderiam ser agrupadas em duas subespécies (HENKES et al., 2005).

Os animais *Bos indicus* se destacam por apresentarem uma grande capacidade de tolerância às condições ambientais dos trópicos. Geralmente apresentam pelos curtos, lisos, membros longos, alta resistência a parasitas, se alimentam-se de pastagens com menor valor nutritivo, mantêm as taxas de fertilidade e tempo de pastagem mesmo com o clima quente e úmido, apresentam tempo de gestação médio de 290 dias, menor cobertura muscular, o que ajuda a locomoção com certa facilidade em terrenos íngremes e a robusta capacidade de manter a temperatura corporal e dissipação de calor (MARQUES, 1969; HANSEN, 2004; RIBEIRO et al, 2009). Já os animais *Bos taurus* têm reduzida adaptação aos trópicos, geralmente apresentando as características opostas ao gado indiano. No entanto, apresenta vantagens produtivas como tempo de gestação reduzido, crescimento rápido, maior cobertura muscular chegando a época de abate mais jovens quando comparados aos zebuínos. Além disso, são popularmente conhecidos por apresentarem melhores características de palatabilidade da carne (Veneroni, 2011).

1.5.1. A raça Nelore

A raça Nelore (Figura 1), primeiramente conhecida como Ongole, é originária da Ilha de Madras, situada na costa da Índia, e onde era utilizada para trabalho e produção de leite (SANTIAGO; 1986; NELORE, 2012). No Brasil, essa raça foi introduzida na Bahia, na década de 1860, chegando aos Estados de Rio de Janeiro e Minas Gerais no ano de 1875 (CATLLEBREED, 2012; CATTLESITE; 2012). Desde então, sua utilização só tem aumentado, de forma que, é a raça com maior número de criadores, chegando a somar, se considerarmos seus cruzamentos, 80% do rebanho zebuíno no Brasil (OLIVEIRA; MAGNABOSCO; BORGES, 2002).

O sucesso da criação da raça Nelore no Brasil ocorreu devido às características que tornam sua produtividade competitiva nas áreas tropicais. Entre elas estão a rusticidade, presente desde as fases iniciais do desenvolvimento, garupa inclinada, que facilita o parto, pelagem clara e outras características que auxiliam os animais a terem um controle eficiente da temperatura corpórea,

simplicidade no manejo e resistência a endo e ectoparasitas (OLIVEIRA; MAGNABOSCO; BORGES, 2002; OLIVEIRA et al, 2009; RIBEIRO et al, 2009;). No entanto, devido a vários fatores, seja de manejo ou genéticos, níveis inferiores de produtividade e qualidade são encontrados, quando comparados ao gado europeu.



Figura 1. Exemplo de um animal da raça Nelore. Foto tirada por Rodrigo Giglioti

1.5.2. A raça Angus

A raça Angus (Figura 2) é originária da Escócia e sua denominação vem dos condados em que foi desenvolvida. Foi introduzida no Brasil no ano de 1906, quando o touro Menelik foi trazido do Uruguai para Bagé – RS. Até a década de 1980, a raça era produzida apenas no Estado do Rio Grande do Sul. A partir dessa data, sua criação foi ampliada, chegando aos outros Estados da Região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (ANGUS, 2012).

Entre as suas principais características, destacam-se a qualidade da carne (marmorizada, macia e suculenta), precocidade sexual, de crescimento e de terminação, facilidade de parto, habilidade materna e longevidade (ANGUS, 2012).

Entretanto, sua produção pode ser afetada por sua difícil adaptação ao ambiente de clima tropical. Características como taxas de crescimento, de ganho de peso, de produção de leite, de concepção, de ingestão de matéria seca e de pastejo apresentam menores índices quando os animais são criados em condições de altas temperaturas na maior parte do ano, ou em contato direto com grande quantidade de ecto e endoparasitas. Parte dessa baixa adaptação pode ser atribuída a características fisiológicas como pelagem escura e comprida, taxas de temperatura retal elevadas, menor habilidade em manter a temperatura corpórea, não conseguindo se adaptar ao estresse calórico dessas regiões (BURROW, 2001; WEST, 2003).



Figura 2. Foto de um animal da raça Angus. Foto retirada do website: http://www.angus.org.br/associacao/visualiza/?ID_ITEM=4.

1.5.3. A raça Senepol

A raça Senepol (Figura 3) originou-se no início do século XVIII, quando animais da raça N'Dama, do Senegal, foram exportados para a Ilha de Saint Croix, condado das Ilhas Virgens. Esses foram cruzados com animais Red Poll, fundando assim a base genética da raça Senepol (SENEPOL, 2012). Essas raças foram escolhidas pois a N'Dama apresenta resistência ao calor, a diversos parasitas, incluindo tripanossomíases e habilidade de viver em pastagens pobres, enquanto que Red Poll apresenta habilidade materna e reprodutiva, e seu cruzamento deveria

gerar uma raça resistente ao estresse térmico, aos parasitas, além de ter boa habilidade materna e produtividade (SENEPOL, 2012).

No Brasil, foi introduzida no início dos anos 2000, sendo os animais importados de rebanhos das Ilhas Virgens e EUA (SENEPOL, 2012). Desde então, a utilização dessa raça tem aumentado, e segundo a ASBIA (2012) está entre as raças que tiveram maior incremento na compra e venda de sêmen. Esse interesse é devido à raça apresentar adaptação ao clima tropical, como na manutenção de temperatura corpórea e retal, resistência a endo e ectoparasitas, sem perder a qualidade e produtividade (OLSON et al., 2007; RIBEIRO et al, 2009; OLIVEIRA et al., 2009)



Figura 3. Animal da raça Senepol. Figura retirada do website: http://senepol.org.br/?pid=inc/inc_conteudo.php&id_grupo=76&id_conteudo=627

Sabendo que animais *Bos indicus* são mais resistentes a ectoparasitas que os *Bos taurus* (Bianchin et al. 2007), atualmente, o estudo de cruzamentos entre esses dois grupos tem aumentado, visando obter animais mais resistentes e também que sejam melhores produtores de carne (Frisch et al. 2000; Oliveira et al., 2009).

Desde o nascimento, bezerros de raças zebuínas que tiveram contato com carrapatos apresentaram maior resistência que animais provenientes de raças europeias puras (O'KELLY;SPIERS,1976), o que indicaria algum tipo de imunidade inata eficiente nos zebuínos. Silva et al.(2007), estudando infestações por carrapato em fêmeas bovinas, tanto artificiais quanto naturais, encontraram que animais

Nelore apresentavam maiores níveis de resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que cruzados Canchim x Nelore, seguido então por Angus x Nelore e Simental x Nelore. Padrões similares de aumento da resistência aos carrapatos com o aumento da porcentagem de *Bos indicus*, foram observados por Utech;Wharton (1982), Wambura et al (1998) e Singh;Gosh (2003). Nesses trabalhos, o número de carrapatos total foi menor quanto maior era o grau de sangue zebuino nos grupos genéticos. Silva et al (2010) também observaram efeito de estado fisiológico no aumento da resistência. Embora zebuínos apresentassem menores contagens, bezerras, seguidas de novilhas vazias, novilhas prenhes, vacas primíparas, vacas pluríparas sem bezerro e vacas pluríparas com bezerro apresentaram maiores e menores quantidades de carrapatos, respectivamente. O efeito de idade, quanto mais velhas mais resistentes, também já foi descrito por Teodoro et al. (1994).

Apesar da contagem do número de carrapatos ser a medida mais comumente usada para avaliar a resistência dos bovinos, já foi possível observar que fêmeas ingurgitadas em animais resistentes apresentaram alterações morfológicas tanto de comprimento, altura e largura, além de serem mais leves que o peso das fêmeas encontradas em animais Angus (MARADAY;GONZALES, 1984). Isso indica que, além de causarem maior desprendimento e morte das larvas, esses animais podem apresentar mecanismos para diminuir a fertilidade e viabilidade dos ovos dos carrapatos.

Acredita-se que os animais *Bos indicus* são melhor adaptados a presença do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* porque eles teriam entrado em contato, ou seja, habitaram área enzoótica antes dos animais *Bos taurus*, desenvolvendo a capacidade de regular a infestação e o parasitismo pelo carrapato, anteriormente ao gado europeu (VERISSIMO, 1991).

Os mecanismos efetivos de proteção desses bovinos variam de acordo com as raças, de modo que os efeitos na infestação dos carrapatos vão desde a simples rejeição das larvas ou parasitas, com ou sem danos ao hospedeiro, no sucesso ou impedimento da alimentação dos carrapatos (WILLADSEN et al., 1989), na diminuição tanto do número quanto do peso das fêmeas ingurgitadas, da viabilidade dos ovos até mesmo a morte do parasita (AKHTAR et al., 2011). Dessa maneira, um maior conhecimento das bases fisiológicas e moleculares da

resistência dos bovinos é necessário para que esses diferentes mecanismos contra o carrapato sejam esclarecidos.

1.6. Mecanismos de resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Os bovinos apresentam um conjunto de mecanismos que impedem o desenvolvimento normal dos carrapatos durante o estágio parasitário. Esses mecanismos de proteção a infestações caracterizam a resistência a esses parasitas (PEREIRA et al., 2008). Riek (1962) observou que a imunidade inata, atua já na primeira infestação, enquanto que a imunidade adquirida foi observada apenas após sucessivas exposições dos animais à infestação. No entanto, devido à alta complexidade da interação parasita – hospedeiro, essa divisão entre os mecanismos inatos e adquiridos deve ser cautelosa, pois é muito difícil observá-la claramente, já que as duas formas atuam de maneira sinérgica (HART, 2000).

Acredita-se que o primeiro mecanismo de resistência ocorra nas 24 horas iniciais do contato do carrapato com o bovino, período em que a maior quantidade de larvas é rejeitada pelo hospedeiro (ROBERTS, 1968). Essa tendência já foi observada tanto em animais *Bos taurus* quanto em *Bos indicus*, sendo mais pronunciada neste último, em que se observa uma maior perda gradual em todos os estágios parasitários (WAGLAND, 1978).

Ao alcançarem os bovinos, as larvas de carrapato movimentam-se por cerca de duas horas, até iniciarem sua fixação pela penetração do rostro na epiderme do hospedeiro (RIEK, 1965). Um dos primeiros mecanismos a serem ativados nessa etapa é o comportamento preventivo de auto-limpeza ou *grooming*. Esse comportamento ocorre ainda enquanto as larvas estão se movimentando, induzindo a sensação de incômodo no animal, mas, principalmente em consequência das lesões causadas pela picada durante sua fixação, que iniciam uma reação de hipersensibilidade imediata, aumentando a concentração de histamina na pele, induzindo uma resposta efetiva do hospedeiro, ativando mecanismos de auto-limpeza e provocando desprendimento das larvas (MORAES, 1992). Este mecanismo é, portanto, um fator importante na redução de infestações por carrapatos (BENNETT, 1969; HART, et al., 1992; MOORING; SAMUEL, 1998;

MOORING et al., 2006). Observações de comportamento evidenciam que bovinos infestados com carrapatos gastam maior tempo fazendo auto-limpeza do que animais livres do parasita, sugerindo uma importante função nas infestações por carrapatos (de CASTRO et al., 1985). Animais infestados também apresentam níveis mais altos de histamina no sangue e reação dérmica edematosa que animais livres deste parasita (RIEK, 1956). Pruett et al. (2006) caracterizaram uma proteína larval de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de 19,1 KDa que seria uma das responsáveis por induzir a reação de hipersensibilidade imediata em bezerros infestados. Em experimentos restringindo bovinos de realizarem esse comportamento, foi observado que os animais apresentaram quatro vezes mais carga parasitária que os animais que permaneceram realizando a auto-limpeza (SNOWBALL, 1956; BENETT, 1969). Esse comportamento deve conferir resistência, já que foi relatado que animais resistentes apresentaram maior frequência desse tipo de comportamento e também apresentaram maiores concentrações de histamina que animais sensíveis ao carrapato (deCASTRO, 1985). Além disso, foi verificado que as perdas, sejam de larvas ou de ninfas, são maiores no período anterior as mudas, período em que a fixação do carrapato no hospedeiro ocorre apenas pelo cone do cemento (BENNETT et al. 1975).

Repetidas infestações com *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* levam a decréscimo na porcentagem de retorno e viabilidade dos ovos de carrapatos (BOWESSIDJAOU et al., 1977; AKHTAR et al., 2011; Silva et al., 2010). Em suínos, a porcentagem de fêmeas ingurgitadas reduziu de 20% a zero, após muitas infestações (WIKEL;ALLEN, 1976). Isso ocorre, pois, uma vez fixados e durante o desenvolvimento, os carrapatos induzem uma resposta complexa do hospedeiro, que inclui numerosos componentes reguladores e efetores do sistema imune, tais como células apresentadoras de antígenos (APCs), particularmente as células de Langerhans, que detectam imunógenos na epiderme e migram aos linfonodos (NITHIUTHAI;ALLEN, 1985), complemento, linfócitos B e T, citocinas, anticorpos, granulócitos e mediadores bio-ativos derivados desses últimos (WIKEL, 1996; BROSSARD; WIKEL, 1997).

O desenvolvimento de infiltrados celulares é uma das principais formas de resistência adquirida dos bovinos após a fixação dos carrapatos na pele. Em um estudo com *Hyalomma anatolicum anatolicum*, foi observado que as infestações

primárias são comandadas preferencialmente por neutrófilos e em seguida, por células mononucleadas, enquanto que nas infestações subsequentes há grande degranulação de mastócitos e basófilos, sendo que estes últimos foram relacionados como um dos principais efetores da resistência em bovinos e coelhos (GILL, 1984). O aumento de basófilos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos na pele foi observado após infestações crônicas (RIEK, 1962, CONSTATINOIU et. al., 2010). O número de mastócitos dérmicos é duas vezes maior em animais resistentes do que em animais sensíveis (MORAES, 1992). Eosinófilos, basófilos e neutrófilos polimorfonucleares também aumentaram em diferentes tempos de infestações por larvas de *Hypoderma lineatum* (LÓPEZ et al., 2005). Carvalho et al. (2010) encontraram recrutamento de eosinófilos e basófilos em sítios de fixação de carrapatos em animais geneticamente resistentes, mas não em animais sensíveis, conferindo resistência àqueles animais.

As anastomoses arteriovenosas (AVA) são canais vasculares que conectam artérias e veias do sistema circulatório, sendo abundantes nas extremidades corpóreas, apresentando funções na manutenção da temperatura e pressão sanguínea. Geralmente, as anastomoses arteriovenosas são características do gado indiano, não sendo encontradas no gado europeu em clima temperado. No entanto, quando esses são introduzidos no ambiente tropical observa-se a presença de AVA (JENKINSON, 1965; AMAKIRI, 1976). A presença de AVA tem sido associada à resistência ao carrapato tanto em bovinos de raças européias quanto de raças asiáticas (SCHLEGER et al., 1981; KONGSUWAN et al., 2010). Schleger et al. (1981) encontraram que animais resistentes *Bos taurus* apresentaram maior concentração de AVA que os animais susceptíveis, e que essas eram observadas em grande quantidade na região do pescoço, que é uma das principais regiões de exposição ao carrapato. As AVA totalizam 5 a 70% da circulação, de forma que sua alta densidade em animais resistentes pode afetar de várias maneiras a sobrevivência das larvas, primeiramente, por uma resposta isquêmica, que já foi associada a resistência aos artrópodes (NELSON et al., 1972). A constrição das AVA também pode provocar mudanças na hemodinâmica da resposta inflamatória, levando a aumento do fluido dos tecidos e linfa, diminuição da sudorese, causando desidratação das larvas não fixadas (ROBERTS, 1971; KEMP et al.; 1976). Resultados semelhantes foram encontrados por Hales et al. (1981) e Kongsuwan et

al. (2008).

O sistema imune do hospedeiro parece ser um dos fatores mais importantes que regulam essa resistência (MATTIOLI et al., 2000). A resistência adquirida ao carrapato ainda envolve a polarização de linfócitos T, que são considerados importantes reguladores e efetores da resposta imune do hospedeiro ao carrapato (WIKEL, 1999), assim como as citocinas Th1/Th2. Vários trabalhos mostram que a supressão de linfócitos Th1 pode inibir a proliferação de clones de linfócitos T-antígeno específicos, diferenciação de células T e provocar hipersensibilidade tardia (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992; WIKEL, 1996). A capacidade de resposta por citocinas na presença de moléculas da saliva do carrapato, mais vigorosa em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*, parece ser um fator que contribui para a resistência inata dos primeiros (RAMACHANDRA; WIKEL, 1995; PIPER et. al., 2010). Frisch (1999) encontrou evidências da existência de genes principais de resistência a esse ácaro, sugerindo que uma melhora significativa na resistência ao carrapato pode ser conseguida pela introgressão desses genes. Estudos posteriores, entretanto, não confirmaram essa hipótese. Apesar disso, a variação para resistência tem sido atribuída à regiões do genoma. Gasparin et al. (2007) mapearam QTL nos cromossomos 5, 7 e 14 de bovinos para número de carrapatos e observaram diferenças no efeito dos QTLs de acordo com a estação do ano. Além disso, microssatélites próximos ao gene da interleucina 4 já foram associados com variação do número de carrapatos na raça Nelore, e em cruzados Angus x Nelore e Canchim x Nelore (REGITANO et al., 2008). A expressão de citocinas também parece ser variável em bovinos de grupos genéticos de diferentes graus de resistência, o que sugere que a resistência ao carrapato apresenta controle de muitos loci do genoma (REGITANO et al., 2008), podendo ser explicadas pela modulação da rede de citocinas induzidas pelos carrapatos (WIKEL, 1999). Nakata et al. (2006) encontraram redução nos níveis de RNAm de IL-2 em bovinos da raça Nelore submetidos à infestação por carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, indicando possível tendência de resposta TH2, caracterizada por produção de anticorpos. Bittar et al. (2004) analisaram o perfil fenotípico de linfócitos T periféricos e encontraram que esta característica pode influenciar o padrão de imunidade clássica apresentada. Eles observaram que baixas concentrações de linfócito T (CD4 e CD8) podem estar associadas à suscetibilidade da raça Holandesa à

babesiose, infecção por hemoparasita transmitido pelo carrapato.

É conhecido que os hospedeiros desenvolvem anticorpos contra os diversos tecidos do carrapato, como glândula salivar, intestino, ovários e outros extratos corpóreos (BARRIGA et al, 1991). A presença de imunoglobulinas (Ig) na infestação por carrapato parece variar de acordo com a resistência do hospedeiro, podendo ser detectadas após a primeira infestação (DaSILVA et al., 1994; NIKPAY et al., 2008). Carvalho et al. (2011) verificaram diferenças nos alótipos de IgG2, sendo que animais Nelore sensíveis apresentavam alótipo IgG2a e os resistentes, IgG2b. Também observou maiores concentrações de IgG1 e IgG2 nos animais resistentes em épocas de maiores cargas parasitárias, no entanto, IgE foi mais elevada nos animais sensíveis em todos os períodos observados. As imunoglobulinas geralmente são ativas na hemolinfa dos carrapatos por até 48 horas após a ingestão pelos parasitas, causando, durante esse período, danos aos tecidos do carrapato (VAZ et al, 1996). Tal mecanismo deve ter papel importante, pois os carrapatos apresentam proteínas ligantes de Ig capazes de inativar esses anticorpos nos seus tecidos (HANNIER et al., 2004).

O sistema complemento é um conjunto de proteínas que interagem entre si, mediando muitas das funções efetoras da imunidade humoral e inflamação. É composto por aproximadamente 29 proteínas encontradas no soro, e pode ser ativado por quatro vias diferentes: via clássica, via alternativa, via da lectina e via de ataque a membrana lítica. Ele está envolvido na imunidade contra carrapatos, pois no sítio de infestação ocorre quimiotaxia e opsonização, que auxilia no recrutamento celular de basófilos e eosinófilos, conferindo resistência ao hospedeiro (ALLEN, 1973; BROSSARD; FIVAZ, 1982), principalmente utilizando-se da via alternativa (RIBEIRO, 1987). Também já foi observado que a inativação do componente C3 faz com que a resistência ao carrapato diminua (WIKEL; ALLEN, 1977).

O interesse nos mecanismos envolvidos na hemostasia dos hospedeiros tem aumentado, uma vez que, sendo hematófagos, os carrapatos devem usar mecanismos para evadir esse sistema nos bovinos, favorecendo sua alimentação. Esse sistema hemostático é composto pelas proteínas responsáveis pela coagulação sanguínea, os vãos, plaquetas, o sistema de fibrinólise e os anticoagulantes naturais. O recrutamento das plaquetas é o primeiro estímulo do

organismo no endotélio danificado, formando uma espécie de tampão de células (ANDREWS et al., 2004). Quando há rompimento no sistema vascular, as plaquetas interagem com a matriz extracelular exposta na parede dos vasos sanguíneos. Elas possuem vários receptores de adesão, que as ligam no colágeno e nos fatores de von Willebrand, caracterizando a regulação primária da agregação plaquetária. Subsequentemente esse agregado entra em contato com integrinas que, em sua conformação ativada e associada ao colágeno, iniciam a adesão e agregação celular. Essas, por sua vez, por meio de sinalização intracelular como secreção de serotonina e ADP, podem ativar agentes pro-trombóticos e iniciar a coagulação sanguínea (ANDREWS et al., 2004).

O início do processo de coagulação é dependente da exposição do sangue a substâncias que não são próprias dos vasos. Esse mecanismo pode ser desencadeado pela presença de injúria vascular ou alterações bioquímicas, como sinalização por citocinas. A coagulação se inicia com a formação do coágulo de fibrina que envolve muitas proteases plasmáticas, cofatores e a conversão de fibrinogênio em fibrina e está dividida em duas vias: a via extrínseca (que utiliza tanto componentes do sangue e elementos que não estão presentes no meio intravascular) e a via intrínseca (que utiliza apenas as substâncias presentes no espaço intravascular), ativando o fator X e em seguida, trombina e fibrina. Na primeira via, o fator VII plasmático, na presença de tromboplastina, ativa diretamente o fator X, enquanto que na segunda via, ou via de ativação por contato, o fator XII é ativado quando entra em contato com uma superfície, requerendo outros componentes do plasma, como pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. Em seguida ao fator XIIa, há a ativação dos fatores XI, IX, IXa, VIII, X, respectivamente, prosseguindo com a produção de trombina e fibrina (FRANCO, 2001). Informações sobre o sistema de coagulação sanguínea e a sua variação entre as raças de bovinos são escassos na literatura. Reck et al (2009) foram os primeiros autores a evidenciar a capacidade dos carrapatos em afetar o sistema hemostático de hospedeiros bovinos. Carvalho et al. (2010) observaram que o tempo de coagulação sanguínea é maior na pele e sangue de bovinos holandeses sensíveis do que de nos animais da raça Nelore. Também encontraram que esse tempo era aumentado quando as peles eram infestadas com ninfas e parasitas adultos, quando comparados com o tempo de coagulação de animais não

infestados. Animais resistentes apresentaram maior quantidade de basófilos e eosinófilos. Eosinófilos podem auxiliar na ativação da inflamação, e também do sistema hemostático, desencadeando aumento na expressão do fator tecidual, iniciando a adesão de plaquetas (MOOSBAUER et al., 2007). Tanto nas vias do sistema complemento, quanto no sistema de hemostasia, já foram descobertas centenas de moléculas produzidas pelo carrapato que afetam a eficiência da defesa pelo hospedeiro.

Além desses fatores, efeito de mês ou estação do ano, de sexo e idade do animal, coloração de pelame, comprimento de pelo, espessura de pele e estado nutricional têm sido associados às variações nos níveis de infestações pelo carrapato. Maior infestação nas estações de verão e outono, assim como em animais com maior espessura do pelame já foram relatadas para diversas raças (VERÍSSIMO, 1997; VERÍSSIMO, 2002, GASPARIN et al., 2007).

A função da barreira epidérmica na resistência ao carrapato tem sido muito explorada (KONGSUWAN et al., 2010). Esses autores encontraram diferenças evidentes nos componentes epidérmicos entre bovinos Belmont Red resistentes e susceptíveis no período de fixação da larva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sugerindo que a rápida diferenciação da epiderme pode auxiliar no desprendimento imaturo da larva, resultando em falha na sua alimentação e, conseqüentemente, diminuindo as suas chances de sobrevivência. Assim, a manutenção da barreira epidérmica é de suma importância na defesa contra os carrapatos, sendo mantida por genes como c-myc e Notch (ROMANI et al., 2009). O aumento no influxo de cálcio nas primeiras 24 horas da infestação, também faz com que haja uma maior diferenciação de queratinócitos (KONGSUWAN et al., 2008), ativação de transglutaminases, que criam ligações irreversíveis e insolúveis das fibras de queratina, dificultando o acesso do parasita (CANDI et al., 2005; KONGSUWAN et al., 2010). Bovinos resistentes ao carrapato apresentaram super expressão de muitos genes relacionados aos canais de cálcio quando comparados aos animais suscetíveis, tanto antes quanto após a exposição aos carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BAGNALL et al., 2009). Essas características também podem estar associadas à espessura da pele, tendo já sido descrito que os carrapatos infestam animais com pele mais fina (MATIOLLI et al, 1997). No entanto, em outros trabalhos, essa mesma relação não foi obtida (WILKINSON, 1962). Tanto a

espessura do pelame quanto o tamanho dos pelos pode dificultar a fixação dos carrapatos, devido à sudorese e também a uma cobertura gordurosa produzida pelas glândulas sebáceas. Kongsuwan et al. (2010) encontraram que genes de produção de queratina nos pelos (KRT33B) e relacionados a glândula sebácea (BLIMP1) foram mais expressos em animais resistentes.

1.7. Evasão do sistema de defesa pelo carrapato

Apesar dos hospedeiros apresentarem mecanismos de defesa eficientes, os carrapatos produzem substâncias biologicamente ativas que facilitam sua fixação, ingurgitamento, permanência e que ainda modulam a resposta do hospedeiro. Entre os mecanismos que os parasitas apresentam para evadir a resposta imune, estão a baixa regulação das moléculas de MHC, de células apresentadoras de antígenos, bloqueio do sistema complemento, inibição de citocinas e variação antigênica (RIBEIRO, 1989; WIKEL; ALARCON-CHAIDEZ, 2001). Essa habilidade na supressão das defesas imunes aumenta o grau de complexidade da relação entre agentes causadores de doenças e seus hospedeiros (WIKEL; BERGMAN, 1997). Além disso, como necessitam da obtenção do sangue para sua alimentação e sucesso na vida parasitária, desenvolveram mecanismos para driblar as três principais etapas do sistema hemostático: a vasoconstrição, a agregação plaquetária e a cascata de coagulação (VALENZUELA, 2004).

A base molecular da “alimentação” (sucção) dos carrapatos no hospedeiro têm sido mais estudada atualmente, pois se sabe que os carrapatos alteram seus perfis proteicos durante o ciclo parasitário. Acredita-se que o perfil de expressão gênica que regula as fases de alimentação e fixação do carrapato no hospedeiro seja único para cada etapa do parasitismo (WANG et al, 1999; MULENGA et al 2007). No início da infestação, ainda quando o hipostômio está sendo inserido na pele do hospedeiro, durante os 5 a 30 primeiros minutos, os carrapatos já secretam uma mistura de substâncias (SONENSHINE, 1993), relacionadas tanto à regulação dos estágios iniciais do parasitismo pelo carrapato, atuando na formação do cimento que fixa o carrapato na pele do animal, quanto na

modulação da expressão gênica, proporcionando a sua manutenção e sobrevivência, completando assim o ciclo parasitário.

A fase de alimentação que também compreende a fixação e o início da lesão na pele do hospedeiro, inicia-se durante as primeiras 24 - 36 horas, com uma fase lenta de moderada ingestão de sangue que pode aumentar até o sétimo dia e então atingindo uma fase rápida de ingestão (SONENSHINE, 1993).

A presença de substâncias vasodilatadoras na saliva do carrapato permite que os parasitas continuem a se alimentar mesmo após a injúria no tecido do hospedeiro. Elas são associadas a células musculares e aumentam a produção de adenosina monofosfato (cAMP) e guanosina monofosfato (cGMP), capazes de causar o relaxamento muscular e aumentar o fluxo sanguíneo (VALENZUELA, 2004). Todos os vasodilatadores conhecidos provenientes da saliva de carrapato são derivados de lipídeos, como prostaglandina E2 (PGE2) (RIBEIRO et al., 1985) e prostaciclina (RIBEIRO;MAKOUL;ROBINSON, 1988).

O bloqueio da agregação plaquetária se dá pela presença de moléculas específicas que bloqueiam a interação entre os agonistas da adesão e agregação das plaquetas, como trombina, colágeno, integrinas e ADP, necessários para formação do tampão de plaquetas (FERGUSO;ZAQQA, 1999). Uma das estratégias utilizadas pela espécie *Ornithodoros moubata* é a utilização de uma disagreguina, uma proteína de apenas 7 KDa que apresenta a capacidade de se ligar a glicoproteína, impedindo a ligação destas com as plaquetas (LOUW;NEITZ, 2002). Mecanismos similares foram observados em *Dermacentor variabilis*, que apresenta a varialibina. A via dependente de ADP também é afetada quando os carrapatos produzem substâncias que destroem ou hidrolisam o ADP, pela utilização de enzimas apirases (VALENZUELA, 2004).

Quanto às substâncias anticoagulantes, elas podem ser encontradas atuando praticamente em todas as etapas da cascata de coagulação. O peptídeo anticoagulante TAP, inibe a ativação do fator Xa, um dos principais responsáveis pela formação de trombina. Espécies dos gêneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* apresentam proteínas antitrombina, como americanina e savignina (VALENZUELA, 2004). Ainda possuem atividade anti-inflamatória, como anti-IL-8 e anti-quimiocinas, que são responsáveis pelo recrutamento celular, como neutrófilos e migração trans-endotelial descrita nas espécies *Dermacentor reticulatus*, *A. variegatum*, *R. appendiculatus*, *Haemaphysalis inermis* e *I. ricinus* (HAJNICKA et al,

2001). Esses carrapatos apresentam proteínas ligantes de histamina, que competem com seus receptores diminuindo os efeitos de histamina, de degranulação de IgE, afetando a polarização de citocinas Th1 e Th2 (ALJAMALI et al., 2003)

Estudos tentando identificar proteínas que regulam a fase de adesão e alimentação dos carrapatos concentram-se após vários dias da fixação no hospedeiro (MULENGA et al, 2003; RIBEIRO et al, 2006). Esses experimentos levaram a descobertas de muitas substâncias bio-ativas, anti-inflamatórias e anticoagulantes (RIBEIRO et al, 2006). No entanto, é interessante ressaltar que poucos são os dados disponíveis quando se fala dos genes e proteínas que regulam os eventos que iniciam o processo de fixação, alimentação e manutenção dos carrapatos. Acredita-se que esses genes/proteínas são essenciais na fase que prepara o início da fixação do parasita, auxiliando na sucção de sangue e também na transmissão de doenças (SONENSHINE, 1993). Dessa maneira, as proteínas envolvidas no início da infestação podem ser alvos para o desenvolvimento de novos métodos de controle dos carrapatos, já que são moléculas antigênicas e poderiam ser usadas para conferir proteção dos animais contra o parasitismo das diversas espécies de carrapatos.

Entre as diversas proteínas de interesse envolvidas no sucesso da infestação por carrapatos estão as serpinas, inibidores de serino proteases. São parte da maior família de inibidores de proteases segundo a base de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) e estão presentes em bactérias, vírus, plantas e animais (GETTINS, 2002). Em humanos, fazem parte de 2% das proteínas do plasma e estão envolvidas na regulação da fertilização, digestão e ainda, coagulação sanguínea, do complemento e inflamação, entre outras (SILVERMAN et al., 2004). Em artrópodes, as serpinas já foram relacionadas à imunidade em mosquitos, no desenvolvimento da mosca das frutas e no controle da cascata de coagulação da hemolinfa de um verme do tabaco (MICHEL et al., 2006; MIURA et al., 2004). Nos carrapatos, sua função ainda é desconhecida, no entanto, acredita-se que esses parasitas utilizem as serpinas para evadir o sistema de defesa do hospedeiro (MULENGA et al., 2009).

Mais de 30 serpinas já foram clonadas e descritas em várias espécies de carrapatos, incluindo *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Ixodes scapularis*, entre outras (MULENGA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2006), e seu

potencial como alvo no controle de carrapatos tem sido evidenciado em diversos estudos.

As serpinas provenientes dos fluidos do carrapato teriam ação nos mecanismos de defesa do hospedeiro atuando, por exemplo, no atraso da coagulação sanguínea, como já observado na proteína HLS2 de *Haemaphysalis longicornis* (IMAMURA et al., 2005). Sugino et al. (2003) também sugerem que essas proteínas atuam no controle da cascata proteolítica. Além disso, já foi observado que a serpina Iris, de *Ixodes ricinus*, modula tanto a imunidade inata quanto a adquirida do hospedeiro, interferindo ainda nos mecanismos de coagulação sanguínea e impedindo a agregação plaquetária (PREVOT et al., 2006).

Foi observado também, que quando carrapatos são colocados em animais imunizados com serpinas recombinantes, há menor ingestão de sangue, redução da fecundidade e aumento da mortalidade dos carrapatos, sugerindo que essas proteínas têm um papel importante na fisiologia desses ectoparasitas (SUGINO et al., 2003; IMAMURA et al., 2005). Andreotti et al. (2001) observaram redução significativa do número de carrapatos e no peso dos ovos após a vacinação de bovinos com uma serpina de *Rhipicephalus microplus*. Resultados similares também foram encontrados por Imamura et al. (2005) e (2006).

Além das serpinas, outras substâncias como lectinas, boophilinas e cisteíno proteases também têm sido identificadas e caracterizadas por auxiliar a manutenção do ciclo de vida parasitário do carrapato, modulando o sistema de defesa do hospedeiro (GRUBHOFFER; KOVAR; RUDENKO, 2004).

Por fim, a modulação realizada pelos carrapatos nos bovinos permite que as doenças transmitidas pelo carrapato, como anaplasmose e babesioses, sejam eficientemente instaladas no hospedeiro, já que esses microrganismos exploram as atividades farmacológicas da saliva do carrapato, de modo que sua transmissão seja, em grande parte das vezes, ativada pela saliva, disseminando essas doenças com facilidade pelo rebanho (NUTTAL; LABUDA, 2004).

1.8. Ferramentas de Biologia Molecular no estudo da resistência de bovinos ao carrapato

Desde a década de 1990, uma revolução genômica foi iniciada, permitindo um maior acúmulo de informação dos genes de uma ampla variedade de

espécies, auxiliando o conhecimento das mais diferentes áreas de estudo (LANDER et. al, 2001). Com o desenvolvimento das plataformas de sequenciamento de nova geração, a partir de 2005, essa informação começou a ser acumulada exponencialmente (CARVALHO;SILVA, 2010). A mesma tendência foi observada com o aumento de publicações envolvendo resistência de bovinos ao carrapato, assim como, das doenças por ele transmitidas (JENSEN;MIRANDA-SANTOS;GLASS, 2007).

Num primeiro momento, houve grande interesse na descoberta de regiões genômicas de interesse, relacionadas a resistência por meio de estudos dos polimorfismos denominados microssatélites. Gasparin et. al. (2007) encontraram QTLs para resistência nos cromossomos 5, 7 e 14 de bovinos Gir e Holandês. Na mesma população, foram encontrados QTLs nos cromossomos 2 e 10 nas estações secas do ano e 5, 11 e 27, nas estações chuvosas e no cromossomo 23, para ambos os períodos (MACHADO et al, 2010), indicando que nesses cromossomos existem genes responsáveis por conferir resistência dos animais aos carrapatos. Posteriormente, os polimorfismos de uma única base (SNPs) começaram a ser estudados em genes candidatos, como na descoberta dos alelos DRB3.2 do complexo de imunohistocompatibilidade de bovinos (BoLA) que conferem resistência de bovinos Gir e Holandês ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MARTINEZ et al., 2006). Atualmente, com o desenvolvimento dos chips de SNPs de alta densidade, cobrindo todo o genoma bovino (contendo de 50 mil a mais de 700 mil desses polimorfismos), novos genes relacionados à resistência ao carrapato devem ser descobertos. Entretanto, além de saber quais os genes ou regiões genômicas estão associadas a esse parasita, é de grande interesse entender como é o funcionamento e a relação entre esses genes, utilizando-se RNA mensageiro ou proteínas.

Entre as estratégias mais utilizadas para estudo da expressão gênica estão a hibridização por *northern blot*, quantificação de genes semi-quantitativa e em tempo real, que exploram um ou poucos genes em um mesmo experimento (SEIDEL, 2008). Com o desenvolvimento da tecnologia de microarranjos, foi possível obter dados de expressão de milhares de genes em apenas um experimento (SEIDEL, 2008), permitindo entender a relação entre eles em um determinado contexto biológico, como por exemplo, os genes diferencialmente

expressos em bovinos quando infestados com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

A técnica de microarranjos utiliza um método baseado na hibridização do RNA mensageiro para mensurar a expressão dos genes em uma determinada condição biológica. É derivada da técnica padrão de *Northern blot*, amplamente utilizada por muitos anos para os estudos de expressão gênica. Basicamente, na técnica de *Northern blot*, o RNA total é extraído, fracionado, submetido a eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferido para uma membrana de nylon. A identificação e quantificação é feita através de uma sonda radioativa marcada de DNA complementar ao RNA de interesse, a intensidade da marcação é correspondente ao nível de expressão do mRNA. Nos microarranjos, ao invés da presença de uma sonda marcada, o que se tem é a marcação do complexo de mRNA da amostra, de forma que as moléculas de mRNAs, quando hibridizadas com as sondas depositadas em uma lâmina ou membrana, se mantêm a elas fixadas, enquanto que as que não encontraram homologia com as sondas, são descartadas (lavadas) antes da quantificação. Apesar dos primeiros microarranjos terem utilizado membranas para identificação dos genes diferencialmente expressos entre duas condições, a técnica foi sendo aperfeiçoada. Atualmente, três principais tipos de arranjos são utilizados em todo o mundo: microarranjos construídos a partir de oligonucleotídeos ou produtos de PCR que são colocados em uma lâmina de vidro (*spotted microarrays*), GeneChips da Affymetrix, que utilizam oligonucleotídeos sintetizados na superfície de um chip e outras plataformas de síntese *in situ* comercializados por Agilent e NimbleGen (SEIDEL, 2008).

Os *spotted microarrays* foram os primeiros amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa e utilizavam plasmídeos de bibliotecas ESTs de produtos de PCRs ou longos oligonucleotídeos, preparados nos próprios laboratórios, que tiveram que adquirir os robôs necessários para distribuir esses produtos na lâmina de vidro. Apesar do custo do robô, os produtos utilizados eram os de rotina de laboratório de biologia molecular. No entanto, devido a não uniformidade na distribuição dos *spots*, e também da utilização da dupla marcação (geralmente um grupo tratamento era marcado com um tipo de fluorescência e o outro com uma fluorescência diferente), que gerava variação nos dados, esse método foi aos poucos sendo menos utilizado (SEIDEL, 2008).

Ao mesmo tempo, surgiram os GeneChips, provenientes da empresa Affymetrix, a plataforma NimbleGen e a Agilent. A NimbleGen utiliza a tecnologia denominada *Maskless photolithography*, que é controlada por micro-espelhos digitais na síntese dos arranjos, enquanto a Agilent usa um método similar a impressoras Ink-Jet, para a síntese de oligos de 60-mers em uma lâmina de vidro (SEIDEL, 2008).

Os GeneChips da plataforma Affymetrix são os comercialmente mais utilizados (SEIDEL, 2008). A construção dos chips se dá em uma superfície modificada contendo o reagente silano, produzindo uma superfície estável de grupos hidroxialquil. Moléculas com grupos fotossensíveis são ligadas covalentemente aquela superfície com silano, para criar uma superfície que pode ser ativada pela luz. Uma máscara fotolitográfica, que contém a informação das sequências a serem contidas no arranjo, é cuidadosamente desenhada. Cada máscara é produzida contendo espaços que permitem a transmissão da luz ultravioleta. Esses espaços são distribuídos por toda máscara, baseada nos desenhos e sequência de cada transcrito. Ela é alinhada a uma membrana de quartzo, que permite que a síntese dos oligonucleotídeos seja ativada apenas nas localizações corretas. Assim, quando a luz ultravioleta brilha através da máscara, os grupos hidroxil das moléculas são desprotegidos, ativando o acoplamento do nucleotídeo, enquanto que as não expostas permanecem protegidas e inativas. A síntese dos oligonucleotídeos prossegue por esses dois processos de proteção/desproteção e acoplamento. Para cada ciclo da síntese, existe uma máscara única, que prossegue até que os 25-mers da sonda sejam completados (Figura 4).

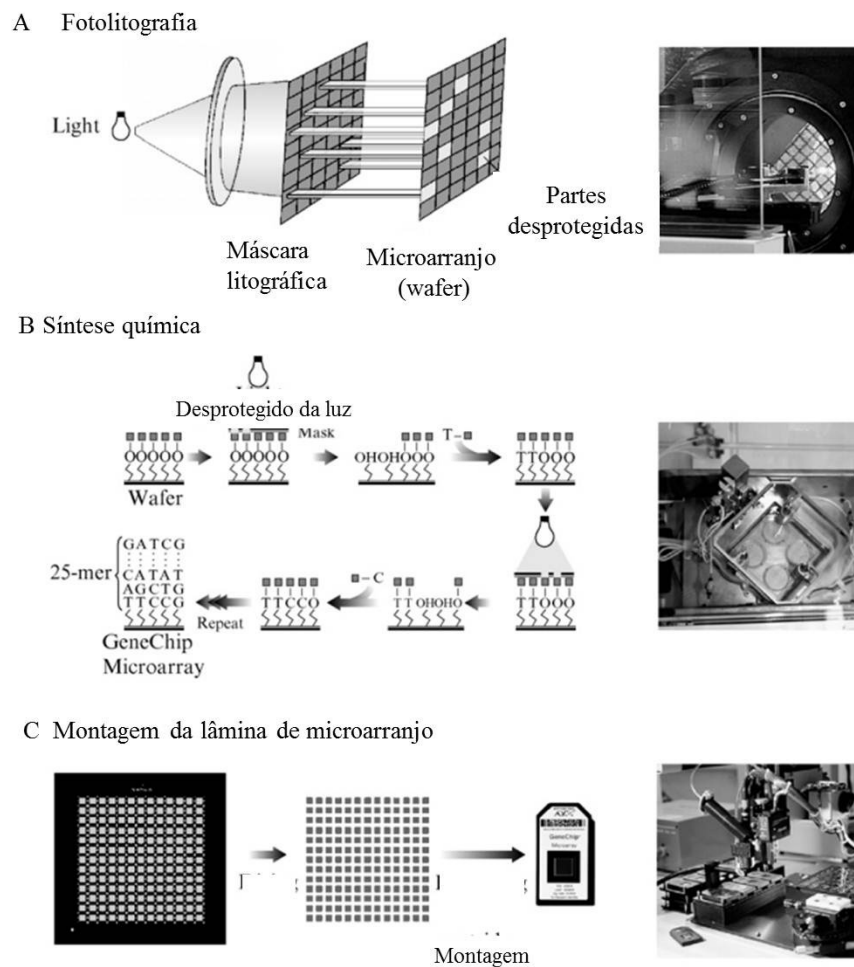


Figura 4. Etapas de desenvolvimento de um microarranjo GeneChip, Affymetrix. Figura adaptada de DALMA-WEISZHAUSZ et al, 2008.

Uma vez que a síntese seja completada, esses *wafers* contendo os oligonucleotídeos são colocados dentro da estrutura do GeneChip ficando prontos para a utilização. No caso das sondas para investigação expressão gênica, as sondas são selecionadas de modo a garantir identidade única dos transcritos, sítios de *splicing* e variantes de poliadenilação, obtendo-se informação de alta qualidade (DALMA-WEISZHAUSZ et al, 2008). Além disso, os genechips contêm um grande número de controles internos e sondas para genes constitutivos. Uma vez obtidas as imagens das hibridizações, é realizada a análise, como quantidade de pixels, coeficiente de variação da intensidade dos pixels, a distância dos pixels e obtém-se um arquivo com as intensidades encontradas, para mensurar os níveis de expressão dos transcritos.

A análise dos dados de microarranjos é feita por uma variedade de algoritmos desenvolvidos para sumarizar, normalizar os dados e enfim obter as razões de expressão entre os tratamentos estudados. É nessa fase que muito dos gargalos na análise de dados de microarranjos se inicia, pois na maioria das vezes, por ser uma técnica cara, poucas replicatas biológicas são utilizadas. Por outro lado, o número de dados gerados por amostra disponíveis é muito grande. Esses fatores dificultam as análises estatísticas e muitas vezes podem afetar a confiabilidade dos dados, pois geralmente, a variação entre as amostras é alta. Por isso, é necessário um cuidado com a normalização dos dados para a obtenção das razões de expressão (JOANNIDIS et al., 2009).

Os estudos de expressão gênica utilizando a técnica de microarranjos têm sido amplamente utilizados em humanos para comparar tecidos, tipos e respostas teciduais a uma variedade de condições como câncer (CAWLEY et al., 2004) e doenças infecciosas (COMER et al, 2005), e essa visão global dos mecanismos moleculares de expressão tem auxiliado a estratificação de doenças, personalizando o perfil de resposta a uma determinada doença de acordo com cada paciente, assim como, para verificar diferentes estágios de virulência e interação parasita hospedeiro (DALMA-WEISZHAUSZ et al, 2008). Uma busca no banco de dados do NCBI retornou aproximadamente 500 artigos utilizando a técnica de microarranjos diversas pesquisas com bovinos, nas mais diferentes áreas como, qualidade da carne, endoparasitoses, reprodução, doenças transmitidas por carrapatos, doenças vesiculares, entre outros. No entanto, os trabalhos verificando a resposta de bovinos ao carrapato são escassos, apenas dois encontrados em todo NCBI.

Apesar da grande utilização da tecnologia de microarranjos, após o desenvolvimento dos equipamentos de sequenciamento de segunda geração, surgiu recentemente (aproximadamente no ano de 2010) uma alternativa para o estudo de expressão gênica em larga escala, que é o sequenciamento de RNA (RNAseq). Essa tecnologia usa em geral uma população de RNA, total ou fracionada, contendo poliadenilação, que é convertida em uma biblioteca de cDNA com adaptadores acoplados em uma ou ambas as extremidades. Cada molécula, amplificada ou não, é então sequenciada, gerando sequencias de 30 a 400 pares de bases, apresentando a vantagem de não ter limite de detecção para o número de

transcritos e níveis de expressão. A técnica tem sido considerada tão acurada quanto os níveis de expressão mensurados através de PCR quantitativa, agregando dessa maneira, algumas vantagens em relação ao uso de microarranjos (WANG;GERSTEIN;SNYDER, 2009; MARTIN;WANG, 2011).

Portanto, tendo em vista a importância da bovinocultura no Brasil e no mundo, e o impacto do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sobre a cadeia produtiva e que o estudo da resposta do hospedeiro é uma das alternativas mais eficazes que permite o entendimento das e os mecanismos de resistência e suscetibilidade a ele associados, consideramos que esse conhecimento contribuirá para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, vacinas e controle de ectoparasitas, resultando no aumento da produção animal, diminuição de gastos e seleção de animais mais resistentes.

2. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi identificar e avaliar os mecanismos de resposta envolvidos na resistência de bovinos Nelore e cruzados Senepol x Nelore, e Angus x Nelore, à infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Para atingir este objetivo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Avaliação das diferenças na expressão de genes em larga escala, em resposta à infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para os diferentes grupos genéticos;
- Contagem das células presentes na pele e no sangue, nas características morfológicas de pelo e pelame e sua influência no grau de infestação por carrapatos.
- Avaliação da presença do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) nos bovinos dos diferentes grupos genéticos.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

O trabalho desenvolvido foi realizado na Fazenda Canchim, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Foram utilizadas 15 fêmeas de cada um dos três grupos genéticos (GG) avaliados: cruzadas Senepol x Nelore (50,0% de *B. taurus*, sendo desse total 25% de raça adaptada *N'Dama* e 50,0% de raça *Bos indicus* adaptada aos trópicos - SN), Angus x Nelore (50,0% de *B. taurus* e 50,0% de *Bos indicus* adaptada - TA) e Nelore (0,0% de *B. taurus* e 100,0% de raça *Bos indicus* adaptada - NX), que nasceram no período de novembro de 2005 a janeiro de 2006 e permaneceram no período de amamentação em pastagens de capim-tanzânia, no verão, e capim-braquária, no inverno (Figura 5). Entre os meses de junho e julho de 2006 foram desmamadas e passaram a ser manejadas em pastagens de capim-tanzânia.



Figura 5. Animais representantes dos grupos genéticos utilizados no experimento. (A) Angus x Nelore; (B) Senepol x Nelore; (C) Nelore

3.2. Infestação artificial por carrapatos

Os experimentos de infestação artificial foram realizados durante os meses de março e abril de 2008, como parte do projeto “Rede bife de qualidade” financiado pela Embrapa.

Os animais foram tratados com carrapaticida a base de imidinas antes do início do experimento e, aproximadamente, 30 dias, depois as infestações artificiais com larvas de carrapato *R. microplus* foram iniciadas. A partir dessa data, os animais não receberam mais tratamentos carrapaticidas até o fim do experimento. Quatro infestações artificiais sucessivas foram realizadas, com intervalos de 14 dias,

utilizando larvas de carrapato com idades variando entre 15-18 dias. As larvas foram obtidas de fêmeas adultas de *R. microplus* colhidas a intervalos de 15 dias, que foram lavadas e incubadas em estufa BOD à temperatura de 27-28°C e umidade relativa do ar maior que 70%, condições ideais para postura. Os ovos foram pesados em alíquotas de 1 grama, que contém cerca de 20.000 ovos (GONZALES, 1993) e colocados em seringas de 20 ml. As seringas contendo os ovos foram novamente incubadas em BOD à mesma temperatura e umidade descritos acima, para que houvesse a eclosão das larvas. Foram utilizadas somente as seringas que apresentaram taxas de eclosão superior a 90%, determinada por avaliação visual. As infestações foram feitas com o animal contido em brete, colocando-se todo o conteúdo de uma seringa ao longo da região lombar do animal. Após cada infestação, foram feitas cinco contagens do 19° ao 23° dia após a infestação do número de fêmeas de carrapatos que apresentassem cerca de 4,5 mm de diâmetro, presentes no lado esquerdo de cada animal. Os dados, resultantes das contagens artificiais, foram analisados em termos de percentagem de retorno ou de recuperação, ou seja, percentagem de carrapatos contados em relação ao total infestado, representada por $P_{ij} = 400 \cdot C_{ij} / 20.000$, em que 400 é o fator usado para percentagem (100), razão de sexo do carrapato (1:1 machos e fêmeas) e um lado do animal, e $C_{ij} = \text{somatório em k de } C_{jk}$, em que j é o número da infestação (j = 1, ..., 4) e k o número da contagem (k = 1, ..., 5) do animal i, dentro de cada infestação. Para a análise estatística dos dados, P_{ij} foi transformado para $(P_{ij})^{1/4}$, conforme Oliveira;Alencar (1987) e esses dados foram transformados em $\log_{10}(n+1)$. Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS, com modelo que incluiu os efeitos de GG, contagem, infestação e interações, além do resíduo.

3.3. Obtenção das amostras

As amostras dos 45 animais pertencentes ao experimento foram obtidas em duas etapas, durante os meses de março e abril de 2008: 1) Antes das infestações artificiais - foram coletadas amostras de pele com o auxílio de um "punch" de aço inoxidável medindo 8 mm de diâmetro armazenadas em freezer -80 C; 2) 24 horas após a quarta infestação dos animais com as larvas de *R. (Boophilus)*

microplus, foram coletadas duas amostras de pele, sendo que uma foi armazenada em freezer - 80°C, para posterior análise de expressão, e a outra foi armazenada em paraformaldeído 4%, para análise histológica.

3.4. Análise histológica da pele e hematologia

Os tecidos coletados foram fixados em paraformaldeído 4% por no mínimo 24 horas e armazenados em etanol 70%. A seguir, foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool, seguindo o protocolo abaixo:

- 1-) 1 hora em etanol 70 %
- 2-) 1 hora em etanol 90 %
- 3-) 1 hora em etanol 95 %
- 4-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 1
- 5-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 2
- 6-) 1 hora em etanol 100 %, frasco 3
- 7-) 1 hora em etanol 100 %: xilol (1:1)

Após a desidratação, foi realizada a diafanização, para que o álcool presente no material fosse substituído por xilol, como abaixo descrito:

- 1-) 1 hora em xilol, frasco 1
- 2-) 1 hora em xilol, frasco 2
- 3-) 1 hora em xilol, frasco 3

A inclusão em parafina foi feita através da passagem dos tecidos em três banhos de parafina a 60 °C por 1 hora cada um. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Histofisiologia da USP – São Paulo. O material foi armazenado em geladeira, para obtenção de cortes histológicos com o uso de micrótomo, e as seções histológicas foram colocadas nas lâminas, coradas e submetidas à análise morfológica.

As lâminas com cortes de pele foram coradas com hematoxilina-eosina, para análise histopatológica no Laboratório de Histopatologia da UNESP – Jaboticabal, sob coordenação da docente Prof. Dra. Rosemeri Vasconcelos. Foi realizada análise geral dessas lâminas, para verificar a presença de inflamação e os tipos celulares predominantes. Lâminas coradas com azul de toluidina foram confeccionadas para a contagem de mastócitos. Os dados de contagem de

mastócitos foram transformados em $\log_{10}(n+1)$ e analisados pelo procedimento MIXED do SAS, com modelo que incluiu GG e contagem.

Lâminas preparadas com esfregaços de sangue e coradas com Giemsa-May Grunwald foram utilizadas para contagem de linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos. Foram contadas 100 células por lâmina em microscópio óptico em aumento de 40x. Esses dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS, com modelo que incluiu GG.

3.5. Imunoistoquímica

Como não foi possível realizar a contagem das células nas lâminas de hematoxila-eosina, a técnica de imunoistoquímica foi escolhida para a análise de linfócitos TCD4 e TCD8 na pele dos bovinos. A partir das amostras de pele incluídas em parafina foram feitos cortes de aproximadamente 4 mm, que foram montados em lâminas silanizadas positivamente carregadas, a fim de evitar a queda dos cortes durante a técnica.

Após a montagem das lâminas, os cortes foram colocados por no mínimo uma hora em estufa a 60 °C e prosseguiu-se com a desparafinização das amostras, colocando-as por 10 minutos em 2 banhos de xilol, seguidos de um banho de Xilol:álcool por 10 minutos, 3 banhos de 10 minutos em etanol 100%, 2 banhos de 10 minutos em etanol 95% e finalizando com 2 banhos de etanol 85%. Em seguida, as lâminas foram lavadas 10 vezes em água deionizada e iniciou-se a recuperação antigênica, imergindo as lâminas em TE pH 9,0, que foram colocadas em banho maria por 30 minutos a 95 °C. Após 20 minutos, quando as lâminas estavam em temperatura ambiente, elas foram lavadas 5 vezes com água deionizada e imergidas em Tris-HCl pH 7,6 durante 5 minutos. Foi realizado o bloqueio de proteínas utilizando o reagente *DAKO® Protein Block Serum-Free* por 20 minutos, seguido por lavagens de 5 minutos em água deionizada e Tris HCl pH 7.6. O anticorpo primário (TCD4 ou TCD8) foi aplicado nas lâminas e essas foram incubadas por 18 horas a 4 °C. Após, prosseguiu-se com lavagens de 5 minutos em água deionizada e Tris HCl pH 7,6 e bloqueio da peroxidase endógena, utilizando peróxido de hidrogênio a 8% por 20 minutos, lavagens com água deionizada e Tris HCl, como descrito previamente. Na etapa posterior, o anticorpo secundário (anti-

Rabbit/Mouse/Goat) presente no kit *LSAB™Universal* (Dako) foi aplicado por uma hora à 27 °C. Foram feitas lavagens e então, os tecidos eram marcados com o reagente DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) por 2 minutos. As lâminas foram colocadas em água e em seguida submetidas a contra-coloração com hematoxilina, por 30 segundos e montadas para posterior contagem das células. Foram contadas 100 células por lâmina em microscópio óptico em aumento de 40x.

A análise estatística foi realizada pelo procedimento proc GLM do SAS, cujo modelo incluiu os efeitos de animal aninhado dentro de GG e GG. O teste de hipóteses foi utilizado, sendo que animal (GG) foi usado como termo de erro. O teste de Tukey ($p=0,05$) foi utilizado para a comparação entre as médias dos grupos genéticos, que inclui o resíduo de animal (GG) para o ajuste das comparações.

3.6. Avaliação de características estruturais do pelame

A coleta dos pelos e a avaliação da espessura do pelame foram realizadas no mesmo dia das coletas de pele e sangue, no mês de abril de 2008.

Primeiramente foi realizada a medida da espessura do pelame, com o auxílio de uma régua metálica fina milimetrada, acoplada a um cursor. Esta foi introduzida verticalmente no pelame até tocar levemente a epiderme do animal e em seguida o cursor foi deslocado até alcançar a superfície do pelame.

Após a medida da espessura do pelame, uma amostra de pelo também foi coletada no mesmo lugar, com o auxílio de um alicate “bico de pato” adaptado com um afastador, sendo que quando o alicate era pressionado a fechar, mantinha suas mandíbulas afastadas a uma distância de 1,5 mm. Para a apreensão dos pelos o alicate foi introduzido em ângulo reto em relação à epiderme do animal e deslocado, penteando os pelos e tocando a epiderme. Em seguida, o afastador foi retirado, os pelos apreendidos e o alicate puxado firmemente. Cada amostra de pelo coletada foi colocada em um saquinho plástico e avaliada quanto ao número de pelos da amostra (NPA), número de pelos por unidade de área (NP), comprimento médio dos pelos (CP), densidade de massa dos pelos (DM) e espessura do pelame

(EP), seguindo as metodologias citadas por Silva (2000).

Os dados das características de pelo e pelame foram transformados em $\log_{10}(n+1)$ e analisados pelo procedimento GLM do SAS, com modelo que incluiu o efeito de animal (GG) e GG. O teste de hipótese foi utilizado para testar o efeito de GG, que considerou o resíduo de animal (GG)

Foi realizado o teste de correlação de Pearson entre as seguintes medidas de pelo: número de pelos da amostra (NPA), número de pelos por unidade de área (NP), comprimento médio dos pelos (CP), densidade de massa dos pelos (DM) e espessura do pelame (EP).

3.7. Análise comportamental

Para a observação do comportamento de auto-limpeza, uma nova infestação artificial foi realizada na Fazenda Canchim, Embrapa Pecuária Sudeste, no mês de Janeiro de 2010. Foram escolhidos 24 animais do grupo de 45 bovinos, sendo 8 de cada grupo genético, Nelore, Senepol x Nelore (SN) e Angus x Nelore (TA), que foram aleatoriamente separados em dois grupos de manejo, compostos por 4 animais de cada grupo genético, manejados em piquetes de capim Tanzânia, adjacentes um ao outro, em área de aproximadamente 0,9 ha. A redução do tamanho amostral para apenas 24 animais foi necessária pois era o número máximo de animais em que era possível ser feita a avaliação do comportamento ao mesmo tempo. Esses bovinos foram novamente infestados com aproximadamente 20.000 larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e as observações foram iniciadas no dia 1 (dia de infestação com as larvas) e continuando nos dias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14 e 15 pós-infestação.

Os animais foram observados de forma direta, no período diurno (7:00 às 18:00 horas) com auxílio de binóculos pelo método de coleta no tempo. As anotações quanto a realização do comportamento de *grooming* foram feitas a cada 2 minutos. Foram anotados os seguintes comportamentos: mordendo ou lambendo, coçando ou esfregando uma parte do corpo; identificados o tipo de comportamento *alogrooming* (quando o animal coça outro animal ou *self-grooming* (quando o animal

faz o comportamento em si mesmo), quem fazia o comportamento, a região do corpo, o local no piquete (área de descanso ou piquete), a posição do animal (em pé ou deitado) e a hora. Os dados foram registrados e depois transferidos para planilhas.

As ocorrências dos eventos de grooming para as características *self-grooming* (S1), fazendo *allogrooming* (FA) e recebendo *allogrooming* (RA) e para o total dos eventos (TG) foram obtidas e somadas a cada hora de cada evento. Os dados foram transformados em $\log_{10}(n+1)$ e analisados pelo procedimento GLM do SAS. Este modelo incluiu os efeitos de grupo genético (GG), animal dentro de grupo genético, dia e hora dos eventos de *grooming* e suas interações. O teste de hipótese foi realizado para avaliar os efeitos de GG e dia, utilizando os resíduos de animal (GG) e interação GG*dia, respectivamente. O teste de Tukey ($p=0,05\%$) foi utilizado para as comparações múltiplas entre as médias dos efeitos GG, dia, hora e interações, sendo que, para GG e dia, foram utilizados para os ajustes das comparações entre as médias os mesmos resíduos utilizados para o teste de hipóteses. Foi realizado o teste de correlação de Pearson entre as medidas de grooming: self-grooming (S1), fazendo *allogrooming* em outro animal (FA) e recebendo *allogrooming* de outro animal (RA) com número de carrapatos transformado (CTT) e porcentagem de retorno de carrapatos (PRtrans), por grupo genético (GG). As análises de correlação foram realizadas pelo mesmo programa estatístico.

3.8. Extração de RNA

A extração de RNA total das 90 amostras de pele, 45 amostras pré-infestação e 24 horas após a última infestação, foi feita utilizando-se o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Os tecidos mantidos em freezer – 80 ° C foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, devidamente tratados para uso com RNA. Para cada 100 mg de tecido adicionou-se 1 mL do reagente TRIzol[®], que foi misturado pela utilização do vórtex e então incubado por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). A seguir, acrescentaram-se 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente com as mãos por 15 segundos e incubando a temperatura ambiente por mais 5 minutos.

Centrifugou-se a 10.000 g a 4 ° C por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um tubo de polipropileno limpo, adicionando-se 500 µL de isopropanol. O tubo foi agitado vigorosamente com as mãos e, então, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Passados os 10 minutos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% e homogeneizado em vórtex. Esse foi centrifugado a 9.000 rpm, por 5 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 15 minutos a temperatura ambiente, ressuscitado em 30 µL água e aquecido a 55 ° C por 10 minutos e, então, quantificado.

A concentração de RNA total das amostras foi avaliada em equipamento Nanodrop e a integridade foi avaliada por comparação de intensidade luminosa das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (20 µg/mL). As amostras com razão 260/280 nm acima de 1,8 foram consideradas puras. Procedeu-se nova purificação de 5 µg de RNA em coluna de sílica utilizando o kit RNeasy Mini® (Qiagen), para envio das amostras para realização do protocolo de análise de expressão em larga escala utilizando microarranjos *GeneChip bovine genome array* Affymetrix. O volume dos 5 µg de RNA total foram ajustados para 100 µL com água DEPC e 350 µL do tampão RT foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e, prosseguiu-se com a adição de 250 µL de etanol absoluto e homogeneização por pipetagem. Os 700 µL contendo essa mistura foram colocados em uma coluna de sílica *RNeasy Mini spin column*, a qual foi centrifugada por 15 segundos a 8.000 xg. O líquido foi descartado, e 500 µL do tampão RPE foram adicionados a coluna, que foi submetida a nova centrifugação por 15 segundos a 8.000 xg. Após, repetiu-se a adição de 500 µL do tampão RPE, centrifugando-se por 2 minutos a mesma velocidade. A coluna contendo o RNA foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL e centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto. Aproximadamente 15 µL de água DEPC foram adicionados a coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 8000 xg, obtendo-se então o RNA purificado no eluato.

3.9. Análise de expressão gênica em larga escala (Microarranjos)

A análise de expressão gênica em larga escala foi realizada em amostras de pele de 7 animais de cada um dos grupos genéticos estudados. Cada

animal continha uma amostra coletada antes da primeira infestação e outra coletada 24 horas após a última infestação. Para a escolha dos animais cujas amostras foram submetidas a essa hibridização, os dados referentes à contagem do número de carrapatos e avaliação da resistência foram analisados. Foram então escolhidas sete amostras, com base na média do número de carrapatos de cada grupo genético.

Foram utilizados os chips *Bovine Genome Array*, da plataforma Affymetrix, específicos para bovinos, que apresentam aproximadamente 23.000 transcritos, referentes a 19.000 genes. As hibridizações foram realizadas na empresa Molecular Core – AFIP, Laboratório de Microarrays, e acompanhadas pela autora, utilizando o protocolo de acordo com a sugestão do fabricante. Resumidamente, aproximadamente 2 µg de RNA total foram submetidos a transcrição reversa utilizando um primer promotor de oligo(dT) T7. Em seguida, foi realizada uma segunda síntese de cDNA mediada por RNase H, servindo de molde para uma reação de transcrição *in vitro*. Essa reação foi realizada na presença de RNA polimerase T7 e de um mix de ribonucleotídeos biotinilados para a síntese do RNA complementar (cRNA) e marcação com biotina. Esses cRNAs foram purificados, fragmentados e hibridizados contra os chips de expressão *Bovine Genome Array* (AFFYMETRIX, 2009) (Figura 6).

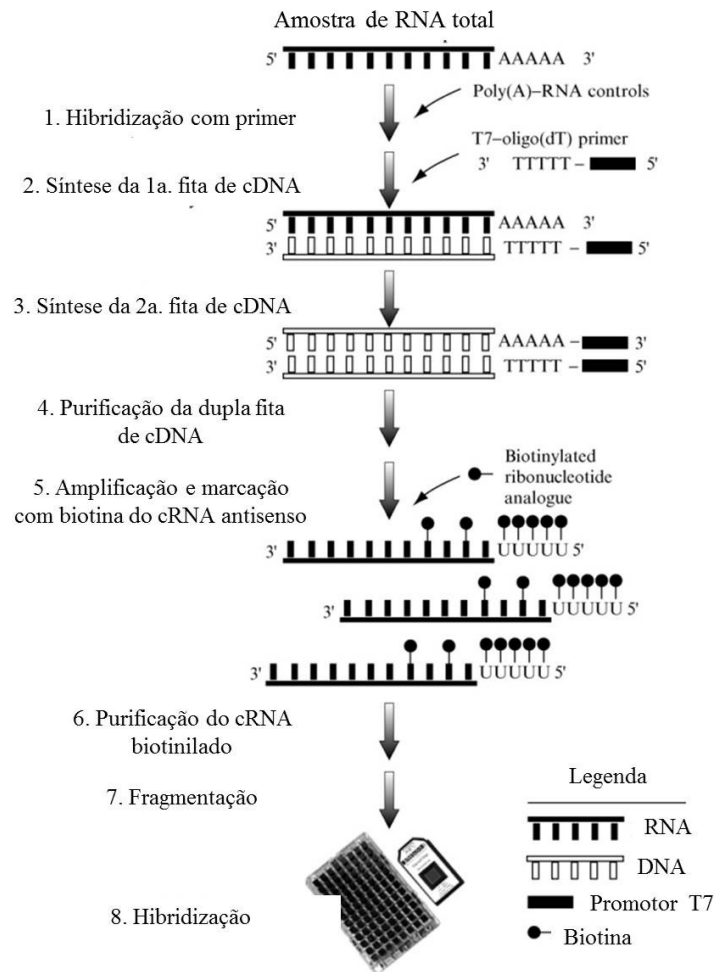


Figura 6. Preparação das amostras de RNA, utilizando o kit OneCycle análise de expressão genica utilizando Bovine GeneChip.

Os dados obtidos a partir das hibridizações foram submetidos ao controle de qualidade e ao pré-processamento (transformações, correção de background, sumarização) utilizando os pacotes Affy, AffyQCReport e RMA/EXPRESS, do R/Bioconductor. Os critérios de qualidade considerados foram: porcentagem de presentes, nível de background, fatores de escala para normalizar os dados, genes constitutivos, degradação do RNA e as estatísticas RLE (Log expressão relativa) e NUSE (erros-padrão não escalados normalizados).

Os dados foram analisados utilizando o procedimento R/maanova, aplicando um modelo linear misto considerando: $Y_{ijkl} = m + T_i + A_{j(i)} + G_k + TG_{ik} + e_{ijk}$, onde Y é o valor normalizado da intensidade ; A, T e G representam os efeitos

principais de arranjo, tratamento e gene; TG é o efeito de interação entre gene e tratamento; e_{ijk} é o erro aleatório, além dos testes F_S , teste de permutações (500) para obter valores críticos e p-valores para esses testes e FDR, que foi fixada em 5%.

O tratamento (T) neste experimento consistiu do grupo genético (GG) e tempo de coleta (TC). O efeito aleatório do animal (An) foi incluído para considerar as amostras pareadas no mesmo animal. Primeiro, um modelo com interação foi ajustado, em que TG foi decomposto em $TG_k = An * G_k + GG * G_k + TC * G_k + GG * RC * G_k$, para verificar se havia interação de grupo genético. Após, um modelo aditivo foi ajustado (removendo-se o termo $GG * CR * G_k$), em que TG é decomposto em $TG_k = An * G_k + GG * G_k + TC * G_k$, para obtenção dos genes diferencialmente expressos.

Após a obtenção dos genes diferencialmente expressos, a anotação dos genes foi feita utilizando o pacote do Bioconductor do R, referente à última anotação do genoma bovino 4.0 e as vias metabólicas obtidas no site Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Também foram construídos clusters hierárquicos das amostras e dos genes diferencialmente expressos (Fold change > 2), visando confirmar o agrupamento de amostras utilizado e identificar conjunto de genes com perfilhamento de expressão semelhante.

Finalmente, com o objetivo de identificar padrões (subconjuntos de genes e animais) associados com extremos de contagem de carrapatos, foi realizada uma análise de bicluster. Os dados de contagem de carrapatos transformados em $\log_{10}(n+1)$ e todos os genes que apresentaram expressão gênica diferencial, independente do *fold-change*, foram considerados. Nessa análise, a sonda AFFX-Bt_eIF-4E_3_at foi removida. Para análise, o método Fabia, disponível no Bioconductor/R, que implementa um modelo multiplicativo foi utilizado (HOCHREITER et al, 2010).

3.10. Validação dos genes por PCR em tempo real

Após a obtenção dos genes diferencialmente expressos pela técnica de microarranjos, 10 genes foram escolhidos para serem analisados por PCR em tempo real, com a finalidade de confirmar as diferenças encontradas pela técnica de microarranjos.

4.10.1. Escolha dos genes e desenho dos primers

Dos 10 genes elencados, cinco tiveram aumento da expressão evidenciado pela técnica de microarranjo e cinco tiveram redução da expressão após a infestação com o carrapato *R. microplus*. Foram eles: Ankirin 1 (ANKRD1), Aquaporin 5 (AQP5), Brain Ribonuclease (BRB), Chitinase 3 (CHI3L2), Chemokine 5 (CXCL5), Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13 (HSD17B13), Immunoglobulin heavy constant gamma (IGHG1), ISG15 ubiquitin-like modifier (ISG15), Peptidoglycan recognition protein 1 (PGLYRP1) e Serpin peptidase inhibitor (SERPINE2) (Tabela 1).

O desenho dos primers foi feito com base na análise das sequências específicas de bovinos disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), e utilizando-se a opção para desenhos de primers para qPCR do software *primer 3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER, et al. 2007). Cada primer foi desenhado sendo complementar a dois éxons adjacentes, com a finalidade de evitar a amplificação a partir de DNA. Após o desenho, a avaliação das sequências, temperatura de anelamento e presença de estruturas secundárias de cada primer foi realizada no software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com>) e também no software Beacon Design (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>).

Tabela 1. Primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase em tempo real.

Gene	Gene ID	Seqüência (5' → 3')	Tamanho (pb)	Éxon	Eficiência
ANKRD1	NM_00103	F- AGACCTCAATGCCAAAGACC	128 pb	E7	1
	4378.1	R - TCCCAGCACAGTTCTTAACG		E8	
				E9	
Aquaporin 5	NM_001191	F CCACCTAGTGGGGATCTACTTC	70 pb	E2	1
	160.1	R - GATCACTGAGGGACCGAAAG		E3	
BRB	NM_173891	F-	103	E1	1
	.2	ACTGCCTTCTTTCTCAGAGACC		E2	
		R - AGGACCAGCAGTGACAACAG			
CHI3L2	NW_001501	F - TGGGCTATGATGATGTGGAG	148 pb	E9	1
	822.2	R-		E10	
		ACAGCTTGAACAAGAGGGTAGG			
CXCL5	NM_174300	F	- 131 pb	E3	1
	.2	GAATGGAAGGGAAGTCTGTCTG		E4	
		R - TGCTGAAGAACTGGGCAAC			
HSD17B13	NM_001046	F-	152 pb	E5	1
	616.1	GAATATGGCCTGTGTTGGAGAC		E6	
		R - ATTTATGGCTGCCACAGCAC		E7	
IGHG1	NW_003100	F- TAAACACAGCCACGACGAAG	123 pb	NA	1
	065.1	R- TGTGGACCTTGCACTTGAAC			
ISG15	NM_174366	F - CAGCCAACCAGTGTCTGC	139 pb	E1	1
	.1	R-GAACTGCTTCAGCTCGGATAC		E2	
PGLYRP1	NM_174573	F - GGGCTACAATTTCTGATCG	125 pb	E1	1
	.2	R - AGTTGCCCATGAAGGAGATG		E2	
Serpine2	NM_174669	F -CGACATAATCCTACAGGTGCTG	82 pb	E8	1
	.2	R- GCTTTGCATGGTTCCTTCC		E9	

4.10.2. Reação de PCR em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em equipamento ABI SDS 7500 (Applied Biosystems). Para cada reação foram colocados 5 µL do reagente Power

Sybr Green Master Mix 2X (Fermentas), que contém todos os reagentes necessários para uma reação de qPCR, 0,16 μ M de cada primer e água ultra-pura para biologia molecular, para completar o volume de 9 μ L. Em cada poço da placa foram adicionados 9 μ L desta mistura e 1 μ L(10 ng) de cDNA, que para cada amostra, era colocada em duplicata.

As condições de termociclagem para todos os primers deste experimento foram: 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto para anelamento e extensão, seguido de curva de desnaturação, com acréscimo de temperatura de 60 a 95 °C em 15 minutos.

A confirmação da especificidade foi feita pela análise das curvas de dissociação da qPCR, que permite a diferenciação de produtos de PCR inespecíficos, no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems).

Para obter a eficiência de amplificação dos primers, os dados de aquisição de fluorescência a cada ciclo foram exportados do software ABI7500 SDS e então submetidos à análise no software LinRegPCR (RUIJTER et al. 2009), que utiliza regressão linear para estimar a eficiência das reações de PCR quantitativo em tempo real.

4.10.3. Escolha do Gene Constitutivo

Foram utilizados cinco genes constitutivos com a finalidade de escolher o gene constitutivo mais estável para esse experimento. Os genes testados foram: GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), RPL-19 (proteína ribossomal 19), RPL-27 (proteína ribossomal 27), RPS-9 (proteína ribossomal S9) e YWHAZ (tirosina 3-monoxigenase) (Tabela 2).

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de qPCR (genes constitutivos).

Gene	GeneID	Seqüência do Primer	Tamanho (pb)	Éxon
RPS9	gi 155372028 ref	F - GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA	108	E2
	NM_001101152.1	R - TCTGTTCGAAGGTAATGCCC		E3
RPL19	gi 94966830 ref N	F - ACCTGGATGAGGAGGATGAG	92	E2
	M_001040516.1	R - GTACAGGCTGTGATACATGTGG		E3
RPL27	gi 77404274 ref N	F - TTCTGCTGTAGTCCCAAGTG	128	E1
	M_001034051.1	R - GCCGTCATCAATGTTCTTC		E2
YWHAZ	gi 31341044 ref N	F – GAACTCCCCTGAGAAAGCCT	146	E4
	M_174814.2	R – CCGATGTCCACAATGTCAAG		E5
GAPDH*		F- GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA R- CCCTCCACGATGCCAAAGT	121	

*Os primers para o gene GAPDH foram sintetizados a partir do artigo de Zaros et al, 2007

Para as análises de qPCR foram escolhidas aleatoriamente 21 amostras de animais antes e 21 amostras de animais depois da infestação. Os valores de Ct de cada gene para cada grupo experimental foram obtidos e submetidos à análise estatística descritiva, para obtenção de médias, desvio padrão e erro padrão. Com o objetivo de observar diferenças na expressão gênica entre os grupos experimentais, o teste não paramétrico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation test* foi aplicado.

Os programas *Genorm*, *Normfinder* e *Bestkeeper*, específicos para detecção da estabilidade de genes constitutivos, também foram utilizados para verificar qual o melhor gene constitutivo a ser escolhido neste trabalho.

4.10.5. Quantificação relativa por PCR em tempo real

Para verificar as diferenças no nível de expressão gênica entre os grupos estudados, optou-se pelo método de quantificação relativa (Pfaffl, 2001). Este método é baseado na quantificação dos transcritos do gene de interesse em relação a um gene constitutivo, denominado referência.

A razão de expressão relativa é baseada na eficiência de amplificação e na variação do C_t do grupo desafiado, em relação ao grupo controle. A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa:

$$Raz\tilde{a}o = \frac{\left(E_{gene\ alvo}\right)^{C_t\ gene\ alvo(Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}{\left(E_{gene\ refer\tilde{e}ncia}\right)^{C_t\ gene\ refer\tilde{e}ncia(Media\ do\ grupo\ controle - Media\ do\ grupo\ desafiado)}}$$

em que:

$E_{gene\ alvo}$ = eficiência de amplificação do gene alvo

$E_{gene\ refer\tilde{e}ncia}$ = eficiência de amplificação do gene refer\tilde{e}ncia

C_t = Ciclo de início da detecção do produto amplificado

Para o cálculo dessa razão para cada gene, foi utilizado um software desenvolvido por Pfaffl et al. (2002), denominado *Relative Expression Software Tool* (REST)©.

A signific\tilde{a}ncia das diferen\tilde{c}as de quantificação do mRNA dos genes estudados, entre os grupos experimentais, foi avaliada em uma análise não-paramétrica, utilizando o REST® 2009, que testa a signific\tilde{a}ncia das diferen\tilde{c}as de C_t por um teste denominado *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*®. Em todas as análises estatísticas, a signific\tilde{a}ncia considerada foi $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Contagem de carrapatos

Foi encontrado efeito significativo para grupo genético ($p < 0,05$) para contagem total do número de carrapatos (CTT) (Tabela 3.). Médias e erros padrões dos dados não transformados (TC) para NX, SN, e TA foram, respectivamente, $1,71 \pm 1,27$; $1,91 \pm 1,32$ e $11,37 \pm 1,27$ (Figura 7). Resultados similares foram observados para porcentagem de retorno transformada (PRtrans) (Tabela 3). Foi observada interação ($p < 0,05$) entre grupo genético e infestação para CTT e PRtrans (Figura 7).

Tabela 3. Médias estimadas para porcentagem de retorno transformada (PRtrans) e $\log_{10}(n+1)$ da contagem do número de carrapatos (CTT), e de acordo com grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore and TA-Angus x Nelore) e infestação.

Grupo Genético*	CTT				
	Infestação*				Média Geral
	1	2	3	4	
NX (n=15)	0,18±0,08	0,19±0,08	0,33±0,08	0,42±0,08	0,28±0,07 ^A
SN (n=15)	0,18±0,08	0,28±0,08	0,42±0,08	0,58±0,08	0,36±0,07 ^A
TA (n=15)	0,63±0,08	0,77±0,08	1,08±0,08	1,22±0,08	0,92±0,07 ^B
Média Geral	0,33±0,05 ^a	0,41±0,05 ^b	0,61±0,05 ^c	0,64±0,05 ^d	1,08
Grupo Genético	PRtrans				
	Infestação				Média Geral
	1	2	3	4	
NX (n=15)	0,36±0,05	0,39±0,05	0,55±0,05	0,65±0,05	0,49±0,04 ^A
SN (n=15)	0,45±0,05	0,51±0,05	0,69±0,05	0,82±0,05	0,62±0,04 ^A
TA (n=15)	0,79±0,06	0,86±0,06	1,09±0,06	1,22±0,06	0,99±0,05 ^B
Média Geral	0,53±0,03 ^a	0,59±0,03 ^a	0,77±0,03 ^b	0,90±0,03 ^c	0,7

*Letras maiúsculas na mesma coluna diferem por grupo genético e letras minúsculas na mesma linha diferem por infestação ($p \leq 0,05$).

Nos três grupos genéticos estudados, as contagens do número de carrapatos aumentaram de acordo com o número da infestação (Tabela 3). Isso pode ser explicado pois, apesar de ser um experimento com infestação artificial, os

animais podem ter sido infestados naturalmente nas pastagens, influenciando a contagem de carrapatos, como já relatado por Silva et. al. (2007).

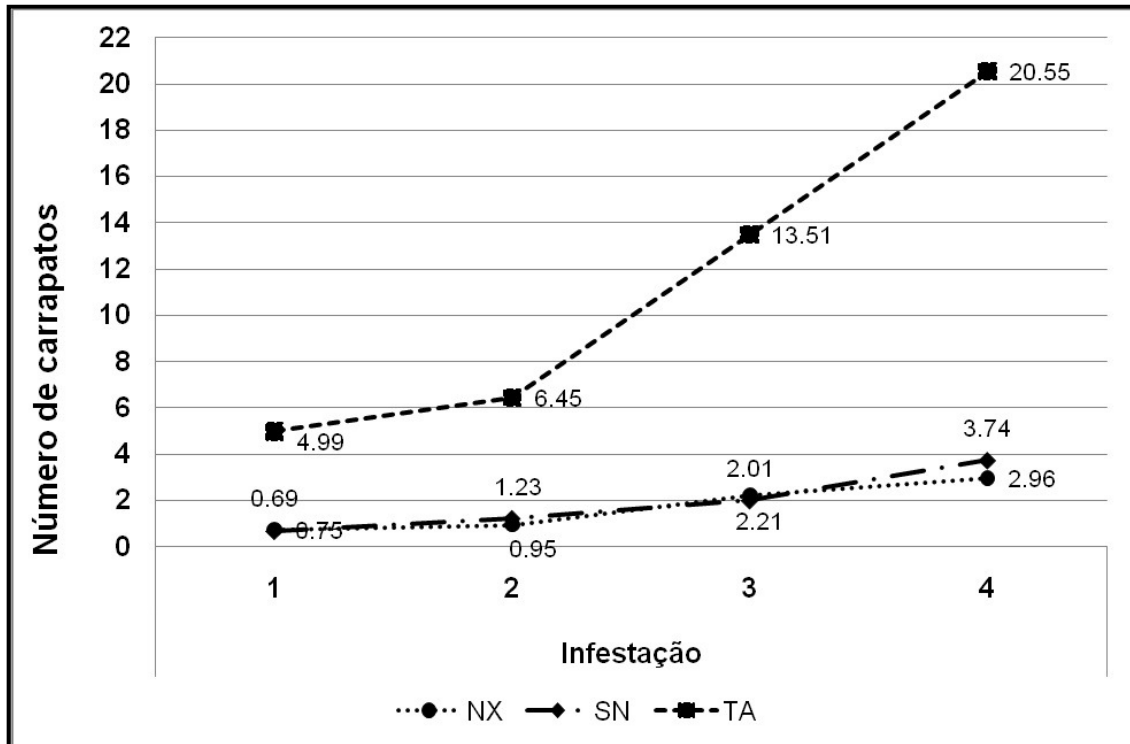


Figura 7. Média do número de carrapatos de acordo com cada infestação e grupo genético.

O cruzamento de raças zebuínas com europeias é uma estratégia que visa melhorar a produção e ao mesmo tempo, aumentar a resistência a parasitoses, e tem sido amplamente utilizada em países como a Austrália (SUTHERST;UTECH, 1981). Essa estratégia tem atraído muito interesse de produtores brasileiros com o objetivo de aumentar a eficiência de seus rebanhos. Jonsson (2006) verificou menores quantidades de carrapatos em animais *Bos taurus* x *Bos indicus* quando comparados com as raças puras de *Bos taurus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Utech e Wharton (1982) e Silva et. al. (2007), que obtiveram médias semelhantes de carrapatos ao observado neste trabalho.

Nesse trabalho, a variação da resistência de um grupo genético Nelore puro e de cruzados Senepol x Nelore e Angus x Nelore foram avaliadas. Os animais do grupo NX apresentaram baixas contagens de carrapatos, podendo ser considerados resistentes (Figura 7). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre NX e SN, sendo então considerados como de igual resistência ao

carrapato. Ambos os grupos genéticos apresentaram menores contagens que o grupo TA. A raça Nelore tem sido identificada como mais resistente aos carrapatos, quando comparada às raças européias, tanto em estudos com infestação natural quanto artificial (SILVA et al., 2007; 2010). No entanto, se for considerada a classificação de Utech et al. (1978), apesar das diferenças entre NX e SN em relação a TA, os três grupos genéticos estudados podem ser considerados de alto nível de resistência, pois segundo esse autor, quando há uma taxa de mais de 98% de mortalidade de carrapatos, os animais já podem ser considerados resistentes. Esses índices podem provavelmente indicar que a resistência ao carrapato seja uma característica dominante, fazendo com que os animais cruzados tenham fenótipo semelhante ao do parental mais resistente. Foi possível observar que a média do grupo genético SN não diferiu do grupo NX tanto em contagem de carrapatos, quanto na porcentagem de retorno (Tabela 3). Animais da raça Senepol são muito pouco estudados no Brasil, e apesar de ser uma raça do grupo *Bos taurus*, é altamente resistente a diversas parasitoses, como helmintoses e tripanossomíases (MATTIOLI et al., 1993; Oliveira et. al., 2009). Além disso, animais Senepol são altamente tolerantes ao calor (HAMMOND;OLSON, 1994; RIBEIRO et al., 2009). Neste trabalho, pela primeira vez, foi possível observar que animais cruzados Senepol x Nelore podem ser tão resistentes ao carrapato *Rhipicephalus microplus* quanto à raça Nelore pura. Essas características fazem desse grupo genético uma boa alternativa para aumentar a produção em países tropicais, como o Brasil, pois já são conhecidos pela boa produtividade e qualidade, sem perder em adaptação aos trópicos quando comparados ao Nelore puro.

4.2. Análises histológicas

Na contagem diferencial de leucócitos do sangue, animais TA tiveram maiores quantidades de monócitos que NX ($P < 0,05$), que não diferiram de SN, que tiveram menores valores de eosinófilos quando comparados com TA e NX. Não houve diferença significativa entre os grupos genéticos para os outros leucócitos avaliados (Tabela 4). Para basófilos, apenas 2 animais entre os 45 estudados apresentaram uma célula cada um.

Tabela 4. Estimativa das médias de leucócitos sanguíneos transformadas em $\log_{10}(n+1)$, para acordo cada grupo genético (Nelore - NX, Senepol x Nelore, SN e Angus x Nelore - TA).

GG	Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo
NX	1,44±0,21 ^a	1,72±0,07 ^a	1,15±0,23 ^a	0,53±0,34 ^a
SN	1,37±0,24 ^a	1,65±0,25 ^a	1,26±0,13 ^a	0,47±0,22 ^b
TA	1,32±0,25 ^a	1,67±0,14 ^a	1,34±0,24 ^b	0,62±0,22 ^a

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si (P<0,05).

Dados de contagem diferencial em bovinos infestados com carrapatos são escassos na literatura. No entanto, com cachorros e suínos, Szabo et. al, (2003) não observaram diferenças para a maioria dos leucócitos que eles avaliaram, corroborando os dados encontrados neste trabalho. Entretanto, aqueles autores encontraram aumento de basófilos em animais infestados, diferenciando do que foi observado nesse estudo, em que só foram observadas duas destas células entre todas as lâminas analisadas.

A partir da análise geral das lâminas de histopatologia, foi possível observar que os três grupos genéticos apresentaram apenas inflamação rara ou raríssima concentrada na derme superficial (Figura 8).

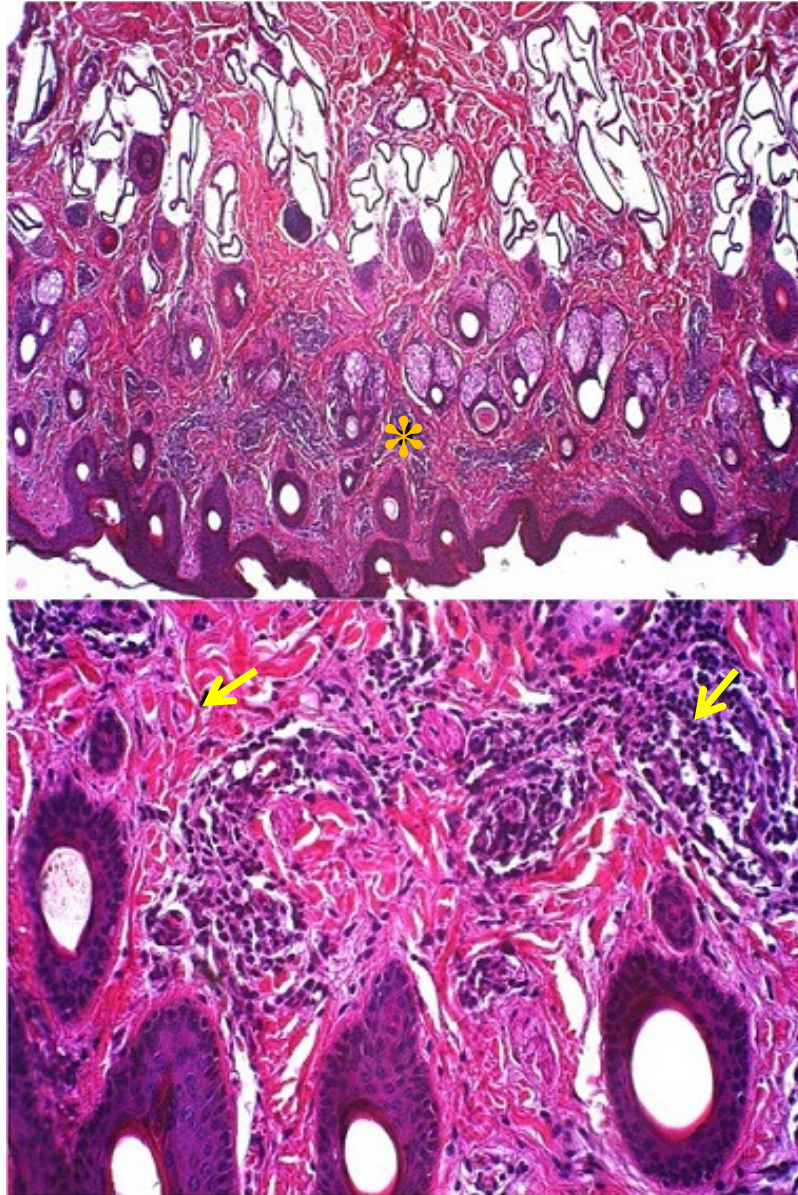


Figura 8. Fotomicrografia da pele de bovinos desafiados artificialmente com larvas de *Rhipicephalus microplus*. (A) Intensidade do processo inflamatório (*) na derme superficial (Obj. 10x). (B) Os linfócitos foram o tipo celular predominante (setas, Obj. 40x). Hematoxilina e eosina.

Foi possível perceber que houve predominância de linfócitos em relação aos outros tipos celulares, provavelmente devido aos animais já terem tido contato prévio com o carrapato. Além dos linfócitos, a presença de mastócitos (Figura 9), raros eosinófilos e neutrófilos foi observada. No entanto, diferente do encontrado por Piper et. al (2010), não foi possível notar uma resposta cutânea exacerbada nas amostras dos animais utilizados nesse experimento. Isso ocorre provavelmente pelo nível de resistência dos animais cruzados ser maior quando, comparados a animais da raça Holandesa utilizados no estudo de Piper et al.

(2010). Esses dados são corroborados pela classificação dos animais do presente experimento como resistentes, de acordo com Utech et al. (1978).

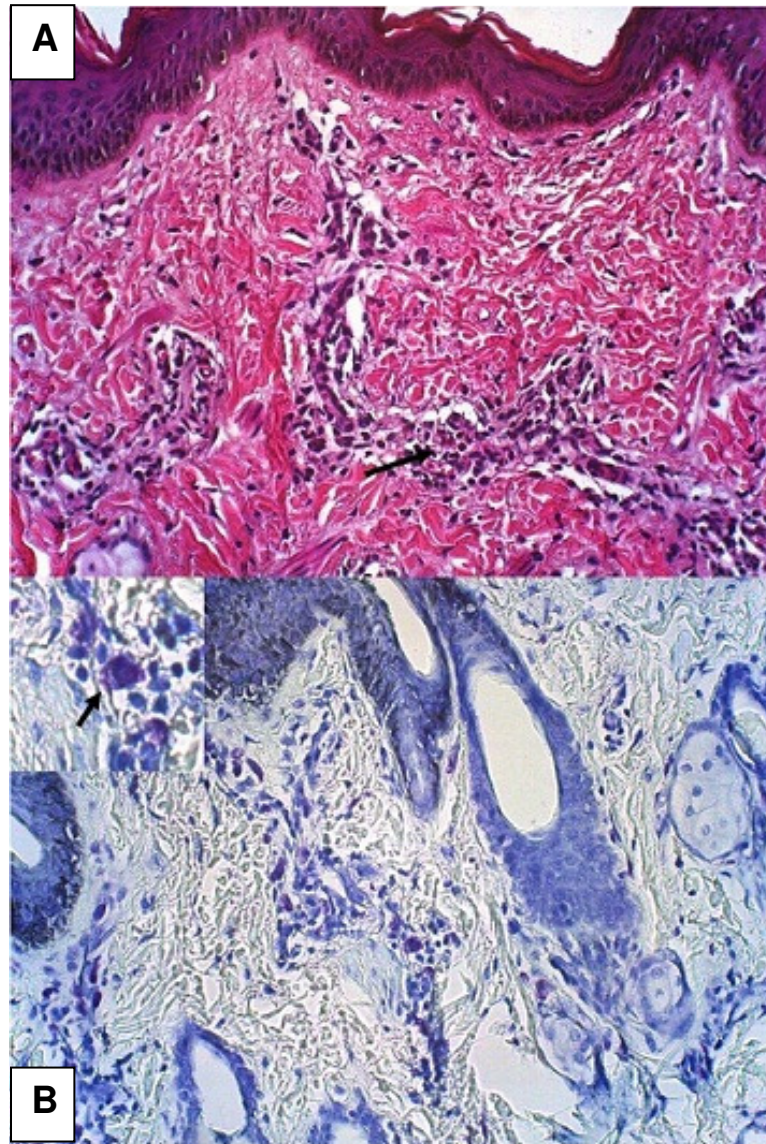


Figura 9. Fotomicrografia da pele de bovino desafiado artificialmente com larvas de *Rhipicephalus microplus*. (A) Os eosinófilos também foram observados no infiltrado inflamatório (seta, Obj. 40x, Hematoxilina e eosina, NX). (B) Os mastócitos foram observados associados aos linfócitos e eosinófilos (setas, Azul de Toluidina, Obj. 40x).

O grupo genético NX teve maiores médias de mastócitos que SN e TA ($P < 0.01$) (Tabela 5). Como verificado nesse trabalho, Veríssimo et. al. (2008), comparando bovinos das raças Nelore, Gir, Holandês, Jersey e cruzados, encontraram contagens de mastócitos maiores em Nelore quando comparadas as

outras raças estudadas, especialmente na derme superficial. O mesmo perfil foi encontrado em Brahman comparado com Holandês (Piper et. al., 2010).

Tabela 5. Estimativa das médias do número de mastócitos na pele de acordo com o grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA - Angus x Nelore)

Efeito		Média	Erro Padrão
Grupo Genético	NX	14,7 ^a	0,89
	SN	10,5 ^b	0,89
	TA	10,6 ^b	0,89

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si (P<0,05).

O grupo genético NX apresentou também maiores médias de contagens de linfócitos TCD4 quando comparado ao grupo TA (Tabela 6). Para as outras comparações (TA x SN e SN x NX) não foram encontradas diferenças significativas. Não houve diferenças para a contagem de linfócitos TCD8 entre os grupos genéticos estudados (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa das médias do número de linfócitos TCD4 e TCD8 na pele de acordo com o grupo genético (NX– Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA-Angus x Nelore)

Efeito		Média	Erro Padrão
CD4			
Grupo Genético	NX	0,33 ^a	0,066
	SN	0,21 ^{ab}	0,059
	TA	0,09 ^b	0,056
CD8			
Grupo Genético	NX	0,45 ^a	0,10
	SN	0,57 ^a	0,10
	TA	0,62 ^a	0,09

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si (P<0,05).

Estudos avaliando a resposta cutânea de bovinos ao carrapato são escassos na literatura. No entanto, resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram obtidos em um estudo comparando as raças Brahman e Holandesa (CONSTANTINIOU et al., 2010), em que animais resistentes apresentaram mais linfócitos TCD4 e TCD8 que animais da raça Holandesa. Essa resposta celular

eficaz em raças resistentes pode ser a grande diferença desses animais em resposta ao carrapato. Entretanto, em nosso estudo, não foi observado diferença no número de células TCD8, divergindo dos dados disponíveis na literatura (BITTAR et al., 2004; CONSTANTINIOU et al., 2010). Dessa maneira, pode-se dizer que a presença de linfócitos TCD4 e dos mastócitos, em bovinos contribui para a redução do número de carrapatos em animais NX.

4.3. Análises de características do pelo e pelame

Nas análises de pelo e pelame, o grupo genético TA apresentou maiores valores de comprimento de pelo médio e densidade da amostra (DM) que SN e NX ($p < 0,05$), que não diferiram entre si (Tabela 7).

Já para as características de número de pelos por amostra e densidade de massa de pelos, o grupo genético NX apresentou as maiores quantidades de pelo ($p < 0,05$) que SN e TA, que não diferiram entre si (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativa das médias das características transformadas em $\log_{10}(n+1)$ do comprimento médio dos pelos (CP, mm), espessura do pelame (EP, mm), número de pelos/cm² (NPA, pelos/cm²), número de pelos por amostra (NP, pelos) e densidade de massa dos pelos (DM, g/cm²), de acordo com o grupo genético (NX – Nelore, SN – Senepol x Nelore e TA-Angus x Nelore)

Grupo Genético	CP (mm)	EP (mm)	NP (pelos)	NPA (pelos/cm ²)	DM (g/cm ²)
NX	9,91±0,56 ^a	0,42±0,048 ^a	190±13,44 ^a	1463±103 ^a	0,0022±0,0002 ^a
SN	11,14±0,58 ^a	0,30±0,05 ^a	139±13,9 ^b	1071±107 ^b	0,0020±0,0002 ^a
TA	15,27±0,56 ^b	0,46±0,048 ^a	176±13,44 ^b	1353±103 ^b	0,0029±0,0002 ^b

^{a,b} Médias com letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$).

As características de pelo e pelame, assim como a coloração da pele do animal, podem estar relacionadas à manutenção do carrapato no hospedeiro (O'KELLY;SPIERS, 1983). No entanto, essas características têm sido muito pouco exploradas. Neste trabalho, foi possível observar que TA, o grupo com maior número de carrapatos, apresentou maiores comprimentos de pelo e densidade da amostra que NX e SN (Tabela 7), o que explicaria parcialmente a manutenção dos carrapatos nos bovinos (O'KELLY;SPIERS, 1983). Spickett et al. (1989) e Veríssimo et al.

(2002) concluíram que animais com pelos mais compridos apresentavam contagens de carrapatos maiores. Já o grupo SN teve a menor espessura do pelame e número de pelos por amostra, quando comparado aos outros grupos estudados. Essas características já foram relacionadas à sua adaptação ao estresse térmico (RIBEIRO et al., 2009) e podem estar ligadas às baixas contagens de carrapatos observadas neste grupo genético (FRAGA et al., 2005).

As análises de correlação, no entanto, mostraram que as características que poderiam influenciar a resistência dos bovinos aos carrapatos variam de acordo com o grupo genético. No grupo NX houve uma tendência de animais com maiores quantidades de pelos, apresentarem infestações mais severas (Tabela 8), como encontrado por Veríssimo et al. (2002).

O grupo SN apresentou tanto espessura do pelame (EP) quanto densidade de massa (DM) correlacionadas positivamente com a infestação por carrapatos (Tabela 8). Animais com menor espessura de pelame e menor pesos de amostra, tendem a ser menos infestados. Acredita-se que bovinos com pelos compridos e EP maiores apresentem um microclima mais favorável ao parasitismo pelos carrapatos (FRAGA et al., 2005). Além disso, como essas características favorecem a diminuição do estresse térmico, podem influenciar indiretamente a resistência aos carrapatos. Quando em estresse térmico, os níveis de glicocorticóides na corrente sanguínea dos animais podem aumentar, afetando a resposta antiinflamatória e antialérgica e podendo favorecer a presença do carrapato no bovino (FRAGA et al., 2005).

Neste estudo, embora o grupo TA tenha apresentado maiores quantidades de pelos e pelos mais compridos que os outros grupos, não houve correlação entre essas características e o número de carrapatos dentro do grupo genético. Esses resultados diferem dos dados da literatura, já que em outros estudos com bovinos de origem europeia e cruzados foi encontrada correlação positiva entre pelame e número de carrapatos (O'KELLY;SPIERS, 1983; SPICKETT et al. 1989). A ausência de correlação encontrada neste trabalho, pode estar relacionada à variação dos dados obtidos. Os resultados da correlação de Pearson também indicaram que, em geral, as características comprimento de pelo médio e densidade da amostra têm correlação positiva com o número de carrapatos no animal, ou seja, bovinos com mais pelos e maiores, tendem a apresentar uma maior contagem de carrapatos. Resultados semelhantes para comprimento do pelo foram

encontrados em gado Gyr (VERÍSSIMO et. al., 2002) e para Hereford e Bonsmara (SPIKETT et. al. 1989). Entretanto, nesse trabalho não foi encontrada correlação com espessura do pelame, como descrito pelos autores acima. Quando a correlação é feita por grupo genético, o que pode ser evidenciado foi que a variação de NP e NPA têm grande influência nos animais da raça Nelore (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação de Pearson obtida entre as medidas de pelo e pelame, comprimento de pelo médio (CP), espessura do pelame (EP), número de pelos (NP), número de pelos por amostra (NPA), densidade da amostra (DM) e número de carrapatos transformados CTT, considerando todos os grupos genéticos e por grupo. Os valores indicam a coeficiente de correlação.

	Todos os GG	NX	SN	TA
	CTT	CTT	CTT	CTT
CP	0,455**	0,169	0,23	0,240
EP	0,191	0,221	0,280	-0,050
NP	0,180	0,57*	0,04	-0,25
NPA	0,180	0,57*	0,10	-0,35
DM	0,344*	0,15	0,44	-0,21

*P<0,05; **P<0,01

4.4. *Análise de comportamento*

Houve diferença na contagem total de carrapatos (CTT) entre os três grupos genéticos estudados ($p < 0,05$) e na porcentagem de retorno transformada (PRtrans), sendo que Angus x Nelore obtiveram as maiores médias, 1,58 e 0,48, Senepol x Nelore, 1,05 e 0,36 e Nelore 0,64 e 0,24, respectivamente. Esses dados diferem dos já discutidos acima, e tais diferenças podem ser decorrentes de variações ambientais no período da infestação dos animais, além de variação amostral, por terem sido utilizados apenas 24 animais, número máximo possível para as análises de comportamento.

Tabela 9. Estimativa das médias do número de carrapatos transformados em $\log_{10}(n+1)$ (CTT) e porcentagem de retorno transformada (PRtrans) para os 24 animais analisados no experimento de comportamento.

Grupo Genético	CTT	PRtrans
NX	0,64±0,23 ^a	0,24±0,06 ^a
SN	1,05±0,23 ^{ab}	0,36±0,06 ^{ab}
TA	1,58±0,23 ^b	0,48±0,06 ^b

Foram observados os comportamentos de grooming ou auto-limpeza: self-grooming (S1), quando o animal se coça sozinho; fazendo allo-grooming (FA), recebendo allo-grooming (RA) e o total de grooming (TG). Não foi possível observar diferença estatística para nenhuma das características avaliadas S1, FA, RA e TG (Tabela 10), evidenciando que a frequência de grooming foi similar para os três grupos genéticos avaliados.

Tabela 10. Estimativa das médias dos eventos de auto-limpeza, self-grooming (S1), fazendo allogrooming (FA), recebendo allogrooming (RA) e o total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$

Grupo Genético	S1	FA	RA	Total
NX	0,28±0,03 ^a	0,013±0,0002 ^a	0,03±0,009 ^a	0,29±0,03 ^a
SN	0,24±0,03 ^a	0,009±0,0002 ^a	0,02±0,009 ^a	0,25±0,03 ^a
TA	0,29±0,03 ^a	0,006±0,0002 ^a	0,02±0,009 ^a	0,29±0,03 ^a

Foram observadas diferenças significativas entre os dias e horas analisados, sendo que os dias 1, 4, 5 e 6 (Figura 10a) e os horários 7:00 – 8:00, 9:00 – 10:00 e 12:00 – 13:00 horas (Figura 10b) tiveram maiores frequências de *grooming* quando comparados aos outros dias e horas analisados ($p < 0,01$).

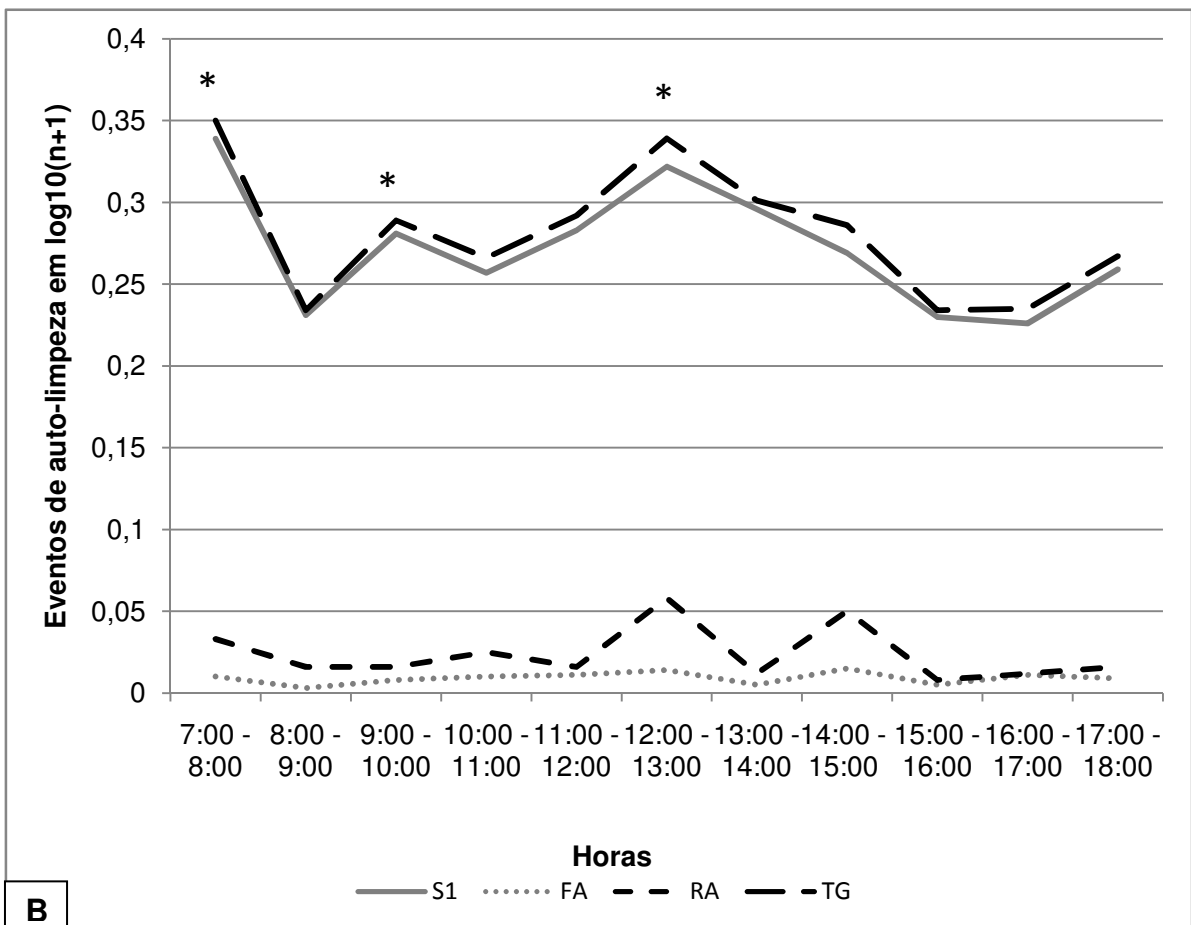
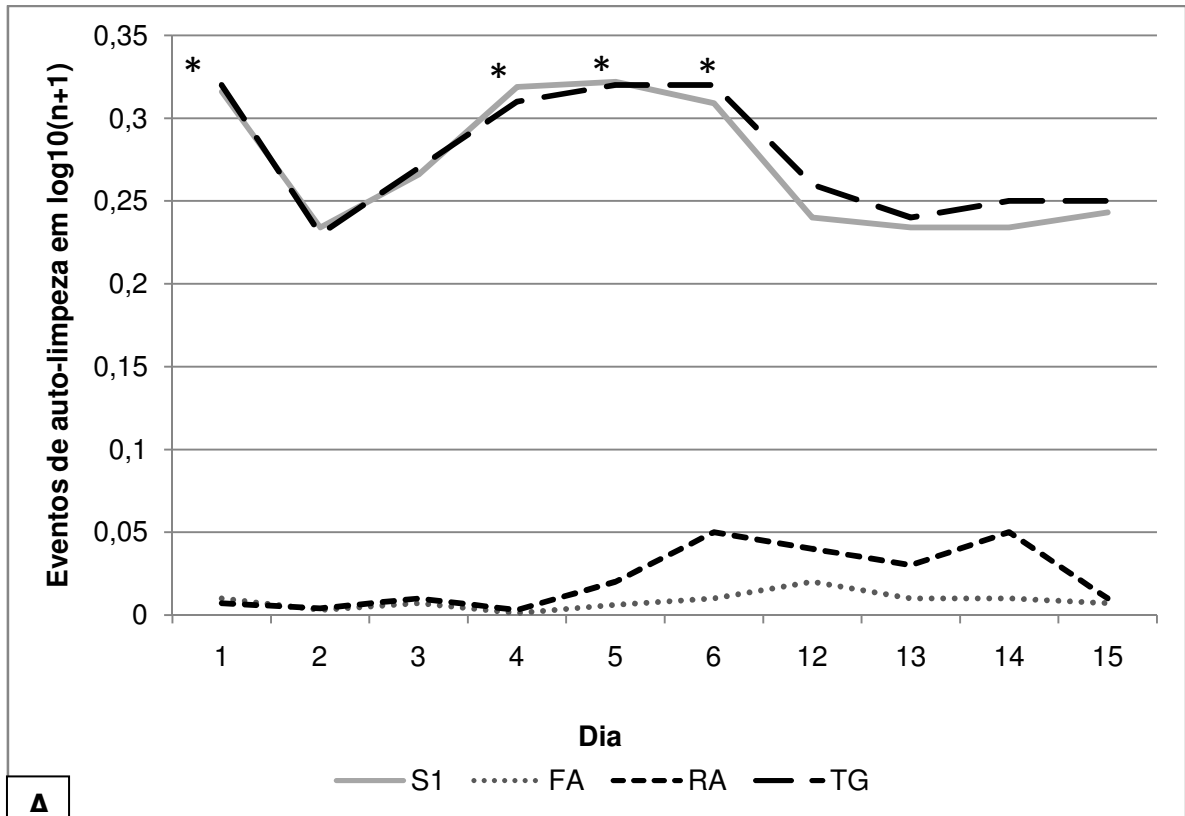


Figura 10. Eventos de auto-limpeza, self-grooming (S1), fazendo allogrooming (FA), recebendo allogrooming (RA) e o total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$ distribuídos ao longo dos 10 dias de

análise após infestação com carrapato (Figura 10a) e de acordo com os horários do dia (Figura 10b).

Pode-se verificar que houve diferenças para cada um dos grupos estudados em relação aos dias analisados. SN realizou a maioria da auto-limpeza no dia 1, e a partir do dia 2 sua frequência foi menor até o fim do experimento quando comparados com NX e TA. Exceto pelo dia 1, que a frequência de NX foi mais baixa que SN, o grupo NX realizou mais grooming que TA e SN até o dia 4. Após o dia 4, o grupo TA aumentou a quantidade de auto-limpeza, sendo maior que NX nos últimos dias do experimento (Figura 11). Esse padrão de grooming foi interessante, pois os dois grupos genéticos mais resistentes apresentaram alta frequência de grooming no início da infestação. Já para o grupo TA, observou-se que os animais aumentaram a frequência a partir do dia 4.

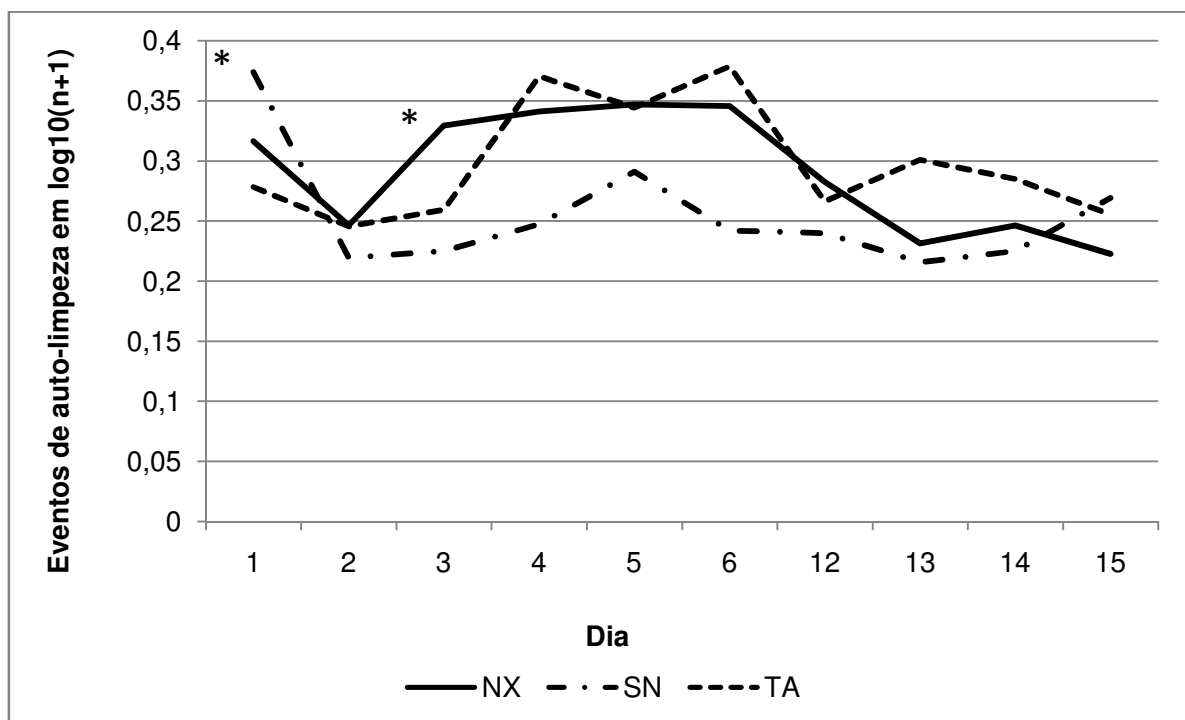


Figura 11. Eventos de auto-limpeza total (TG) transformados em $\log_{10}(n+1)$ de acordo com o grupo genético durante os dias análise após infestação com carrapato (Nelore - NX, Senepol x Nelore - SN e Angus x Nelore - TA).

Quanto à correlação de Pearson, observou-se uma correlação negativa ($p < 0,05$) com os eventos de *grooming* tanto para CTT quanto para PRtrans, indicando que animais que realizam maiores frequências de *grooming* apresentam menores contagens de carrapato. Quando se considera o GG, observa-se que para

o grupo Nelore a correlação negativa é significativa para as medidas, S1, FA e TG enquanto que para Senepol x Nelore e Angus x Nelore, a correlação não foi significativa (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação de Pearson obtida entre comportamentos de *grooming* self-grooming (S1), fazendo allo-grooming (FA), recebendo allo-grooming (RA) e *grooming* total (TG) e porcentagem de retorno transformada (PRtrans) e contagem total de carrapatos (CTT). Os valores indicam a coeficiente de correlação e, entre parênteses, o valor de P.

Observações	Todos os GG		NX		SN		TA	
	CTT	PRtrans	CTT	PRtrans	CTT	PRtrans	CTT	PRtrans
	TG	-0,45 (0,02)	-0,46 (0,02)	-0,85 0,01	-0,85 (0,007)	-0,58 (0,12)	-0,57 (0,13)	-0,28 (0,48)
S1	-0,42 (0,04)	-0,42 (0,03)	-0,82 0,01	-0,82 (0,01)	-0,53 (0,17)	-0,52 (0,18)	-0,3 (0,46)	-0,25 (0,54)
FA	-0,55 (0,05)	-0,55 (0,004)	-0,62 0,09	-0,67 (0,06)	-0,72 (0,04)	-0,7 (0,05)	-0,012 (0,97)	0,02 (0,94)
RA	-0,22 (0,28)	-0,22 (0,29)	-0,46 0,24	-0,43 (0,28)	-0,23 (0,58)	-0,22 (0,59)	-0,04 (0,91)	-0,03 (0,92)

O comportamento de grooming é definido por todas as formas de limpeza da superfície corpórea e as atividades com ela envolvidas, sendo importantes para a sobrevivência e o bem-estar dos animais (MOORING; BLUMSTEIN; STONER, 2004). Ele pode ser dividido em self-grooming, quando o animal realiza a auto-limpeza nele mesmo ou allogrooming, quando o animal faz ou recebe tal comportamento de outro animal (HART; PRYOR, 2004; SATO; TARUMIZU; HATAE, 1993). A eficiência do self-grooming tem sido associada a remoção de parasitas em diversas espécies, como gato doméstico, cabras, antílopes e bovinos (ECKSTEIN; HART, 2000; BENNET, 1969; KOCH, 1988; MOORING et al, 1996). Já o allogrooming deve ter um efeito de limpeza e remoção de parasitas, mas pode estar também relacionado aos fatores sociais do grupo em que os animais estão inseridos (SATO; TARUMIZU; HATAE, 1993). Entretanto, em bovinos, esses comportamentos têm sido pouco explorados.

Os dados encontrados neste trabalho evidenciam que o *grooming* é um

fator importante na redução de infestações por carrapatos, corroborando os dados de De Castro (1985) e Mooring et. al. (2006), que mostraram que bovinos infestados com carrapatos gastam maior tempo fazendo auto-limpeza do que animais livres de ectoparasitas. Esse deve ser um mecanismo que atua em resposta à estimulação cutânea realizada pelo carrapato (MOORING et. al., 2006), muitas vezes relacionadas ao aumento de histamina no local de fixação dos carrapatos (BENNET, 1969). Foi observado que as médias de frequências de grooming não diferiram entre os grupos genéticos (Tabela 10), no entanto, houve diferenças no padrão da realização desses comportamentos. Como observado na Figura 11, os animais NX e SN realizaram esses comportamentos mais intensamente nos primeiros dias da infestação, enquanto, que os animais TA, tiveram a frequência aumentada após o dia 4 de análise. Já foi descrito que a maior eliminação das larvas ocorre nas primeiras 24 horas após a infestação dos bovinos (ROBERTS, 1968). Neste trabalho, observamos que os grupos NX e SN, que fizeram mais grooming no início da infestação (Figura 11), também tiveram menos carrapatos nas contagens no final do experimento (Tabela 9), evidenciando a importância da remoção das larvas ainda no início da infestação. Esses dados são confirmados pela análise de correlação (Tabela 11), em que apesar de, considerando todos os grupos genéticos, o comportamento estar relacionado ao menor número de carrapatos, é no grupo NX que essa diferença pode ser claramente observada, corroborando os dados encontrados por Bennet (1969), Willadsen (1980) e de CASTRO (1985). Além disso, os animais NX também apresentaram maior quantidade de mastócitos na derme (Tabela 5), o que pode ter produzido sensação de prurido mais intenso no início da infestação, provavelmente devido a maior liberação de histamina em relação aos outros grupos.

4.5. *Análise de expressão gênica*

Para que os dados de análise de expressão gênica em larga escala pudessem ser discutidos, foi necessária a validação dos dados por uma segunda técnica. Nesse trabalho, optou-se por validar o experimento de microarranjos pela técnica de PCR quantitativo. Após a obtenção dos dados de microarranjos, um experimento para escolha de um gene constitutivo estável foi realizado (Item 5.5.1). Após a escolha desse gene, prosseguiu-se com os experimentos de PCR em tempo

real (Item 5.5.2)

4.5.1. Escolha do gene constitutivo para validação do experimento de microarranjos

A normalização dos dados utilizando genes constitutivos é um dos fatores mais importantes em estudos quantitativos de expressão gênica. Esses genes são caracterizados por apresentar expressão gênica constante no organismo dos indivíduos, pois exercem função na maquinaria basal das células (HENDRIKS-BALK et al, 2007).

Atualmente, há a preocupação em se utilizar um constitutivo com expressão constante e por isso houve aumento no número de trabalhos publicados evidenciando a importância de se testar vários genes constitutivos, em cada experimento específico, para definição do gene mais estável para cada situação, sendo a escolha e qualidade dos constitutivos um dos principais fatores que influenciam as análises.

A normalização para um gene constitutivo é um método simples e amplamente utilizado que possibilita o controle de variação na quantidade inicial de material, qualidade do RNA, variação intrínseca do equipamento utilizado e diferenças na síntese de cDNA dependentes de alterações na quantidade do RNA (HENDRIKS-BALK et al, 2007; SPALENZA et al, 2010), bem como, permite dizer se a variação encontrada está relacionada aos tratamentos estabelecidos no experimento (GOOSSENS, 2005; DE JONGE, 2007).

Foram testados cinco genes constitutivos neste trabalho, os quais têm sido utilizados em vários experimentos do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. A escolha do gene a ser utilizado como referência foi baseada na análise descritiva para os grupos experimentais: antes X depois da infestação com o carrapato.

Para confirmar a estabilidade dos genes, os softwares Bestkeeper, Normfinder e Genorm, amplamente utilizados para verificação de genes constitutivos estáveis, foram utilizados. Tanto para os softwares Bestkeeper (Tabela 12), Normfinder (Tabela 13), quanto para o software Genorm (Figura 12), o gene RPL-27 foi considerado o mais estável, confirmando o que já havia sido encontrado nas análises descritivas. Para utilização de dois genes constitutivos combinados, o software Normfinder sugeriu a combinação RPL-27 e RPS-9, enquanto o Genorm RPL-27 e YWHAZ.

Tabela 12. Resultados da análise pelo programa Bestkeeper indicando o melhor gene constitutivo. (N – tamanho amostral, MG – média geométrica; M. Ar. – média aritmética, SD – desvio padrão, e CV – coeficiente de variação)

	GAPDH	RPL-19	RPL-27	RPS-9	YWHAZ
N	42	42	42	42	42
MG	24	18	18	20	22
M. Ar.	23.97	18.07	18.08	20.52	22.34
SD	1.66	1.09	1.07	1.58	1.58
CV	6.92	6.00	5.90	7.68	7.07

Tabela 13. Resultados da análise pelo programa Normfinder indicando o melhor gene constitutivo.

Gene	Valor da Estabilidade
GAPDH	0.013
RPL-19	0.009
YWHAZ	0.011
RPS-9	0.006
RPL27	0.006

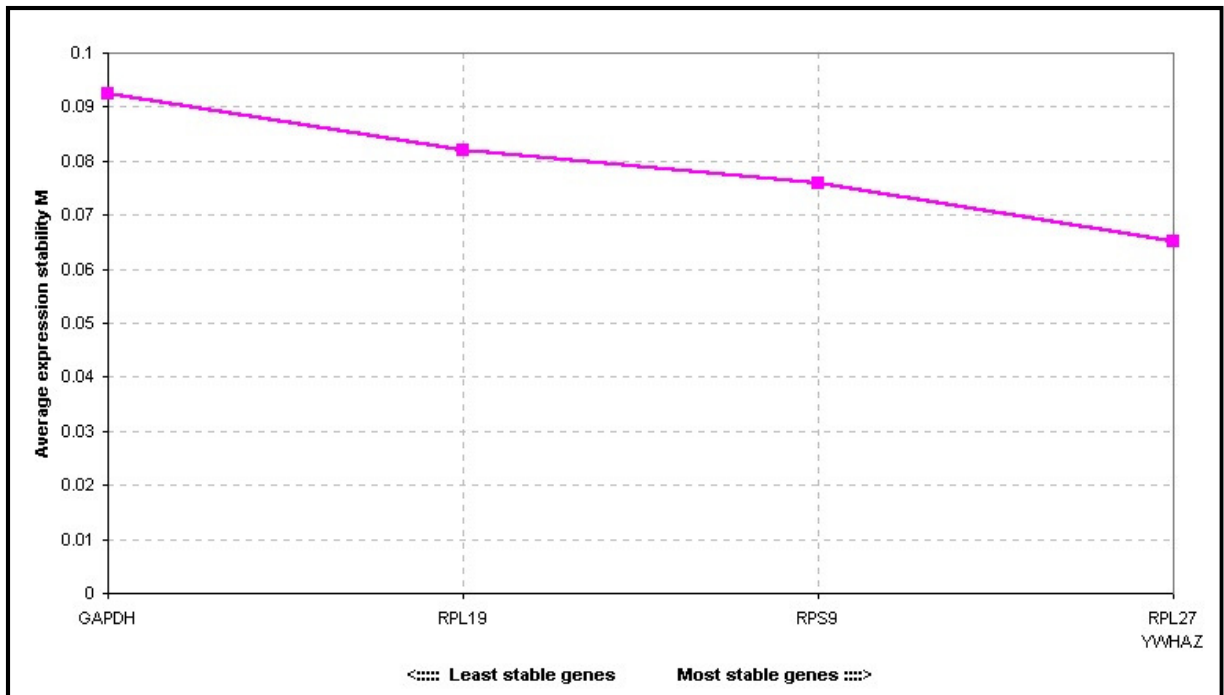


Figura 12. Gráfico segundo o programa *Genorm*, mostrando a ordem da estabilidade dos genes estudados.

Posteriormente, foi realizado um teste não paramétrico, chamado *Randomisation test*, com a finalidade de verificar se as variações encontradas eram devidas aos diferentes tratamentos entre os grupos experimentais. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos para nenhum dos genes estudados, ou seja, nenhum dos genes foi regulado de acordo com o tratamento

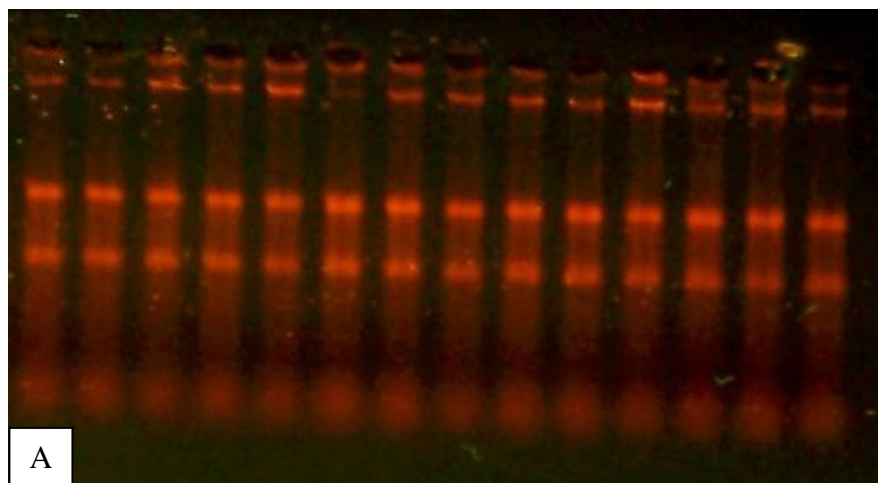
Entre genes mais utilizados como constitutivos destacam-se GAPDH, β -microglobulina, β -actina, rRNA, HPRT-1 e YWHAZ. No entanto, há resultados que mostram grandes variações para estes genes. Radonic et al. (2004) encontraram diferenças na expressão de GAPDH em grupos de células submetidas e não-submetidas a ação de agentes mitogênicos e Dedha et al. (2004) rejeitaram o uso desse gene, pois foi um dos mais variáveis em culturas de células de sangue total. O mesmo já foi descrito para os outros genes, como Nygaard et al. (2007) que observaram que HPRT-1, YWHAZ e GAPDH estavam entre os genes menos estáveis, evidenciando mais uma vez que estes e outros genes podem não ser adequados universalmente como constitutivos (ZAROS et al, 2010).

De Jonge et al (2007) estudaram o que foi chamado de novos grupos de genes constitutivos, em que se incluem as famílias de genes ribossomais RPLs e

RPSs, partículas de reconhecimento de sinal (SRPs), entre outros. Eles encontraram que os genes RPS-13, RPL-20 e RPL-27 foram os mais estáveis em tecidos de humanos. Em bovinos, genes dessas famílias também têm sido escolhidos como mais estáveis, como o RPL-19, que foi usado por Zaros et al (2007) na comparação de tecidos abomasais e intestinais e por Regitano et al. (2008) e Ibelli et al. (2011) que compararam tecidos de linfonodos e de abomaso infectados com endoparasitos. Zaros et al (2010), avaliando a estabilidade de genes referência em ovinos, encontraram outro gene da família RPL como bom candidato a gene constitutivo. Nesse trabalho, a partir de todos os métodos avaliados, foi encontrado que o gene RPL-27 foi o considerado mais estável. Dessa maneira, o gene RPL-27 foi escolhido como constitutivo.

4.5.2. Expressão gênica em larga escala e validação por PCR quantitativo

Foi possível observar nas análises de pré-processamento que os microarranjos tiveram qualidade dentro dos padrões recomendados, com porcentagens de hibridização presentes acima de 60% e background ao redor de 38 pontos. O fator de escala também foi obtido dentro dos padrões indicados. No entanto, na maioria das amostras os genes constitutivos β -actin e GAPDH estavam fora dos padrões, podendo indicar um pequeno grau de degradação de RNA ou baixa concentração das amostras de RNA quando foram hibridizadas (Figura 13). Apesar disso, a qualidade dos arranjos não foi prejudicada.



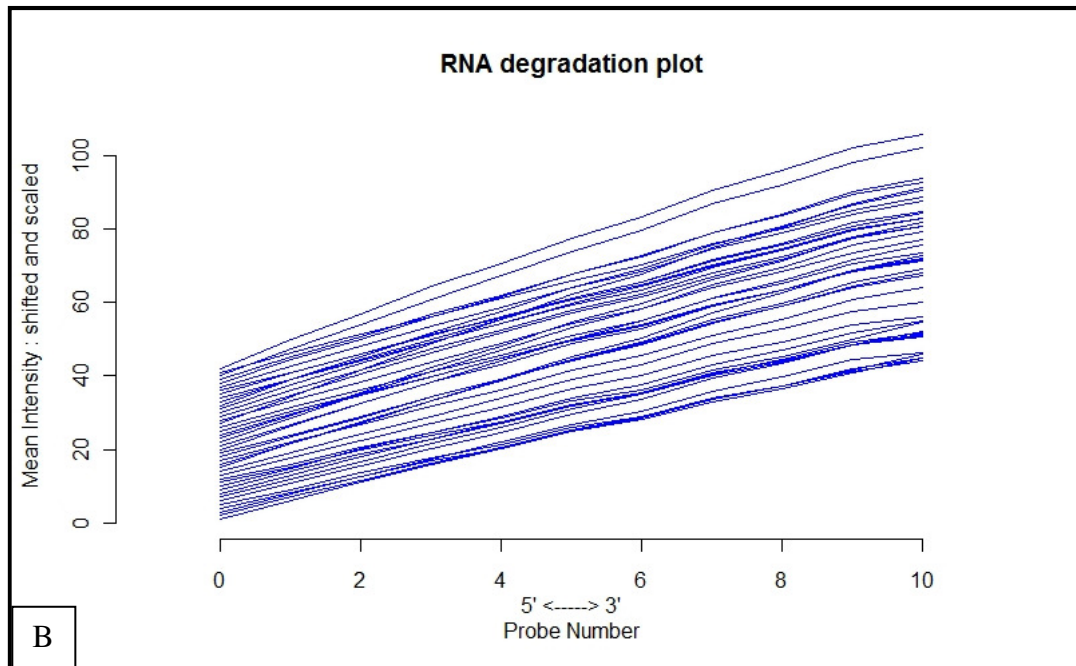


Figura 13. Qualidade do RNA submetido à análise dos microarranjos em gel de agarose 1% (A) e após a análise de hibridização dos microarranjos das amostras de pele utilizadas no experimento (B).

Apesar da diferença entre grupos genéticos para a contagem de carrapatos e para algumas características fisiológicas ser significativa, a partir dos resultados obtidos pela análise de microarranjos, não foi possível observar influência do grupo genético na expressão dos genes, indicando que mecanismos comuns aos diferentes grupos genéticos ocorrem em resposta a esse tipo de infestação. Esses resultados contrastam com os obtidos por Regitano et al. (2008), Piper et al. (2010) e Carvalho et al. (2010), que encontraram diferenças na expressão de genes avaliando bovinos resistentes e sensíveis. Piper et al. (2008) avaliando a expressão de genes candidatos a resistência também relataram ampla variação entre e dentro de raças Brahman e Holandesa. Os resultados encontrados neste trabalho podem ser contrastantes com os da literatura, pois aqui foram estudados animais que já haviam tido contato prévio com o carrapato *R. microplus*, portanto, a imunidade adquirida já estava ativada nesses animais. Além disso, apesar do grupo TA ser mais sensível que os outros grupos, os três grupos genéticos foram considerados resistentes quando comparados aos animais estudados nos trabalhos acima citados, já que apresentaram mortalidade de larvas maior que 98 % (UTECH et al, 1978). Um diferencial para tal nível de resistência dos animais deste experimento, se dá pelo cruzamento do Senepol e do Angus com Nelore, que confere maior resistência a

esses grupos.

Dessa maneira, prosseguiu-se às análises de expressão gênica entre os tratamentos, antes e depois do desafio, considerando todos os grupos genéticos simultaneamente. Essa comparação gerou 1502 genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$). Desses, 851 foram ativados e 651 tiveram sua expressão reduzida após o desafio, sendo que 350 sondas não foram anotadas até o momento. Considerando os valores de razão da expressão, 93 genes tiveram aumento ou diminuição de 50% no seu nível de transcrição (Apêndice A).

Na análise de bicluster realizada, pode-se observar que houve apenas 92 de genes responsáveis por caracterizar os dois grupos estudados (antes x depois da infestação) (Figura 14). Esses dados podem ser reflexos da variação dos dois grupos, isto é, os animais utilizados eram de três diferentes grupos genéticos, o que faz com que haja uma ampla diversidade genética. Assim, como as diferenças entre grupos genéticos não foram significativas, a heterogeneidade na expressão dos genes pode ter reduzido o poder de detecção dos efeitos de tratamentos. Além disso, pelo fato desses animais já terem sido previamente infestados com carrapatos, muitas vias metabólicas já poderiam estar ativadas em ambos os grupos (antes x depois do desafio). No entanto, entre alguns dos genes que mais discriminaram os dois grupos podem ser citados: CCL2, CXCL5, MMP1, IL8, CHI3L2, ANKRD1 e FAM2, que foram ativados após a infestação pelos carrapatos. Desses genes, apenas IL-8 já foi relacionado com infestação ao carrapato na literatura (REGITANO et al., 2008).

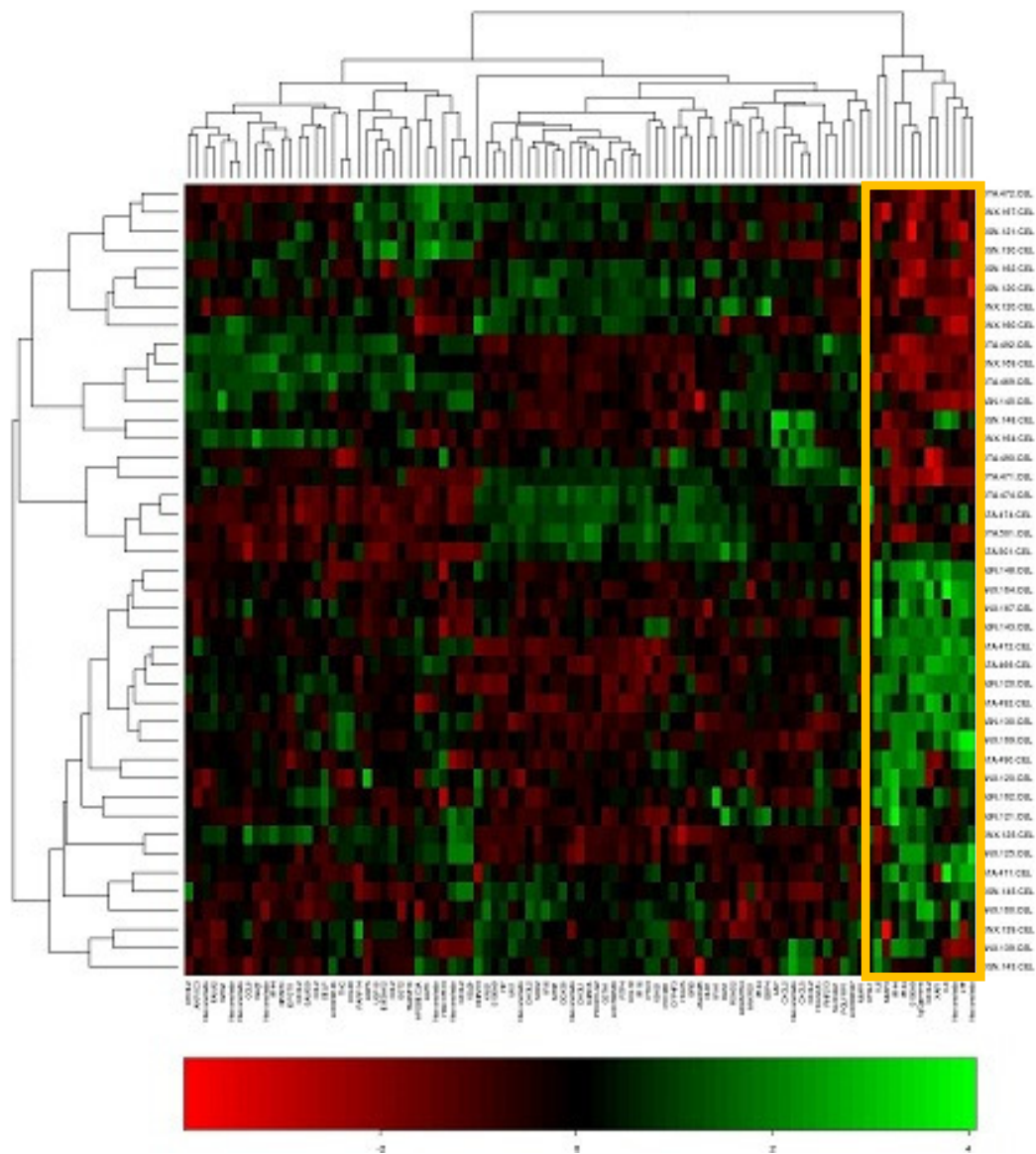


Figura 14. Heatmap mostrando a distribuição dos genes entre os grupos (antes da infestação e após a infestação) estudados. O destaque em amarelo evidencia os genes responsáveis pela diferenciação dos dois grupos.

Com a finalidade de verificar quais genes estavam associados com a contagem de carrapatos, após a obtenção dos biclusters, foi feita uma análise considerando dados de expressão gênica diferencial, amostras (A e D) e a contagem de carrapatos. Foram encontrados 5 biclusters de amostras: bicluster 1, com amostras contendo a maioria de amostras antes da infestação, biclusters 2, 3 e 4, que apresentaram amostras de antes e depois da infestação agrupadas juntamente e o bicluster 5, contendo basicamente amostras posteriores a infestação pelo carrapato. No entanto, apenas para o bicluster 5 foi encontrado um valor de

significativo para a associação das amostras após serem submetidas a infestação por carrapatos e os genes diferencialmente expressos. Esse agrupamento foi composto basicamente por amostras que tiveram as maiores contagens de carrapatos após a infestação. Foram observadas aproximadamente 103 sondas, correspondentes a 70 diferentes genes que foram ativados nessas condições, sendo os principais relacionados às via de quimiocinas (CCL2, CCL8, IL18BP, CCL8), profiliação de linfócitos (IGHG1, CD14, IgCgamma), inibidores de metaloproteases (MMP3, Serpine1, TIMP1), complemento e função plaquetária (C3, PF4,PLAUR) e colágeno (SLCO4A1). Essas vias são relacionadas em sua maioria a defesa primária do hospedeiro ao carrapato, de forma que podem definir a eficiência desses mecanismos que permitirão o sucesso ou não do ciclo parasitário nos bovinos.

Os genes diferencialmente expressos foram representados em 167 vias metabólicas ativadas ou reprimidas na resposta ao carrapato, sendo as mais representativas apresentadas na Figura 15. Piper et. al. (2010) também encontraram vários desses processos biológicos envolvidos na resposta de bovinos Brahman e Holandês à infestação com o carrapato *R. microplus*. Nenhuma dessas vias foi exclusivamente relacionada aos tratamentos, ou seja, não houve vias em que os genes só apareceram super ou pouco expressos antes ou depois da infestação. Destacaram-se com maior número de genes diferencialmente expressos as vias metabólicas de sinalização de quimiocinas, de sinalização das vias MAPK e Jak-Stat, de receptores de citocinas, do complemento, de moléculas de adesão focal, de spliceosomos, de metabolismo de purinas, H32, de metabolismo de drogas (citocromo P450), metabolismo do ácido aracdônico e de adesão do citoesqueleto (Figura 15).

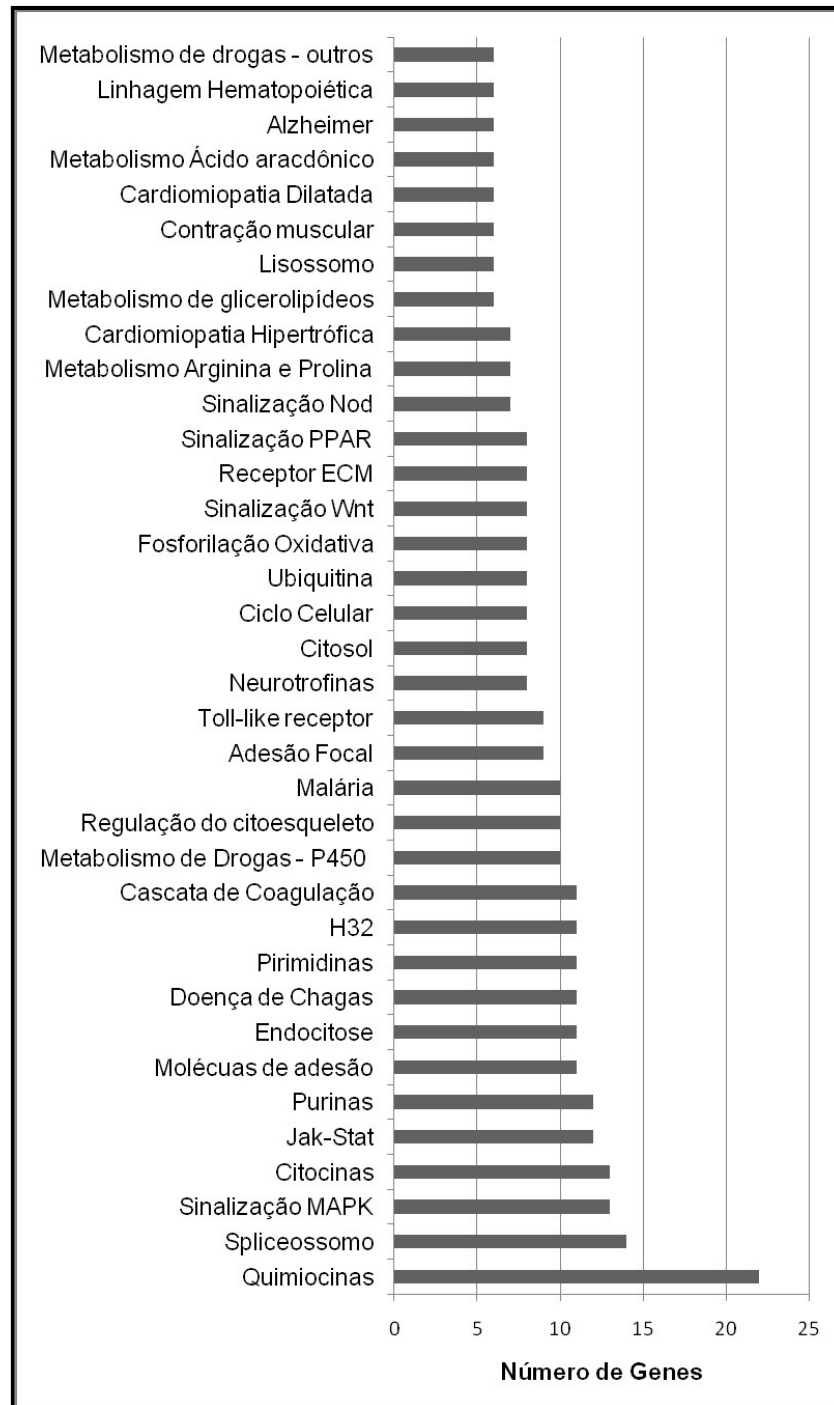


Figura 15. Vias metabólicas com maior número de genes relacionados a resposta ao carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Foram encontradas diferenças significativas para oito dos dez genes escolhidos para serem avaliados por PCR quantitativo, analisados para validação do experimento de microarranjos, demonstrando que as duas técnicas apresentaram resultados concordantes, permitindo assim a aceitação dos resultados obtidos da expressão gênica em larga escala (Figura 16).

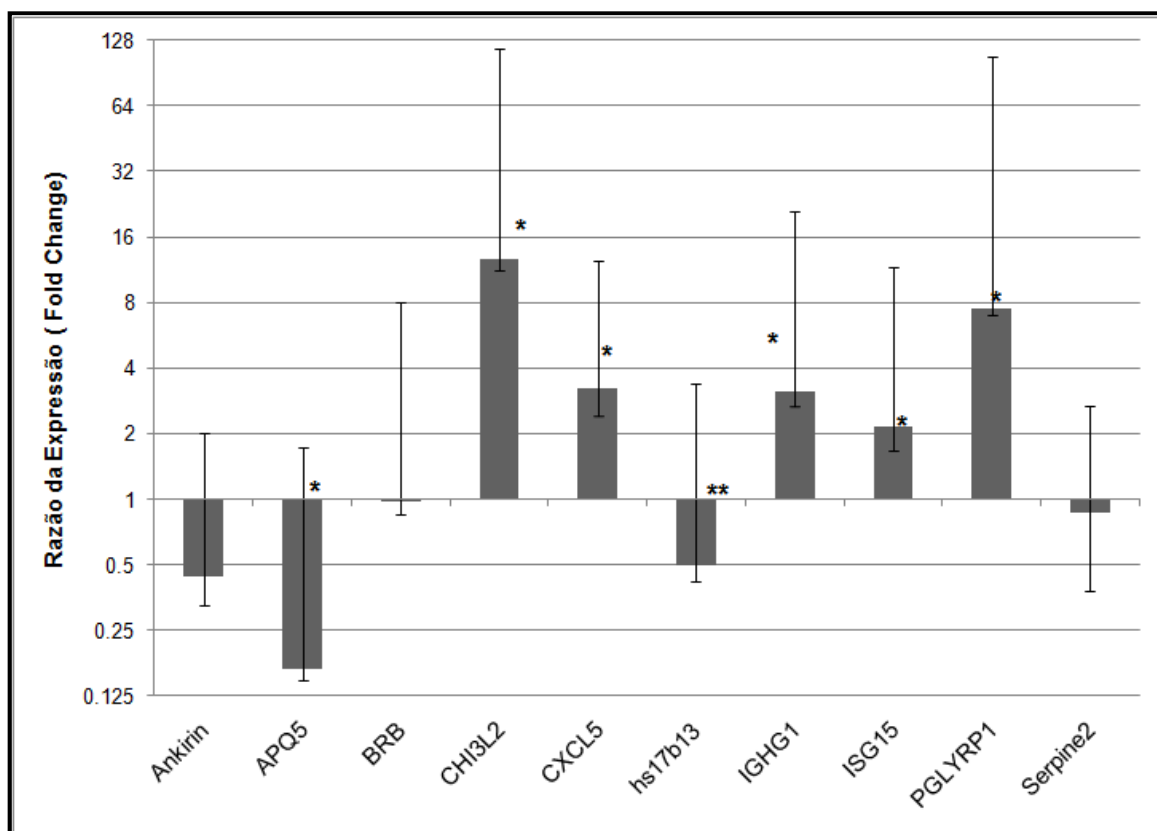


Figura 16. Razão de expressão gênica em pele de bovinos antes e após a infestação entre o grupo desafiado e o grupo controle, normalizada para um gene referência (RPL-27). As barras representam o intervalo interquartil, ou 50% das observações, expressas como n-vezes a diferença entre os grupos (A e D) em relação ao gene referência. As linhas pontilhadas representam a média de expressão gênica. As linhas representam as observações máxima e mínima. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,10$.

A ativação de cinco dos dez genes analisados por PCR quantitativo nas primeiras 24 horas após a infestação com o carrapato, evidencia a importância dessa fase na proteção contra o parasita (Figura 16). Estão envolvidas várias vias metabólicas (p.ex. sinalização de quimionas, reconhecimento de peptidoglicanas e de resposta imune), e muitas delas foram identificadas pela primeira vez em resposta ao carrapato *R. microplus*.

Entre os genes que apresentaram maiores valores de razão de expressão e que foram ativados durante o desafio no experimento de arranjos, encontram-se várias quimiocinas e genes relacionados a elas. Destacam-se CCL2, CCL3, CCL20, CCL8, CXCL5, CXCL6, IL8, genes que atuam na sinalização da coagulação, como fator plaquetário 4 (PF4,) e fatores de ativação de transcrição como STAT2, STAT3 e STAT5B. As quimiocinas são moléculas que recrutam a

migração de células para os tecidos que estão sendo submetidos ao estresse físico, como em infestações por carrapato. Elas são as primeiras a aparecerem no sítio da inflamação, recrutando neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sugerindo que sejam as principais responsáveis no processo de reparo tecidual (JACKMAN, 2000). Monócitos produzem CCL2 e CCL3, que são capazes de induzir a quimiotaxia de leucócitos, ativando integrinas, citocinas pró-inflamatórias e produção de histamina por basófilos (BISWAS;SODHI, 2002). Esses resultados de expressão gênica estão de acordo com a resposta celular de aumento de monócitos no grupo TA e eosinófilos no grupo NX (Tabela 4) encontrada neste trabalho. Tais dados indicam que uma resposta inflamatória está sendo dirigida pelo recrutamento de monócitos e eosinófilos, como também encontrado por Piper et. al. (2008, 2010) e contrastando os resultados obtidos por Wang et. al. (2007). Entretanto, Piper et. al.(2010) só encontraram diferenças na expressão de bovinos holandeses infestados, enquanto no presente estudo, todos os grupos genéticos apresentaram ativação desses mecanismos.

Nesse estudo, alguns genes que foram superexpressos após o desafio com carrapato como, por exemplo, genes de matriz de metaloproteinases (MMP-1 e MMP-3), de proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanas (PGLYRP1) e interleucina 6 (IL-6) ainda não haviam sido relacionadas com infestação ao carrapato, e suas funções ainda permanecem desconhecidas. Entretanto, MMPs e IL-6 já foram relacionadas com a manutenção de co-infecções de *Anaplasma phagocytophilum* e *B. burgdorferi* em humanos (GRAB et. al, 2007). Também é conhecido que carrapatos produzem metaloproteinases com a finalidade de se manterem no corpo do hospedeiro (CARVALHO et. al., 2010).

Outro aspecto que atualmente tem sido melhor explorado e que pode ter grande importância na defesa do hospedeiro está ligado ao sistema de coagulação sanguínea e vasoconstrição (FRANCISCHETTI et al., 2009). Os carrapatos, para serem bem sucedidos e conseguirem completar o ciclo de vida, precisam se alimentar continuamente do sangue do bovino, e se isso não ocorrer, morrem. Vários genes relacionados com as vias de coagulação sanguínea e vasoconstrição foram ativados na pele de bovinos após serem infestados com *R. microplus*. Nas vias de cascata de coagulação e do complemento foram ativados os genes C3 (componente do complemento 3), C4 (componente do complemento 4), C4BPA, (proteína ligante de componente do complemento 4A), C6 (componente

do complemento 6), KNG1 (kininogen), PLAUR (ativador de plasminogênio), além de fatores plaquetários como PF4. Essa via de cascata de coagulação possui mais de 35 proteínas atuando em vários caminhos, com a função de gerar proteínas que ativam o sistema MAC (complexo de ataque de membrana) causando a morte do parasita (BJORK et al., 1985; FRANCISCHETTI et al., 2009). Em outro estudo com bovinos da raça Holandesa, padrões semelhantes foram observados para genes dessa via metabólica (PIPER et al., 2010).

Nas duas fases do ciclo de vida do carrapato, vida livre e parasitária, este parasita é muito susceptível à dessecação, de forma que no hospedeiro, precisa haver grande influxo de água com a ingestão de sangue, aumentando cerca de 100 vezes em relação ao seu tamanho antes do parasitismo (KAUFMAN; PHILLIPS, 1973; NIELSEN et al., 2002). O gene AQUAPORIN 5 (AQP 5) foi o que apresentou menores valores de razão de expressão gênica, sendo o mais reprimido após o desafio com o carrapato. Além desse, os genes AQUAPORIN 3 e 9 também tiveram o mesmo perfil de expressão gênica que o AQP 5. Essa família de genes de canais de água foi identificada em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* expressas apenas em tecidos relacionados com o influxo de água, sendo especialmente abundante nas glândulas salivares (BALL et al., 2009; CAMPBELL et al. 2010). Em mamíferos, esse gene também apresenta função de aumentar a especificidade e permeabilidade passiva de água (NIELSEN et al. 2002). Dessa maneira, a repressão desse gene deve prejudicar a alimentação do carrapato, que pode não completar o ciclo de vida no hospedeiro, sendo mais um mecanismo em potencial de defesa, ainda pouco explorado, dos bovinos a esse parasita.

Apesar de o hospedeiro ter complexo mecanismo de defesa contra o carrapato, esse parasita consegue, em muitos casos, evadir o sistema de resposta dos bovinos, garantindo sua sobrevivência. Genes SERPINC1 e SERPINE1, inibidores de serino peptidase C, foram encontrados ativados, após a infestação. Geralmente, esses genes são descritos como constitutivos em mamíferos, com a função de regular a coagulação sanguínea (RAU et al., 2007). É possível postular que substâncias ativas dos carrapatos tenham papel importante na regulação observada para esses genes no presente trabalho, inibindo a coagulação sanguínea e auxiliando sua manutenção no hospedeiro (MULENGA, KHUMTHONG, CHALAIRE, 2009). A ativação desses genes pode influenciar os genes que atuam na regulação da coagulação sanguínea em presença de cálcio, como por exemplo,

os genes trombospondina 4 (THBS4), tromboplastina 3 (F3) e calmodulina 3 (CADM3), e que foram superexpressos antes da infestação do carrapato, não tendo sido detectados nas amostras após a infestação. Dessa maneira, é possível que tenha ocorrido uma interação entre a ativação dos genes serpinas, atuando na cascata de coagulação sanguínea e agregação plaquetária, inibindo a ação dos genes acima citados, consequentemente afetando a coagulação nessas vias e provavelmente, permitindo uma maior sobrevivência dos carrapatos no hospedeiro.

Com base nos resultados, pode-se postular que parte dos genes diferencialmente expressos neste trabalho (como por exemplo AQP 5), podem estar relacionados com mecanismos de proteção dos bovinos à infestação com carrapato *Rhipicephalus microplus*, provavelmente auxiliando o desprendimento das larvas no início da infestação, período crítico para sua manutenção em bovinos, e outra parte, como por exemplo, inibidores de serino peptidase C, sejam consequência da modulação da expressão induzida pelo próprio carrapato com a finalidade de melhorar as condições de parasitismo.

Além disso, o estudo aprofundado das funções de muitos dos genes encontrados pela primeira vez em resposta ao carrapato abre novas possibilidades na criação de fármacos e possíveis alvos para vacinas.

5. Conclusões

Pode-se concluir que:

- Apesar dos 3 grupos genéticos serem classificados como resistentes, os cruzados Senepol x Nelore, com mais de 50% de raça adaptada aos trópicos, apresentaram índices de resistência semelhantes ao Nelore puro;

- Número de Mastócitos na pele e comportamento de auto-limpeza no início da infestação contribuem para conferir resistência em bovinos da raça Nelore;

- Maiores comprimentos de pelo e densidade de massa do pelame, aumentam a incidência de carrapatos, sugerindo que a busca por animais com menores valores para essas características proporcionaria taxas de infestação mais baixas;

- Entre os mecanismos de resposta ao carrapato aqui observados, os mecanismos relacionados aos genes CCL2, CXCL5, MMP1, CHI3L2, ANKRD1, FAM2, entre outros, não foram encontrados na literatura, representando potenciais novos alvos para o desenvolvimento de estratégias de combate ao carrapato, como vacinas e fármacos.

6. Referências

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Total das Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Disponível em < http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf > Acesso em: 23 de fevereiro de 2012b.

ALJAMALI , M . N . , BIOR , A . D . , SAUER , J . R . & ESSENBERG , R . C . RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*. **Insect Mol. Biol.**, v. 12, p. 299–305, 2003.

ALLEN, J.R. Tick resistance: Basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **International Journal for Parasitology**, 3, 195–198, 1973. AMAKIRI, S. F. Arteriovenous anastomoses in the skin of tropical cattle. **Acta Anat**, v. 96, p. 285-300, 1976.

AMARAL, M.A.Z.; ROCHA, C.M.B.M.; FACCINI, J.L.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C.M.O; PRATA, M.C.A. Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, p. 148-154, 2011.

ANDRADE, A.B.F. **Análise genética da infestação de fêmeas da raça Caracu por carrapato (*Boophilus microplus*) e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*)**. 2001. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

ANDREOTTI, R., GUERRERO, F.D., SOARES, M.A., BARROS, J.C., MILLER, R.J., LÉON, A.P. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 2, p. 127-133, 2011.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thromb Res**, v. 114, p. 447-53, 2004.

ANGUS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ANGUS. **Angus, uma raça de história e futuro no Brasil**. http://www.angus.org.br/associacao/visualiza/?ID_ITEM=4 . Acesso em: 04 de mar de 2012.

ARANTES, G. J.; MARQUES, A. O.; HONER, M. R. O carrapato do bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: análise da sua resistência contra carrapaticidas comerciais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, p. 89-93, 1995.

ASBIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf> acesso em 04 de mar de 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Rebanho bovino brasileiro**. Disponível em < http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp > . Acesso em: 23 fev. 2012a.

BAGNALL, N.; GOUGH, J.; CADOGAN, L.; BURNS, B.; KONGSUWAN, K. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation. **Paras. Immun.**, v. 31, p. 177- 187, 2009.

BALL, A.; CAMPBELL, E.M.; JACOB, J.; HOPPLER, S.; BOWMAN, A.S. Identification, functional characterization and expression patterns of a water-specific aquaporin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Insect Bioch. and Mol. Biol.**, v.39, p. 105–112, 2009.

BARBOSA, P. F. Bases genéticas e evolutivas para a divergência de espécies de bovinos. **Ecossis**, v. 13, p. 5 – 14, 1998.

BARRIGA, O.O.; ANDUJAR F.; ANDRZEJEWSKI WJ, Manifestation of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. **J. Parasitol**, v. 77, p. 703-709, 1991.

BENAVIDES, O.E. et al. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari:Ixodida). **Rev Colom Entomol**, v. 27, p.1-8, 2001.

BENNET, G. F. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): experimental infections on cattle restrained from grooming. **Exp. Parasitol.**, v. 26, p. 323-328, 1969.

BENNET, G.F. *Boophilus microplus (Canestrini)* on the bovine host.I. Mortality during the developmental cycle. **Acarol**, v. 16, p. 643 – 650, 1975.

BIANCHI, M.W.; BARRÉ, N.; MESSAD, S. Factores related to cattle level resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, 112, 75- 89, 2003.

BIANCHIN, I.; CATTO, J.B.; KICHEL, A.N.; TORRES, R.A.A.; HONER, M.R. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. **Trop Anim Health Produc**, v. 39, p. 287 – 296, 2007.

BISWAS, S., SODHI, A. In vitro activation of murine peritoneal macrophages by MCP-1: up-regulation of CD11b, production of proinflammatory cytokines, and the signal transduction pathway. **J of Interf Cytok Resh**, v. 22, p. 527–538, 2002.

BITTAR, J.F.F.; RIBEIRO, M.F.; MARCIANO, A.P.V.; SALCEDO, J.H.P; MARTINS-FILHO, O.A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de Raças européias. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, 2004.

BJORK, J.; HUGLI, T.E. SMEDEARD, G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. **J. Immunol.**, v. 134, p. 1115–1120, 1985.

BOWESSIDJAOU, J.; BROSSARD, M.; AESCHLIMAN, A. Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus*. **Cell Mol Life Sci**, v. 33, p. 528-530, 1977.

BRITO, L.G. **Carrapatograma**: um aliado do produtor na exploração leiteira. <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/download.php?idT=976>> .Acesso em: 04 de abr de 2008.

BROSSARD, M.; FIVAZ, V. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. **Parasitol**, v. 85, p. 583–592, 1982.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, p. 270-276, 1997.

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

BURROW, H. M. Variances and covariances between productive and adaptive traits and temperament in a composite breed of tropical beef cattle. **Livest. Prod. Sci.** v. p. 70, 213–233, 2001.

CAMPBELL, E.M.; BURDIN, M.; HOPPLER, S.; BOWMAN, A.S. Role of an aquaporin in the sheep tick *Ixodes ricinus*: Assessment as a potential control target. **Internl J for Parasitol**,v. 40, p. 15–23, 2010.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.;MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 328–340, 2005.

CARAMELLI, D. The origins of domesticated cattle. **J Hum Evol**, v.21, p. 107-122, 2006.

CARDOSO, E., et al. Análise da cadeia produtiva de peles e couros no Brasil. **Comunicado Técnico**, Embrapa - Campo Grande, n. 68, p. 1-4, nov. 2001.

CARVALHO WA, IANELLA P, ARNOLDI FG, CAETANO AR, MARUYAMA SR, FERREIRA BR, CONTI LH, DA SILVA MR, PAULA JO, MAIA AA, SANTOS IK. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. **Immunogen**, v. 63, p. 319-24, 2011.

CARVALHO, M.C.C.G; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Cienc. Rural**, v. 40, p. 735 – 744, 2010.

CARVALHO, W.A.; MARUYAMA, S.R.; FRANZIN, A.M.; ABATEPAULO, A.R.R; ANDERSON, J.M.; FERREIRA, B.R.; RIBEIRO, J.M.C.; MORÉ, D.D.; MAIA, A.A.M.; VALENZUELA, J.G.; GARCIA, G.R.; SANTOS, I.K.F. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: clotting time in tick-infested skin varies according to local inflammation and gene expression patterns in tick salivary glands. **Experim Parasitol**, v.124, p. 428–435, 2010.

CAWLEY, S., BEKIRANOV, S., NG, H. H., KAPRANOV, P., SEKINGER, E. A., KAMPA, D., PICCOLBONI, A.,SEMENTCHENKO, V., CHENG, J., WILLIAMS, A.

J., WHEELER, R., WONG, B., DRENKOW, J., YAMANAKA, M., PATEL, S., BRUBAKER, S., TAMMANA, H., HELT, G., STRUHL, K., AND GINGERAS, T. R. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. **Cell**, v. 116, p. 499–509, 2004.

CHAGAS, A.C.S; BARROS, L.D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI,R.; OLIVEIRA, M.C.S.; BIZZO, H.M. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Res**, v. 110, p. 295–303, 2012.

COMER, J. E., GALINDO, C. L., CHOPRA, A. K., AND PETERSON, J. W. GeneChip analyses of global transcriptional responses of murine macrophages to the lethal toxin of *Bacillus anthracis*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1879–1885, 2005.

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. **Internat J Parasitol** , v. 40, p. 865–875, 2010.

da SILVA VAZ JÚNIOR, I ; MARTINEZ, R. H. M. ; OLIVEIRA, A. M. A. ; HECK, A. ; LOGULLO, Carlos ; GONZALES, J. C. ; DEWES, H. ; MASUDA, Aoi . Functional Bovine Immunoglobulins In *Boophilus Microplus* Hemolymph. **Vet Parasitol**, v. 62, p. 155-160, 1996.

DALMA -WEISZHAUSZ, D.D.; WARRINGTON, J.; TANIMOTO, E.Y.; MIYADA,.G. The Affymetrix GeneChip Platform: An Overview. **Meth Enzymol**, p. 410, DOI: 10.1016/S0076-6879(06)10001-4, 2006.

DASILVA VAZ JR, I.; OZKI L.S.; MASUDA A. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. **Vet Parasitol.**, v.52, p. 71-78. 1994.

DE CASTRO, J.J., Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet. Parasitol.**, v. 71, p. 77–97, 1997.

DE CASTRO, J.J., YOUNG, A.S., DRANSFIELD, R.D, CUNNINGHAM, M.P. and DOLAN, T.T. Effects of tick infestation on Boran (*Bos indicus*) cattle immunized

against theileriosis in an endemic area of Kenya. **Res Vet Sci**, v. 39, p. 279-288, 1985.

DE JONGE, H,J,M;FEHRMANN, R,S,N;; BONT, E,S,J,M,;; HOFSTRA, R,M,W,;; GERBENS, F,;; KAMPS, W,A,;; VRIES, E,G,E,;; VAN DER ZEE, A,G,J,;; TE MEERMAN, G,J,;;TER ELST,A Evidence based selection of housekeeping genes, **PLoS ONE**, n. 9, e898, p. 1 – 5, 2007.

DE LA FUENTE J, ALMAZÁN C, CANALES M, PÉREZ DE LA LASTRA JM, KOCAN KM, WILLADSEN P. A ten- year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Anim. Health Res. Rev**,v. 8, p. 23-28, 2007.

DE ROSE, R. et al. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Vet Immun and Immunopath**, v. 71, p. 151-160, 1999.

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

ESTADOS UNIDOS. United States Department of Agriculture. **Livestock and poultry: world markets and trade**. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2012.

FERGUSON, J. J.; ZAQQA , M . Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: current concepts and future directions. **Drugs**, v. 58, p.965–982, 1999.

FONSECA, A. H., PEREIRA, M. J. S., MAFRA, C.L. Dinâmica Populacional do carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta - MG, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 2, p. 121, 1997.

FRAGA, A.B.; Alencar, M.M.; Figueiredo, L.A.; Razook, A.G.; Cyrillo, J.N.S.G. Genetic analysis of the infestation of females of the Caracu cattle breed by Horn Fly (*Haematobia irritans irritans*) (L.) (Diptera, Muscidae). **Gen Mol Biol**, v. 28, p. 242-247, 2005.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; SÁ-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci**. ; v. 14, p. 2051–2088, 2009.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE, 34, 229-237, 2001.

FRISCH, J.E.; O'NEAL, C.J.; KELLY, M.J. Using genetics to control cattle parasites—the Rockhampton experience. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 253-264. 2000.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 57-71, 1999.

FRIZZO, Arnaldo. Indústria e comercialização: classificação e qualidade de couro. **Rev do Couro**, v. 178, p. 73, 2005.

FURLONG, J. Diagnostico de La susceptibilidad de la garrapata Del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas em el estado de Minas Gerais, Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL: control de la resistencia em garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten, 4., 1999, Puerto Vallarta.

FURLONG, J. et al. CL 50 E CL 90 dos extratos alcoólico e aquoso de Nim indiano (*Azadirachta indica*) em larvas de *Boophilus microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** 1CD-ROM.

GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUÉ, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR., M.; MACHADO, H., GONZALEZ, I. L.; VALDES, M.; MENDEZ, L.; DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vacc**, v. 18, p. 2275 -2287, 2000.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L.L., MARTINEZ, M.L.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; MACHADO, M.A.; SILVA, M.V.G.B; SONSTEGARD, T.; REGITANO, L.C.A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Anim Gen.**, doi:10.1111/j.1365-2052.2007.01634.x, 2007.

GENECHIP ®. **Expression analysis technical manual**. Disponível em: <http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf> . Acesso em: 04 de mar de 2012.

GEORGE, J.E. Present and future technologies for tick control. **Ann. N Y Acad. Sci**, v. 916, p. 583-588, 2000.

GETTINS, P. W. G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chem Rev**, v. 102, p. 4751-4803, 2002.

GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M. P. Upcoming and future strategies of tick control: a review. **J Vector Borne Dis.**, v. 44, p. 79-89, 2007.

GIGLIOTI, R.; FORIM, M.R.; OLIVEIRA, H.N.; CHAGAS, A.C.; FERREZINI, J., BRITO, L.G.; FALCOSKI, T.O.; ALBUQUERQUE, L.G.; OLIVEIRA, M.C. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. **Vet Parasitol.** v.27, p. 309- 315, 2011.

GILL, H.S. Tick feeding and the development of immunity to *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Thesis, University of Edinburgh, UK, 1984.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Editora Mestre Jou, 1974.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. Porto Alegre: J.C. Gonzales, 1993. 80 p.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato bovino**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEREN, A; PEELMAN, L,C, Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos, **BMC Develop Biol**, v,5, n, 27, DOI:10.10186/1471-213X-5-27, 2005.

GRAB, D.J.; NYARKO, E.; BARAT, N.C.; NIKOLSKAIA, O.V.; DUMLER, J.S. *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. **Clin Vaccine Immunol.**, v.14, p 1420-4, 2007.

GRISI, L., MASSARD, L.C., BORJA, G.E.M., PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.125, p.8-10, 2002.

GRUBHOFFER, L.; KOVA, V.; RUDENKO, N. Tick lectins: structural and functional properties. **Parasitol**, v. 129, p. S113–S125, 2004.

HAJNICKA, V., KOCAKOVA, P., SLAVIKOVA, M., SLOVAK, M., GASPERIK, J., FUCHSBERGER, N. & NUTALL, P. A. Anti-Interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Paras Immunol**, v. 23, p. 483–489, 2001.

HALES, J.R.; SCHLEGER, A.V.; KEMP, D.H.; FAWCETT, A.A. Cutaneous hyperaemia elicited by larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*, **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 34, p. 37–46, 1981.

HAMMOND, A. C., AND T. A. OLSON. Rectal temperature and grazing time in selected beef cattle breeds under tropical summer conditions in subtropical Florida. **Trop. Agric.** v. 71, p. 128–134, 1994.

HANNIER, S., LIVERSIDGE J., STERNBERG J.M. BOWMAN A.S..Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. **Immunol**, v. 113, p. 401–408, 2004.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82, p. 349 – 360, 2004.

HART, B.L. Role of grooming in biological control of ticks. **Ann N Y Acad Sci**, p. 565 – 569, 2000.

HART, B.L.; PRYOR, P.A. .Developmental and hair-coat determinants of grooming behaviour in goats and sheep. **Anim Behav**, v. 67, p. 11-19, 2004.

HENKES, L.E.; SILVA JR, W.A.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus-Ibage cattle populations. **Genet. Mol. Biol**, v. 28, p. 60 – 66, 2005.

HERNÁNDEZ, L. E.; PARRA, D. G.; MARIN, A. C. Accion repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus microplus*. **Rev. Colomb Cienc Quím Farmacéut**, v.16, p.17-21, 1987.

HITCHCOCK, L.F. Studies on the parasitic stages of cattle ticks, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). **Aust. J. Zool.**, v. 3, p. 145 - 155, 1955.

HOCHREITER, S.; BODENHOFER, U.; HEUSEL, M.; MAYR, A.; MITTERECKER, A.; KASIM, A.; KHAMIAKOVA, T.; SANDEN, S.V.; LIN, D.; TALLOEN, W.; BIJNENS, L.; GÖHLMANN, H.W.H.; SHKEDY, Z.; CLEVERT, D.A. FABIA: factor analysis for bicluster acquisition. **Bioinform**, v. 26, p. 1520–1527, 2010.

HONER, M.R.; GOMES, A. **O manejo integrado de mosca dos chifres, berne e carrapatos em gado de corte**. Local: Embrapa-CNPQC, 1990. (Circular Técnica, 22).

HORN, SC. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Bol. Def. San. Animal**, 79 p, 1983.

IMAMURA, S, DA SILVA VJ, SUGINO M, OHASHI K, ONUMA M: A serine proteinase inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. **Vacc**, v. 23, p. 1301-1311, 2005.

IMAMURA, S., NAMANGALA, B., TAJIMA, T., TEMBO, M. E., YASUDA, J., OHASHI, K. AND ONUMA, M. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Vacc**, v. 24, p. 2230-2237, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2012.

JACKMAN, S.H.; YOAK, M.B.; KEERTHY, S.; BEAVER, B.L. Differential expression of chemokines in a mouse model of wound healing. **Ann Clin Lab Sci**, v. 30, p. 201–207, 2000.

JENKINSON, D. M. **The skin of domestic animals**. In 'Comparative Physiology and Pathology of the Skin', pp. 591-608, Blackwell: Oxford , 1965.

JENSEN, K., DE MIRANDA SANTOS, I.K.; GLASS, E.J. Using genomic approaches to unravel livestock (host)-tick pathogen interactions. **Trends in Parasitol.**, v. 23, p. 439-444, 2007.

JONGEJAN F, UILENBERG G. The global importance of ticks. **Parasitol**, v. 129, p. S3-S14, 2004.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Vet Parasitol**, v. 137, p. 1–10, 2006.

JONSSON, N.N., MAYER, D.G., MATSCHOSS, A.L., GREEN, P.E., ANSELL, J., Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high-yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.**, v. 78, p. 65– 77, 1998.

JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L., PEPPER, P., GREEN, P.E.,; ANSELL, J. Resistance of Holstein–Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Vet Parasitol**, v. 89, p. 297–305, 2000.

KAUFMAN, W.R.; PHILLIPS, J.E. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*: I. routes of ion and water excretion. **J. Exp. Biol.**, v. 58, p. 523–536, 1973.

KEMP, D. H., KOUDSTAAL, D., ROBERTS, J. A., AND KERR, J. D. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. **Parasitol**, v. 73, p. 123-36, 1976.

KESSLER, R.H.; SCHENCK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Embrapa-Cnpq, Campo Grande, 157p, 1998.

KETOH, G. K., KOUMAGLO HK, GLITHO IA, HUIGNARD J. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. **Fitoter**, v. 77, p. 506–510, 2006.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, v. 167, p. 95–107, 2010.

KOCH, H. G. Suitability of white-tailed deer, cattle and goats as hosts for the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J Kan Entomol Soc**, v. 61, p. 251–257, 1988.

KOLLER, W. W. **Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 25).

KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; COLGRAVE, M.L.; BAGNALL, N.H.; GOUGH, J.; BURNS, B.; PEARSON, R. Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Internat J Parasitol**, v. 40, p. 499–507, 2010.

KONGUWAN, K.; PIPER, E.; BAGNALL, N.; GOUGH, J.; RYAN, K.; MOOLHUIJZEN, P.; BELLGARD, M.; LEW, A.; JACKSON, L.; JONSSON, N. Microarray analysis of *Bos taurus* and *Bos indicus* animal to identify genes involved with tick resistance in cattle. International Symposium on Animal Genomics for Animal Health. Book of abstracts. Paris, France, October, p. 17, 2008.

LABARTHE, N.V. Biological control of tick populations: review and reflections. **Cad Saúde Públ**, v. 10, p.47-52, 1994.

LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, . T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., ET AL. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860–921, 2001.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Sci Vete**, v. 31, p. 1-11, 2003.

LIAO, M., ZHOU, J., GONG, H., BOLDBAATAR, D., SHIRAFUJI, R., BATTUR, B., NISHIKAWA, Y., FUJISAKI, K. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **J Insect Physiol.**, v. 55, p. 164-173, 2009.

LIMA, W.S., RIBEIRO, M.F., GUIMARAES, M.P., Seasonal Variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in Cattle in Minas Gerais State, Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 32, p. 375–380, 2000.

LOFTUS, R. T., MACHUGH, D. E., BRADLEY, D. G., SHARP, P. M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2757–2761, 1994.

LÓPEZ, C.; COLWELL, D.D; PANADERO, R., PAZA, A; PÉREZ, J; MORRONDO, P.; DIEZ, P.; CASCALLANA, J.L.; SANTAMARIA, V.; BRAVO, A. Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) larvae. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 108, p., 285–294, 2005.

MACHADO MA, AZEVEDO AL, TEODORO RL, PIRES MA, PEIXOTO MG, DE FREITAS C, PRATA MC, FURLONG J, DA SILVA MV, GUIMARÃES SE, REGITANO LC, COUTINHO LL, GASPARIN G, VERNEQUE RS. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus x Bos indicus*). **BMC Genomics**, v.11, p. 280, 2010.

MARADAY, J.A.O.; GONZALES, J.C. Efeitos das raças Santa Gertrudis e Aberdeen Angus em infestações de *B. microplus* (Canestrini, 1887): Dimensões e peso das fêmeas ingurgitadas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, v. 12, n.12, p.127-38. 1984.

MARCONDES, C B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Ed. Ateneu, 2001, p.263.

MARQUES, D.C. **Criação de bovinos**. UFMG: Minas Gerais, 586 p., 1969.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nat Rev Gene**, v. 10, p. 671- 682, 2011.

MARTINEZ M.L., MACHADO M.A., NASCIMENTO C.S. et al. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genet and Mol Res**, v. 5, p; 513– 24, 2006.

MASSARD, C.L.; FONSECA RAMOS N.; RODRIGUEZ M.; DE LA FUENTE J . Effect of vaccination with Gavac2 on the reduction in the number and frequency of acaricide treatments in cattle under production conditions in Brazil. In: DE LA FUENTE, J (Ed.). **Recombinant vaccines for the control of cattle tick. La Habana**. Cuba: Elfos Scientiae, 1995. p. 200–204.

MATTIOLI, R. C, JANNEH L, CORR N, FAYE JA, PANDEY VS, VERHULST A. Seasonal prevalence of ticks and tick-transmitted haemoparasites in traditionally managed N'Dama cattle with reference to strategic tick control in the Gambia. **Med Vet Entomol**, v. 4, p. 342-348, 2000.

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

MAULEON, H., BARRE , N . & PANOMA , S . Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Exp and Appl Acarol**, v. 17, p. 831–838, 1993.

MCLEOD, R.; KRISTJANSON, P. Final report of joint esys/ILRI/ACIAR TickCost project- economic impact of ticks and tick-borne disease to livestock in Africa, Asia and Australia. International Livestock. Research Institute, 1999.

MICHEL K, SUWANCHAICHINDA C, MORLAIS I, LAMBRECHTS L, COHUET A, AWONO-AMBENE PH, SIMARD F, FONTENILLE D, KANOST MR, KAFATOS FC. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, 1p. 6858-16863, 2006.

MILLEN, D.D.; PACHECO, R.D.L.; MEYER, P.M.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRIGONI, M.D.B . Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Ani Front**, v. 2, p. 46 – 52, 2011.

MIURA, Y.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S. A Limulus intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily: purification, characterization, and cDNA cloning. **J Biol Chem**, v. 269, p. 542-547, 1994.

MOORING, M. S.; MCKENZIE, A. A.; HART, B. L. Grooming in impala: role of oral grooming in removal of ticks and effects of ticks in increasing grooming rate. **Physiol and Behav**, v. 59, p. 965–971, 1996.

MOORING, M.S.; BLUMSTEIN, D.T.; STONER, C.T. The evolution of parasite-defence grooming in ungulates. **Biol J Linn Soc**, v. 81, p. 17–37, 2004.

MOORING, M.S.; PATTON, M.L.; REISIG, D.D.; OSBORNE, E.R.; KANALLAKAN, A.L.; AUVERY, S.M. Sexually dimorphic grooming in bison: the influence of body size, activity budget and androgens. **Anim Behav**, v. 72, p. 737 – 745, 2006.

MOORING, M.S.; SAMUEL, W.M. Tick defense strategies in bison: the role of grooming and hair coat. **Behav**, v. 135, p. 693 – 718, 1998.

MOOSBAUER, C.; MORGENSTERN, E.; CUVELIER, S.L.; MANUKYAN, D.; BIDZHEKOV, C.; ALBRECHT, S.; LOHSE, P.; PATEL, K.D.; ENGELMANN, B. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. **Blood**, 109, 995-1002, 2007.

MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; COSTA, A.J.; ROCHA, U.F.; ARDISSON, F.A. A comparative study of lesions caused by different parasitic stages of *Boophilus microplus* (Canestrini) in the skins of naturally infested taurine and zebuine hosts. The correlation of tick resistance with mast cell counts in the host's skin. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 29, p. 378 – 383, 1992.

MORRIS, C.A. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 481- 491, 2006.

MULENGA, A.; BLANDON, M.; KHUMTHONG, R. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. **Exp Appl Acarol.**, v. 41, p. 267-287, 2007.

MULENGA, A.; KHUMTHONG, R.; CHALAIRE, K.C. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. **BMC Genom**, v. 10, p. 217, 2009.

NAKATA, L.C. **Níveis de citocinas em bovinos (*Bos indicus*) desafiados com o carrapato *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887)**. 77 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), São Carlos, UFSCar, 2006.

NARI, A.; HANSEN, J.W. **Resistance of ecto-endoparasites: current and future solutions**. Paris: OIE, Sesson, 67., 1999.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet Parasitol**, v. 57, p. 153-165, 1995.

NELORE.

<http://www.nelore.org.br/hgxpp001.aspx?2,3,43,O,P,0,MNU;E;3;3;24;3;MNU> .Acesso em 04 de mar de 2012.

NELSON, W. A., CLIFFORD, C. M., BELL, J. F., AND HESTEKIN, B. *Polyplax serrata*; histopathology of the skin of louse-infested mice. **Exp. Parasitol**, v. 31, p. 194—202, 1972.

NIELSEN, S.; FROKIAER, J.; MARPLES, D.; KWON, T. H.; AGRE, P.; AND KNEPPER, M. A. Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 205–244, 2002.

NIKPAY,A.; NABIAN, S.; RAHBARI,S.; SHAYAN,P; ALIDADI, N. Detection of Humoral Immune Response of Calves to *Boophilus annulatus* by ELISA. **Iranian J Parasitol**, v. 3, p. 26-30, 2008.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. **Immunol**, v.55, p.157 – 163, 1985

NUTTALL, P.A.; LABUDA, M. Tick – host interactions: saliva- activated transmission. **Parasitol**, v. 129, p. S177 – S190, 2004 .

NYGAARD, A.B.; JORGENSEN, C.B.; CIRERA, S.; FREDHOLM, M, Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR, **BMC Mol Biol**, v,8, 2007, DOI:10.10186/1471-2199-8-67.

O'KELLY, J.C.; SEEBECK, R.M.; SPRINGELL, P.H. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*). II. Changes in blood composition. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 24, p. 381–389, 1971.

O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.G. Observations on body temperature of the host and resistance to the tick *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). **J. Med. Entomol**, v. 20, p. 298 – 505, 1983.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arq Bras Med Vet Zoo**, v.42, n.2, 127-135, 1987.

OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M.; S. M. **Nelore**: base genética e evolução seletiva no Brasil. Documento Embrapa, 49, 54p., 2002.

OLIVEIRA, M.C.S., ALENCAR, M.M., CHAGAS, A.C.S., GIGLIOTI, R., OLIVEIRA, H.N. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. **Vet Parasitol**, v. 166, p. 249 – 254, 2009.

OLIVEIRA, T.C.G.; ADAMS, P.L; NUTTALL, P.A.; STUART, D.L. Susceptibilidade de amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987), do Rio de Janeiro, Brasil, à carrapaticidas organofosforados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 38, p.205 -214 , 1986.

PEREIRA, M.C. et al. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus**: Biologia, controle e resistência. São Paulo: Ed. MedVet, 2008.

PFAFFL, M, W.; HORGAN, G.W.; DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucl Ac Res**, v, 30, n,9, p, 1 -10, 2002.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl Ac Res**, v.29, n.9, p. 2002 – 2007, 2001.

PIPER, E.K., JACKSON, L.A., BAGNALL, N.H., KONGSUWAN, K.K., LEW, A.E., JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet Immunol Immunopath**, v. 126, p. 110–119, 2008.

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. **Internat J Parasitol**, v. 40, p. 431–441, 2010.

PREVOT, P.P., ADAM, B.; BOUDJELTIA, K.Z.; BROSSARD, M.; LINS, L.; CAUCHIE, P.; BRASSEUR, R.; VANHAEVERBEEK, M.; VANHAMME, L.; GODFROID, E. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **J Biol Chem.**, v. 36, p. 26361-9, 2006

PRUETT, J.H., Immunological control of arthropod ectoparasites—a review. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 25–32, 1999.

PRUETT, J.H.; OLAFSON, P.U.; DAVEY, R.B. Serologically defined *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval antigens in BmLF3, a partially pure Sephacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Vet Parasitol**, v. 155, p. 264–272, 2008.

PRUETT, J.H.; UNTALAN, P.M.; DAVEY, R.B. Identification and partial purification of serologically define *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 148–157, 2006.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, p. 856 – 862, 2004.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *Bos taurus* macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. **J. Med. Entomol.**, v. 32, p. 338-345, 1995

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune response by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **J. Med. Entomol.**, v. 29, p. 818-826, 1992.

RAU, J.C.; BEAULIEU, L.M.; HUNTINGTON, J.A.; CHURCH, F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **J Thromb Haemost.**, v. 5 (Suppl 1), p. 102–115, 2007.

RECK JR., J., BERGER, M., TERRA, R.M., MARKS, F.S., DA SILVA VAZ JR., I., GUIMARAES, J.A., TERMIGNONI, C., Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Res. Vet. Sci.**, 86, 56–62, 2008.

REGITANO LCA, IBELLI AMG, GASPARIN G, MIYATA M, AZEVEDO ALS, COUTINHO LL, TEODORO RL, MACHADO MA, SILVA, MVGB, NAKATA LC et al. On the search for markers of tick resistance in bovines. **Dev Biol**, v. 132, p. 225–230, 2008.

REGITANO, L.C.A; OLIVEIRA, M.C.S; ALENCAR, M.M.; CARVALHO, M.E.; ANDRÉO, R.; MOREIRA, I.C.; NÉO, T.A.; BARIONI, W.; SILVA, A.M. **Avaliação da resistência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, EMBRAPA-Pecuária Sudeste, n. 9, 2006.

REIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Boletim da Diretoria de Produção Animal**, v. 17, p. 3-21, 1953.

RIBEIRO, J. M. C., MAKOUL, G. T. & ROBINSON, D. R. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. **J Parasitol**, v. 74, p. 1068–1069, 1988.

RIBEIRO, J. M. C., MAKOUL, G., LEVINE, J., ROBINSON, D. & SPIELMAN, A. Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of the tick, *Ixodes dammini*. **J Experim Med**, v. 161, p. 332–344, 1985.

RIBEIRO, A.R.B.; ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S; IBELLI, A.M.G. Heat tolerance of Nelore, Senepol x Nelore and Angus x Nelore heifers in the southeast region of Brazil. South African **J Anim Sci**, v. 39 (Supplement 1), p. 263 – 265, 2009.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick/host interactions. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 7, p. 15-20, 1989.

RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, D. R.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick. *Ixodes dammini*. **J Experim Med**, v. 161, p. 332-334, 1985.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 13, p. 532-50, 1962.

RIEK, R.F. Studies end the reaction of animals to infestation with tick. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust J Agricu Res**, v. 13, p. 532-549, 1962.

RIEK, R.F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. I. Tick anaemia. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 8, p. 209–214, 1957.

RIEK, R.F., Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v. 32, p. 204–208, 1956.

ROBERTS, J. A. Behaviour of larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini), on cattle of differing degrees of resistance. **J. Parasitol**, v. 57, p. 651-6, 1971

ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifested. **J Parasitol**, v. 54, p. 663-666, 1968.

ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, P.R; LEITE, R.C. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1235- 1242, 2006.

RUIJTER, J.M., RAMAKERS, C., HOOGAARS, W., BAKKER, O., VAN DEN HOFF, M.J.B., KARLEN, Y., MOORMAN, A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucl Ac Res**, v. 37, e45, doi:10.1093/nar/gkp0, 2009.

SAMISH, M. et al. Biological control of ticks. **Parasitol**, v. 129, p. 389–403, 2004.

SANTIAGO, A.A. **Os cruzamentos na pecuária bovina**. São Paulo: Ed. Instituto Zootecnia, 549p, 1975.

SATO, S.; TARUMIZU, K. Heart rates before, during and after allo-grooming in cattle (*Bos taurus*). **J. Ethol.**, v. 11, p. 149–150, 1993.

SCHLEGER, A.V.; LINCOLN, D.T. ; BOURNE, A.S. Arteriovenous Anastomoses in the Dermal Vasculature of the Skin of *Bos taurus* cattle, and their Relationship with resistance to the Tick, *Boophilus microplus*. **Aust. J. Bioi: Sci.**, v. 34, p. 27-35, 1981.

SEIDEL, M. Automated analytical microarrays: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, p. 1521–1544, 2008.

SENEPOL.

http://senepol.org.br/?pid=inc/inc_conteudo.php&id_grupo=76&id_conteudo=62 ,
Acesso em: 04 de mar de 2012.

SILVA, A.M., ALENCAR, M.M., REGITANO, L.C.A., OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, p. 1477 – 1482. 2010.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S.; BARIONI JÚNIOR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genet Mol Biol.**, v. 30, p. 1150-1155, 2007.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. 286p.

SILVERMAN GA, WHISSTOCK JC, ASKEW DJ, PAK SC, LUKE CJ, CATALTEPE S, IRVING JA, BIRD PI. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, p. 301-325, 2004.

SINGH, N.K.; GHOSH, S. Experimental immunisation of crossbred cattle with glycoproteins isolated from the larvae of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Exp Appl Acarol**, v. 31, p. 297 – 314, 2003.

SNOWBALL, G.J. The effect of self-licking by cattle on infestation of cattle tick, *Boophilus microplus*. **Aust. J. agric. Res.**, v. 7, p. 227 – 232, 1956.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. Oxford University Press: Oxford, 1993.

SPALENZA, V.; GIROLAMI, F.; BEVILACQUA, C.; RIONDATO, F.; RASERO, R.; NEBBIA, C.; SACCHI, P.; MARTIN, P. Identification of internal control genes for quantitative expression analysis by real-time PCR in bovine peripheral lymphocytes. **The Vet J**, 2010.

SPICKETT, A.M.; DE KLERK, D.; ENSLIN, C.B.; SCHOLTZ, M.M. Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a Bushveld region of South Africa. **Onderstepoort J Vet Res.**, v. 56, p. 245-50, 1989.

SPRINGELL, P.H.; O'KELLY, J.C.; SEEBECK, R.M. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*). III. Metabolic implication of blood volume, body water and carcass composition changes. **Aust. J. Biol. Sci.** v. 24, p. 1033–1045, 1971.

SUAREZ, C.E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Vet Parasitol**, v. 180, p 109-25, 2011

SZABÓ, M.P.; AOKI, V.L.; SANCHES, F.P.; AQUINO, L.P.; GARCIA, M.V.; MACHADO, R.Z.; BECHARA G.H. Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. **Vet Parasitol.**, v. 10, p. 115, 49-59, 2003.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. et al. Carga Parasitária de *Boophilus microplus* em vacas mestiças europeu x zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.2, p.223-228, 1994.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H. Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman_x Australian Illawarra Shorthorn cattle. **Aust Vet J**, v. 58, p. 41 – 46, 1982.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res**, v. 29, p. 885 – 895, 1978.

VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. **Parasitol**, v. 129, p. S83–S94, 2004.

VARGAS, M. S. et al. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à Amitraz. **Ciência Rural**, v. 33, p. 737-742, 2003.

VERÍSSIMO, C. J.; SILVA, R. G.; OLIVEIRA, A. A. D.; RIBEIRO, W. R.; ROCHA, U. F. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *B. microplus*. **B Ind Anim**, v. 54. n. 2, p. 1-10, 1997.

VERÍSSIMO, C.J.; BECHARA, G.H.; MUKAI, L.S; OTSUK, I.P.; ARCARO, J.R.P. Mast cell counts correlate with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick load in different cattle breeds. **Braz J Vet Pathol.**, v. 1, p. 81 – 87, 2008.

VERISSIMO, C.J.; NICOLAU, C.V.J.; CARDOSO, V.L.; PINHEIRO, M.G. Haircoat characteristics and tick infestation on Gyr (zebu) and crossbred (Holstein X Gyr) cattle. **Arch Zootec**, v. 51, p. 389 – 392, 2002.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. II. The dynamic of resistance in previously unexposed and exposed cattle. **Aus J Agric Res**, v. 29, p. 395-400, 1978.

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

WANG, H.; HENBEST, P.J.; NUTTALL, P. A. Successful interrupted feeding of adult *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae) is accompanied by reprogramming of salivary gland protein expression. **Parasitol**, v. 119, p. 143-149, 1999.

WANG, Y.H. ; REVERTER, A.; KEMP, D.; MCWILLIAM, S.M.; INGHAM, A.; DAVIS, C.A.; MOORE, R.J.; LEHNERT, S.A. Gene expression profiling of Hereford

Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. **Aus J Experim Agric**, v. 47, p. 1397–1407, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2131–2144, 2003.

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 41, p. 1-22, 1996.

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Vet Parasitol**, v. 101, p. 275-287, 2001.

WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. **Immunol**, v. 30, p. 311-316, 1976.

WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks: III. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunol**, v. 32, p. 457-465, 1977.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. K. Tick host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitol Today**, v. 13, p. 383-389, 1997.

WILKINSON, P. R. Selection of cattle for tick resistance and the effects of herds susceptibility on *Boophilus* population. **Aust. J. agric. Res.**, v. 13, p. 974, 1962.

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v. 18, p. 293-313, 1980.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, E. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick borne diseases. **Parasitol. Today**, v. 15, p. 258 – 262, 1999.

Apêndice

Apêndice A. Informação de 103 genes diferencialmente expressos pela análise de microarranjos. Log da razão da expressão negativos indica super expressão dos genes após o desafio.

Sonda Affymetrix	Log razão da expressão	Valor p	Nome do gene	Símbolo	Número de acesso	Crs
Bt.9980.1.S1_at	2.214	.001	peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1	NM_174573	8
Bt.21368.1.S1_s_at	1.961	.002	immunoglobulin light chain, lambda gene cluster	IGL@	CK977367	7
Bt.72.1.S1_at	1.758	.001	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	NM_174112	5
Bt.12490.1.S1_at	1.624	.006	immunoglobulin heavy chain constant gamma 1	IGHG1	X62916	1
Bt.12304.1.S1_at	1.504	.001	ISG15 ubiquitin-like modifier	ISG15	NM_174366	6
Bt.27757.1.S1_at	1.491	.001	chitinase 3-like 2 similar to chitinase 3-like 2	CHI3L2	CK849256	
Bt.7165.1.S1_at	1.330	.005	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	NM_174300	
Bt.15788.1.S1_a_at	1.285	.001	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	CK846889	
Bt.3686.1.S1_at	1.256	.006	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	NM_173923	
Bt.18504.1.S1_at	1.230	.002	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	CK974388	5
Bt.4675.1.S1_a_at	1.173	.000	myxovirus (influenza) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	NM_173940	
Bt.28449.1.S1_s_at	1.159	.014	immunoglobulin heavy chain constant gamma 1	IGHG1	CK973343	1
Bt.24467.1.S1_at	1.156	.000	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	CB530781	1
Bt.17195.1.A1_at	1.152	.001	NA	NA	CB427688	NA
Bt.9680.1.S1_at	1.123	.002	NA	NA	BM436242	NA
Bt.4802.1.S1_at	1.088	.003	Lactotransferrin	LTF	NM_180998	2
Bt.21368.2.S1_x_at	1.073	.014	immunoglobulin light	IGL@	CB450291	7

			chain, lambda gene cluster			
Bt.16201.2.A1_at	1.062	.002	S100 calcium binding protein A9	S100A9	CB452155	
Bt.19620.1.A1_at	1.047	.002	interferon-induced protein 44	IFI44	CK955157	
Bt.20891.1.S1_at	1.039	.001	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	CK960499	7
Bt.5238.1.S1_at	1.028	.002	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	CHI3L1	CK849654	6
Bt.10398.1.S1_at	1.025	.011	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	CK846010	
Bt.29477.1.A1_at	1.002	.002	similar to chitinase 3-like 2	CHI3L2	CK973613	
Bt.155.1.S1_at	0.982	.024	interleukin 8	IL8	NM_173925	
Bt.16201.1.S1_at	0.970	.003	S100 calcium binding protein A9	S100A9	CB417812	
Bt.11259.1.S1_at	0.965	.003	similar to putative ISG12(a) protein	ISG12(A)	CB456756	1
Bt.15675.1.S1_at	0.959	.003	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4	ADAMTS4	NM_181667	
Bt.12553.1.S1_at	0.951	.003	Haptoglobin	HP	CB534474	8
Bt.4210.1.A1_a_at	0.948	.013	kininogen 1	KNG1	NM_175774	
Bt.9179.1.A1_at	0.928	.001	similar to mCG142721	RNF213	BM251565	9
Bt.25655.2.A1_at	0.927	.012	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	CYP4F3	CK953688	
Bt.4748.1.S1_at	0.913	.003	superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	NM_201527	
Bt.1983.1.S1_at	0.912	.014	jumonji domain containing 2B	JMJD2B	AW482092	
Bt.571.1.S1_at	0.881	.014	lingual antimicrobial peptide	LAP	NM_203435	7
Bt.154.1.S1_at	0.862	.035	chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	NM_174007	9
Bt.24813.1.A1_at	0.858	.002	receptor (chemosensory) transporter protein 4	RTP4	CK771386	

Bt.12490.2.A1_x_at	0.845	.009	IgG2a heavy chain constant region	IgCgamma	CK849860	NA
Bt.20785.1.A1_at	0.824	.005	interferon-induced protein 44	IFI44	CK777675	
Bt.23042.1.S1_at	0.820	.002	metallothionein 1E	MT1E	BE685559	8
Bt.11061.1.S1_at	0.780	.003	tenascin C	TNC	CB165401	
Bt.26655.1.S1_at	0.761	.022	chemokine (C-C motif) ligand 19	CCL19	BM032120	
Bt.9560.1.S1_at	0.756	.002	chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	NM_174263	
Bt.5259.1.S1_at	0.748	.003	XIAP associated factor 1	XAF1	CK770588	9
Bt.6406.1.S3_at	0.745	.006	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	CK950451	4
Bt.2939.1.A1_at	0.332	.012	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)	MOV10	CK770670	
Bt.24650.1.S1_a_at	0.195	.007	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	PIN4	BE751228	NA
Bt.11574.1.A1_at	0.195	.009	serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	SERPINC1	CB165211	6
Bt.4706.1.S1_at	.425	.002	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	PPP1R1B	NM_174647	9
Bt.12283.1.A1_at	.429	.022	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	DIRAS3	BI681319	
Bt.28333.1.S1_at	.430	.050	gastric intrinsic factor (vitamin B synthesis)	GIF	CK967007	5
Bt.3213.1.A1_at	.433	.014	chordin-like 1	CHRD1	CA035043	X
Bt.20450.1.S1_at	.433	.012	NA	NA	CK775116	NA
Bt.4886.1.A1_at	.433	.012	leucine rich repeat containing 17	LRR17	CK848705	
Bt.3170.2.S1_at	.434	.033	mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	CB535987	2
Bt.24618.1.S1_at	.435	.015	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	DBP	CK845993	8
Bt.14176.2.S1_at			TIMP			

	.435	.009	metallopeptidase inhibitor 2	TIMP2	AV668221	9
Bt.8669.2.S1_at	.439	.008	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	MBOAT2	AW658325	1
Bt.9325.1.A1_at	.441	.002	NA	NA	BM253957	NA
Bt.17298.1.S1_at	.442	.004	hypothetical protein LOC534992	C2orf43	AV594753	1
Bt.19120.1.A1_at	.444	.047	NA	NA	CB534669	NA
Bt.8964.2.S1_a_at	.445	.001	phosphatase 1, regulatory subunit 1A (inhibitor)	PPP1R1A	BI536562	
Bt.20955.1.A1_at	.448	.008	NA	NA	CB466303	NA
Bt.27689.1.A1_at	.454	.008	inducible WNT1 signaling pathway protein 2	WISP2	CK941373	3
Bt.19506.1.A1_at	.465	.009	NA	NA	CB464584	NA
Bt.19922.1.S1_at	.467	.013	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	HPD	CB530225	7
Bt.20747.1.S1_at	.468	.006	lymphocyte antigen 75	LY75	AY264845	
Bt.23807.1.A1_at	.470	.019	NA	NA	BP101718	NA
Bt.3704.3.A1_at	.471	.014	stathmin-like 2	STMN2	CK835795	4
Bt.9578.1.S1_at	.471	.022	phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	PPP1CC	NM_174581	7
Bt.17707.1.A1_at	.472	.018	NA	NA	CB433359	NA
Bt.15958.2.A1_a_at	.473	.014	similar to ATP-binding cassette, subfamily B, member 4	LOC781361	CB460964	
Bt.28692.1.S1_at	.486	.006	similar to aldehyde oxidase 2	LOC518393	CK972962	
Bt.227.1.A1_at	.492	.018	glutathione S-transferase alpha 1	GSTA1	NM_177515	3
Bt.22595.1.S1_at	.509	.005	NA	NA	CA923335	NA
Bt.583.1.S1_a_at	.510	.031	kappa casein	CSN3	NM_174294	
Bt.3448.1.S1_at	.511	.009	mitogen-activated protein kinase 6	MAPK6	CB447596	NA
Bt.29668.1.A1_at	.515	.006	NA	NA	CK983070	NA
Bt.23605.1.S1_at	.516	.022	nuclear receptor	NR1D1	CK954577	9

			subfamily 1, group D, member 1			
Bt.18995.1.A1_a_at	.517	.005	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	CPEB1	CK775981	1
Bt.15842.1.S1_at	.520	.011	thyroid hormone responsive (SPOT14 homolog, rat)	THRSP	CK848521	9
Bt.6000.2.S1_at	.528	.006	NA	NA	CF930613	NA
Bt.12706.1.A1_at	.529	.005	NA	NA	CA035726	NA
Bt.17242.1.A1_at	.532	.014	cytochrome P450 subfamily 2B	CYP2B	CK954048	8
Bt.24887.1.S1_at	.534	.002	E74- like factor 5 (ets domain transcription factor)	ELF5	BG692694	5
Bt.20399.1.S1_at	.538	.007	hydroxysteroid (17- beta) dehydrogenase 13	HSD17B13	CB534547	
Bt.12819.1.S1_at	.557	.002	NA	NA	CA923379	NA
Bt.20955.2.S1_at	.558	.003	NA	NA	BM089287	NA
Bt.227.3.A1_a_at	.569	.022	glutathione S- transferase A1	GSTA1	CB446549	3
Bt.28305.1.S1_at	.581	.002	similar to hepatocellular carcinoma antigen gene 520	LOC515280	CK946096	5
Bt.24180.1.A1_at	.586	.010	aldo- keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	AKR1C3	CB530134	3
Bt.23228.1.S1_at	.594	.002	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	FAIM2	CB165705	
Bt.16720.1.A1_at	.599	.002	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	CB460219	
Bt.12924.1.S1_at	.613	.010	brain ribonuclease	BRB	NM_173891	0
Bt.227.2.A1_a_at	.625	.018	glutathione S- transferase A1	GSTA1	U49179	3
Bt.19174.1.A1_at	.638	.019	similar to germ cell-less	LOC786530	CB456582	X
Bt.29017.1.A1_at	.732	.033	NA	NA	CK950733	NA

Bt.28964.1.A1_at	.753	.006	similar to Uncharacterized protein C18orf34	LOC532148	CK948590	4
Bt.14669.2.A1_at	.927	.014	hydroxysteroid (17- beta) dehydrogenase 13	HSD17B13	CB461503	
Bt.23375.1.S1_at	.020	.001	NA	NA	CF767970	NA
Bt.15836.1.S1_at	.194	.001	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	ANKRD1	CB168998	6
Bt.16712.1.A1_at	.735	.000	aquaporin 5	AQP5	CB454267	