

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
SUBÁREA GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Raquel Moraes de Paiva

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
METABOLISMO LIPÍDICO DE MACRÓFAGOS EM ANIMAIS
TAURINOS E ZEBUÍNOS ESTIMULADOS COM SALIVA DO
CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

Tese
Juiz de Fora
2019

RAQUEL MORAIS DE PAIVA

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
METABOLISMO LIPÍDICO DE MACRÓFAGOS EM ANIMAIS
TAURINOS E ZEBUÍNOS ESTIMULADOS COM SALIVA DO
CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado
Co-orientadora: Dra. Wanessa Araújo Carvalho

Juiz de Fora
2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Morais de Paiva, Raquel.

AVALIAÇÃO, IN VITRO, DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABOLISMO LIPÍDICO DE MACRÓFAGOS EM ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS ESTIMULADOS COM SALIVA DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* / Raquel Moraes de Paiva. -- 2019.

163 p.

Orientador: Marco Antonio Machado

Coorientadora: Wanessa Araújo Carvalho

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Carrapato. 2. Resistência. 3. Bovino. 4. NFκB. 5. PTGDS. I. Machado, Marco Antonio, orient. II. Araújo Carvalho, Wanessa, coorient. III. Título.


RAQUEL MORAIS DE PAIVA

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABOLISMO
LIPÍDICO DE MACRÓFAGOS EM ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS
ESTIMULADOS COM SALIVA DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

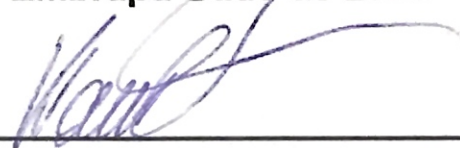
Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14 / 03 / 2019


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marco Antonio Machado
Orientador
Embrapa Gado de Leite



Dra. Wanessa Araújo Carvalho
Coorientadora
Embrapa Gado de Leite




Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Patrícia Elaine de Almeida
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Lucas Lima Verardo
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Dr. Andrey Pereira Lage
Universidade Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFJF, instituição da qual sou aluna desde a graduação, à CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos. E às demais fontes financiadoras do projeto, CNPq, Embrapa e FAPEMIG. Em especial à Embrapa, que foi o local onde tudo foi possível.

Agradeço aos meus pais, Rosângela e Jesus, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando e pelos valores e educação oferecidos.

Ao meu marido, Victor, pelo amor, companheirismo e por ser compreensivo nos momentos que fomos obrigados a abrir mão do que queríamos pelo futuro um do outro, mesmo que isso nem sempre tenha sido decidido sem alguma discussão.

Gostaria de agradecer também aos meus orientadores, o professor doutor Marco Antonio Machado, por todo o apoio e, em especial, à doutora Wanessa Araújo de Carvalho pela orientação e dedicação. Aprendi e cresci muito nestes quatro anos trabalhando junto a essa equipe da Embrapa Gado de Leite.

Ao doutor Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva pelo fornecimento de equipamento e tutoria nas análises de bioinformática.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, principalmente ao Doutor John Furlong, à doutora Márcia Cristina de Azevedo Prata e à Michelle de Souza Muniz, sem os quais nada disso teria sido possível.

Aos técnicos e demais funcionários e estagiários do CEJHB em Coronel Pacheco, em especial ao Klinger Aparecido de Souza, à Regina Maxima de Lima e ao Geovane Goncalves de Souza, que me ajudaram em tantas coletas.

Aos amigos do Laboratório de Nanotecnologia, pela ajuda e assistência oferecidas.

Ao pessoal do laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, pela força, companheirismo, pelas conversas e risadas. Cada momento ao lado dessas pessoas maravilhosas foram especiais e os levarei por toda a vida.

Ao professor doutor. Luiz Lehmann Coutinho, técnicos e alunos do Laboratório Multiusuário FAPESP, da ESALQ-USP (Piracicaba - SP), pela prestatividade em me ensinar um pouquinho sobre o sequenciamento de RNA que realizam.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

(1 Coríntios 13:2)

RESUMO

O parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* gera grandes perdas na produção de carne e leite por bovinos, além de representar um perigo para a saúde única, tanto pela transmissão de doenças infecciosas quanto pela contaminação do alimento e meio ambiente por acaricidas, principal metodologia adotada por produtores para controle de infestações por esse ectoparasito hematófago. As características fenotípicas de resistência e susceptibilidade ao *R. microplus* são bem definidas entre as raças de bovinos zebuínas (*Bos primigenius indicus*) e taurinas (*Bos primigenius taurus*), respectivamente, constituindo uma herança genética multifatorial de herdabilidade variável. Diversos trabalhos já identificaram a participação da imunidade inata e resposta de macrófagos no desenvolvimento de resistência contra a infestação por carrapatos. Apesar disso, até o momento, pouco se sabe acerca dos diferentes fenótipos de macrófagos, M1 (atividade pró-inflamatória; indutor de padrão Th1) e M2 (atividade regulatória; indutor de Th2), e sua influência na resistência ao carrapato apresentado por animais taurinos e zebuínos. Nesse contexto, o presente trabalho visa caracterizar as vias metabólicas envolvidas na ativação de macrófagos de animais taurinos e zebuínos para identificação de potenciais alvos de reprogramação metabólica por imunomodulação e genes candidatos para programas de melhoramento genético bovino. Para tal, foi estabelecido um protocolo de diferenciação de macrófagos a partir de monócitos isolados de sangue periférico de animais taurinos (Holandês Preto e Branco) e zebuínos (Gir), *in vitro*. Essas células foram estimuladas com lipopolissacarídeo, um potente indutor de macrófagos M1, e saliva do carrapato *R. microplus* que, em condições de parasitismo, é inoculada no hospedeiro para modular a resposta imune e facilitar a hematofagia. O RNA de macrófagos diferenciados foi extraído e submetido ao sequenciamento em massa (RNA-Seq) para identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs). Análises de ontologia gênica e rotas metabólicas demonstraram que macrófagos de animais zebuínos, sem estímulo, possuem uma maior ativação de genes ligados ao processamento e apresentação de antígenos, à ativação do fator de transcrição *NFκB* e ao controle indireto do ciclo celular através do metabolismo de lipídeos. Esse comprometimento com respostas mais pró-inflamatórias apresentado por macrófagos de animais zebuínos parece influenciar diretamente na ativação do fenótipo M1 via LPS com uma maior expressão de genes relacionados a síntese do óxido nítrico, de citocinas, como IL-1 e IL-36, além do fator *NFκB2*, que é responsável pelo controle da transcrição de moléculas com atividade pró-inflamatória. A saliva de *R. microplus* induziu diferenças significativas em vias de ativação da mitose e do potencial de membrana regulados pelo estresse oxidativo. Além disso, a saliva demonstrou capacidade de modular a expressão dos genes que codificam a enzima óxido nítrico sintase 2 (*NOS2*), o regulador negativo de espécies reativas de oxigênio (*NRROS*), e a citocina IL-10 em macrófagos estimulados com LPS, avaliados por PCR em tempo real. Esses resultados, em conjunto, permitiram indicar genes candidatos para resistência ao carrapato em programas de melhoramento genético bovino bem como processos biológicos chave, passíveis de modulação, para desenvolvimento de estratégias mais eficazes e menos poluentes de controle do carrapato.

Palavras chave: Carrapato. Resistência. Bovino. *NFκB*. PTGDS.

ABSTRACT

The parasitism caused by *Rhipicephalus microplus* tick generates large losses in meat and milk production by cattle, as well as representing a unique health hazard due to the transmission of infectious diseases and the contamination of food and environment caused by acaricides, the main methodology adopted by producers for this hematophagous ectoparasite control. The phenotypic features of resistance and susceptibility to *R. microplus* are well defined between the zebu (*Bos primigenius indicus*) and taurine (*Bos primigenius taurus*) cattle breeds respectively, constituting a multifactorial genetic inheritance of variable heritability. Several papers have already identified the role of innate immunity and macrophage response against ticks. Despite this, little is known about the different phenotypes of macrophages M1 (proinflammatory activity, Th1 inducer) and M2 (regulatory activity, Th2 inducer), and its influences on tick resistance presented by taurine and zebu cattle. In this context, the present work aims to characterize the metabolic pathways involved in the activation of taurine and zebu macrophages to identify potential targets for metabolic reprogramming by immunomodulation and candidate genes for bovine genetic improvement programs. For this purpose, a macrophage differentiation protocol was established from *in vitro* isolation of peripheral blood monocytes of taurine (Holstein) and zebu (Gir) animals. The cells were treated with lipopolysaccharide (LPS), a potent inducer of M1 macrophages, and *R. microplus* tick saliva, which under parasitism conditions, is inoculated into the host to modulate the immune response and facilitate hematophagy. The RNA of differentiated macrophages were extracted and submitted to high throughput sequencing (RNA-Seq) for the identification of differentially expressed genes (DEGs). Gene ontology and metabolic pathways analysis showed that zebu non-stimulating macrophages have a greater activation of genes linked to the antigen processing and presentation, the activation of the NFκB transcription factor and the indirect control of the cell cycle through lipid metabolism. This macrophages implication, with more proinflammatory responses for zebu animals, seems to directly influence the M1 phenotype activation via LPS with a greater expression of genes related with nitric oxide synthesis, cytokines, such as IL-1 and IL-36, besides the NFκB2 factor, responsible in controlling the pro-inflammatory molecules transcription. The saliva of *R. microplus* tick induced significant differences in mitotic activation pathways and membrane potential regulated by oxidative stress. In addition, saliva demonstrated the ability in modulating the expression of genes encoding the nitric oxide synthase 2 enzyme (NOS2), the negative regulator of reactive oxygen species (NRROS), and the IL-10 cytokine in LPS-stimulated macrophages, evaluated by real time PCR. Taken together, these results, allowed us to identify candidate genes for tick resistance in breed genetic programs, as well as key biological process, which can be modulated for development of more effective strategies and less polluting tick control.

Keywords: Tick. Resistance. Bovine. NFκB. PTGDS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>R. microplus</i>	19
Figura 2. Efeitos da saliva e do extrato de glândula salivar nos macrófagos. As linhas vermelhas representam inibição e linhas verdes, enriquecimento.	31
Figura 3. Fontes de dados para estudo do fenótipo biológico de um organismo. Alguns componentes celulares são fontes importantes para análises em massa e obtenção de informações acerca de um determinado fenótipo biológico de um organismo observado.	34
Figura 4. Infestação artificial de bovinos.	40
Figura 5. Carrapatos <i>R. microplus</i> utilizados para obtenção de saliva.	41
Figura 6. Esquema representativo da metodologia utilizada pela plataforma Illumina®.	50
Figura 7. Caracterização da diferenciação de monócitos de sangue periférico bovino em macrófagos, <i>in vitro</i>	63
Figura 8. Eletroforese para análise qualitativa da saliva do carrapato <i>R. microplus</i>	64
Figura 9. Análise de integridade das bibliotecas de cDNA.	66
Figura 10. Gráfico representativo da qualidade das sequências por base.	69
Figura 11. Gráficos representativos dos parâmetros de qualidade do sequenciamento de cDNA.	70
Figura 12. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos estimulados com lipopolissarídeos de <i>E. coli</i> (LPS) <i>in vitro</i>	75
Figura 13. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos, sem estimulação, <i>in vitro</i>	76
Quadro 1. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEGs) no contraste entre macrófagos não estimulados de animais taurinos e zebuínos.	77
Quadro 2. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, <i>in vitro</i> , sem estimulação.	80
Figura 14. Via da síntese de prostaglandinas e tromboxanos destacando DEGs entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos não estimulados.	82
Figura 15. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com LPS, <i>in vitro</i>	83
Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos.	85

Quadro 4. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, <i>in vitro</i> , tratados com LPS.....	91
Figura 16. Vias componentes da sinalização de TLR4 contendo DEGs entre macrófagos de animais taurinos (HPB, n = 4) e zebuínos (Gir, n = 4) tratados com LPS..	93
Figura 17. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com saliva de <i>R. microplus</i> , <i>in vitro</i>	94
Quadro 5. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos, tratados com saliva de <i>R. microplus</i> , <i>in vitro</i>	95
Quadro 6. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, <i>in vitro</i> , tratados com saliva de <i>R. microplus</i>	97
Figura 18. Vias metabólicas contendo DEGs entre macrófagos de animais taurinos (HPB, n = 4) e zebuínos (Gir, n = 4) tratados com saliva de carrapato <i>R. microplus</i> , diluída 1.000x.	98
Figura 19. Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de DEGs pelos macrófagos bovinos de animais taurinos <i>versus</i> zebuínos em resposta aos três diferentes estímulos.	99
Figura 20. Confirmação dos resultados obtidos no RNA-Seq por RT-qPCR.....	103
Figura 21. Modulação da expressão de genes relacionados aos fenótipos M1 e M2 de macrófagos de animais taurinos e zebuínos, <i>in vitro</i> , pela saliva do carrapato <i>R. microplus</i>	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos animais utilizados no experimento de RNA-seq.	44
Tabela 2. Sequências de <i>primers</i> utilizados para experimento de RT-qPCR.....	58
Tabela 3. Concentração e qualidade do RNA extraído dos macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos, <i>in vitro</i>	65
Tabela 4. Quantidades de cDNA das bibliotecas submetidas ao RNA-Seq.....	67
Tabela 5. Alinhamento das <i>reads</i> geradas pelo sequenciamento de cDNA de macrófagos no genoma de <i>Bos taurus</i> (UMD3.1.94).	72
Tabela 6. Lista dos 12 DEGs em comum nos macrófagos bovinos estimulados <i>in vitro</i>	100
Tabela 7. Condições estabelecidas para reações de RT-qPCR com base na eficiência dos <i>primers</i> para os alvos de amplificação gênica.	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

BSA	“Bovine Serum Albumin”; Albumina Sérica Bovina
CEJHB	Campo Experimental José Henrique Bruschi
Ct	“Cycle threshold”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” ; Ácido Desoxirribonucleico
DEGs	“Differential Expressed Genes” ; Genes Diferencialmente Expressos
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid” ; Ácido etilendiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária
EUA	Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MHC	“Major Histocompatibility Complex”; Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	“messenger RNA”; RNA mensageiro
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” ; Centro Nacional para Informação de Biotecnologia
NGS	“Next Generation Sequencing” ; Sequenciamento de Nova Geração
PBMC	“Peripheral Blood Mononuclear Cell”; Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	“Phosphate Buffered Saline”; Tampão Fosfato Salino
QTL	“Quantitative Trait Loci”; Locus de Característica Quantitativa
RT-qPCR	“Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative”; Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real
RIN	“RNA Integrity Number” Número de Integridade do RNA
RNA	“Ribonucleic Acid” Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	“RNA sequencing” Sequenciamento de RNA
RT	“Reverse Transcriptase” Transcriptase Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism”; Polimorfismo de nucleotídeo simples
TNF	“Tumor Necrosis Factor”; Fator de Necrose Tumoral
USDA	“United States Department of Agriculture”; Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O CARRAPATO <i>RIPHICEPHALUS MICROPLUS</i> : ASPECTOS GERAIS	18
2.2 DESTAQUE DA ATIVIDADE PECUÁRIA NO BRASIL E IMPACTOS GERADOS PELO PARASITISMO DO <i>R. MICROPLUS</i>	20
2.3 ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE ACARICIDAS PARA CONTROLE DE INFESTAÇÕES POR <i>R. MICROPLUS</i>	21
2.3.1 VACINAS ANTI-CARRAPATO	21
2.3.2 MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA AO CARRAPATO BOVINO	23
2.4 RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA: RELAÇÃO CARRAPATO-HOSPEDEIRO	24
2.5 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS E SUA PARTICIPAÇÃO NA RELAÇÃO CARRAPATO-HOSPEDEIRO	28
2.6 GENÔMICA FUNCIONAL NA CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES E METABÓLICAS	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 OBTENÇÃO DA SALIVA DO CARRAPATO <i>R. MICROPLUS</i> PARA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	39
4.1.1 INFESTAÇÃO POR <i>R. MICROPLUS</i> E ESTIMULAÇÃO PARA COLETA DE SALIVA	39
4.2 DIFERENCIAÇÃO E ESTÍMULOS DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS	42
4.2.1 ESCOLHA DOS ANIMAIS	42
4.2.2 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO BOVINO	44
4.2.3 ESTIMULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS APÓS DIFERENCIAÇÃO	46

4.3. PRAPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-SEQ).....	47
4.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	47
4.3.2 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA	47
4.3.3 PREPARO DA BIBLIOTECA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-SEQ).....	48
4.3.4 SEQUENCIAMENTO DE mRNA.....	50
4.4 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO	51
4.4.1 ANÁLISE DE QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO	51
4.4.2 INDEXAÇÃO DO GENOMA, MAPEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS	52
4.4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES	52
4.4.4 ONTOLOGIA GÊNICA	53
4.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE VIAS METABÓLICAS	53
4.5 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO RELATIVO (RT-qPCR) PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO DE RNA E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MACROFÁGICO	55
4.5.1 TRANSCRIÇÃO REVERSA	56
4.5.2. SÍNTESE DE <i>PRIMERS</i>	56
4.5.3 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-qPCR.....	59
4.5.4 REAÇÕES DE RT-qPCR E CÁLCULOS DE EXPRESSÃO	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS BOVINOS EM MACRÓFAGOS.....	62
5.1.1 ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i> : AVALIAÇÃO DA SALIVA DE CARRAPATO <i>R. MICROPLUS</i> E QUALIDADE DO MATERIAL GENÉTICO.....	63
5.2 SEQUENCIAMENTO DO mRNA DE MACRÓFAGOS BOVINOS E ANÁLISE DE PERFIL QUALITATIVO DO TRANSCRIPTOMA.....	65
5.2.1 ESTABELECIMENTO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA PARA SEQUENCIAMENTO.....	66
5.2.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO SEQUENCIMENTO DAS AMOSTRAS DE cDNA	68
5.2.3 ALINHAMENTO E CONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS NAS DIFERENTES AMOSTRAS.....	71

5.3. ANÁLISE EXPERIMENTAL DAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS FRENTE AOS DIFERENTES ESTÍMULOS DE ATIVAÇÃO.....	73
5.3.1 VALIDAÇÃO DOS ESTÍMULOS EXPERIMENTAIS NA ATIVAÇÃO CELULAR DOS MACRÓFAGOS	74
5.3.2 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS SEM ESTIMULAÇÃO	75
5.3.3 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS TRATADOS COM LPS: CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE RESPOSTA M1 EM BOVINOS	83
5.3.4 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS TRATADOS COM SALIVA DE <i>R. MICROPLUS</i>	94
5.4 INDICAÇÃO DE GENES ALVO PARA PROGRAMAS MELHORAMENTO	99
5.5 RT-qPCR PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO DE RNA E CARACTERIZAÇÃO DE POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS	101
DISCUSSÃO.....	107
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
APÊNDICE A - LISTA DE DEGs DO CONTRASTE CONTROLE NEGATIVO <i>VERSUS</i> LPS ..	145
APÊNDICE B - LISTA DE DEGs DO CONTRASTE TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS SEM ESTIMULAÇÃO	150
APÊNDICE C - LISTA DE DEGs DO CONTRASTE TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS TRATADOS COM LPS.....	152
APÊNDICE D - LISTA DE DEGs DO CONTRASTE TAURINOS <i>VERSUS</i> ZEBUÍNOS TRATADOS COM SALIVA DO CARRAPATO <i>R. MICROPLUS</i>	159
APÊNDICE E - LISTA DE DEGs COMPARTILHADOS ENTRE MACRÓFAGOS DE TAURINOS E ZEBUÍNOS TRATADOS COM CONTROLE NEGATIVO E LPS.....	161
APÊNDICE F - LISTA DE DEGs COMPARTILHADOS ENTRE OS MACRÓFAGOS DE TAURINOS E ZEBUÍNOS TRATADOS COM CONTROLE NEGATIVO E SALIVA DE <i>R. MICROPLUS</i>	162
APÊNDICE G - LISTA DE DEGs COMPARTILHADOS ENTRE OS MACRÓFAGOS DE TAURINOS E ZEBUÍNOS TRATADOS COM SALIVA DE <i>R. MICROPLUS</i> E LPS	163

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo (232,35 milhões de cabeças), sendo importantíssimo para o agronegócio brasileiro, contribuindo significativamente para a balança comercial do país (IBGE, 2018). O Brasil é, atualmente, o sexto maior produtor de leite e o maior produtor e exportador de carne bovina do mundo (IBGE, 2018; USDA, 2018). Contudo, a infestação de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, principal ectoparasito que afeta a produção pecuária no mundo, leva a consideráveis perdas econômicas em regiões tropicais e subtropicais (JONSSON, 2006; RODRIGUES E LEITE, 2013; GRISI et al., 2014). A infestação por esse ectoparasito pode causar danos diretos ao hospedeiro, como diminuição da produção de leite e carne, perda de peso, anemia e morte, além de prejuízos indiretos pela transmissão de patógenos como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. (ALONSO et al., 1992). O controle do carrapato bovino é feito, basicamente, com acaricidas e representa uma ameaça à saúde humana, pela presença de resíduos na carne e no leite, e ao meio ambiente, pela contaminação gerada pelo seu uso (FURLONG E PRATA, 2005). Nesse sentido, pesquisas são conduzidas no mundo inteiro com o intuito de encontrar alternativas de controle das infestações por carrapatos, como a descoberta de marcadores genéticos para uso em programas de melhoramento e desenvolvimento de vacinas (MATTHEWSON et al., 1976; WALKER, 1994; NARI E HANSEN, 1999; RAJPUT et al., 2006; MACHADO et al., 2010; NIKPAY E NABIAN, 2016; OTTO et al., 2018). Embora apresentem resultados promissores, as vacinas atualmente desenvolvidas a partir do antígeno Bm86 (proteína imunogênica do tubo digestivo do carrapato), conferem apenas proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações por *R. microplus* (ANDREOTTI E GOMES, 2003; DE LA FUENTE et al., 2007). Esse panorama indica a necessidade do desenvolvimento de outras metodologias de controle ou incremento das vacinas existentes para melhor proteção do rebanho a campo.

A resposta imune desencadeada contra agentes infecciosos e ectoparasitos é decisiva para a eliminação do patógeno, desenvolvimento de memória imunológica, reestabelecimento da homeostase e, conseqüentemente, da produtividade do animal (BROSSARD E WIKEL, 1997). A lesão causada pela fixação do carrapato na pele dos

seus hospedeiros ativa a imunidade inata que abrange mecanismos humorais, como o sistema complemento, e celulares mediados por macrófagos, leucócitos, células dendríticas, entre outras, culminando na inflamação local (FUHLBRIGGE, 2004; FRANCISCHETTI, et al., 2009; KUPPER E MARTINON et al., 2009; NESTLE et al., 2009; CLARK, 2010). Em contrapartida, para garantir um repasto sanguíneo eficiente, o *R. microplus* inocula sua saliva, que apresenta atividades imunomoduladora, anti-hemostática e vasoativa no local da fixação (RIBEIRO, 1995; BOWMAN et al., 1997; WIKEL E BERGMAN, 1997; OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA et al., 2017). Os macrófagos são células do sistema imune inato responsáveis pela ativação de mecanismos humorais, como a produção de complemento e proteínas de fase aguda, e da imunidade adaptativa, via secreção de citocinas, quimiocinas e da apresentação de antígenos para as células T e B (MANTOVANI et al., 2004; MURRAY E WYNN, 2011; DOEBEL et al., 2017). Os macrófagos podem apresentar dois perfis de resposta muito bem caracterizados na literatura para murinos e humanos: o fenótipo M1, pró-inflamatório, com ação microbicida, e o fenótipo M2, com ação anti-inflamatória, atuando no reparo tecidual (MOSSER E EDWARDS, 2008). Vale ressaltar que a polarização do perfil dos macrófagos ocorre de acordo com o ambiente estimulatório em que se encontram (ITALIANI E BORASCHI, 2014).

Sabe-se que bovinos apresentam fenótipos contrastantes de resistência a diversas parasitoses e doenças infecciosas, inclusive à infestação pelo carrapato *R. microplus*, onde animais de raças zebuínas, *Bos primigenius indicus*, de origem asiática, são mais resistentes que os de raça taurina, *Bos primigenius taurus*, de origem europeia (UTECH, 1978; MACHUGH et al, 1997; BRADLEY et al., 1998; WAMBURA et al., 1998; ESTRADA-PENA, 2006; BIEGELMEYER et al., 2015; GARCIA et al., 2017). Apesar de diversos fatores relacionados ao desenvolvimento da resposta imune protetora contra o *R. microplus* em hospedeiros resistentes estarem relacionados à atividade de macrófagos (FRANCISCHETTI et al., 2009; CARVALHO et al., 2014; TABOR et al., 2017), pouco se sabe sobre a ativação desse subtipo celular, o que poderia contribuir significativamente para o entendimento dos fenótipos de resposta a doenças parasitárias e infecciosas apresentados por raças bovinas taurinas e zebuínas. Sabe-se que a saliva do *R. microplus*, assim como de outros carrapatos ixodídeos, apresenta atividade moduladora e imunossupressora que afetam a resposta de macrófagos (NESTLE et al., 2009; BOWEN et al., 2010; BRAKE et al., 2010; BRAKE E PÉREZ DE LEÓN, 2012; PASPARAKIS et al., 2014; SUN et al., 2018; ABREU et al.,

2019). No entanto, até o momento, somente Brake e Pérez de León (2012) avaliaram a resposta de macrófagos bovinos nos quais o extrato de glândula salivar age inibindo moléculas co-estimulatórias e com produção de IL-12. Nesse contexto, o presente trabalho visa verificar se existe diferença na resposta imune desenvolvida por macrófagos diferenciados a partir de monócitos bovinos isolados de animais com fenótipos contrastantes de infestação estimulados com lipopolissacarídeo (LPS, um controle positivo de ativação de macrófagos M1) e a saliva do *R. microplus*, *in vitro*, além de caracterizar as rotas metabólicas envolvidas nesse processo. Os resultados obtidos serão essenciais para identificação de genes associados com a resposta imune protetora desenvolvida por animais resistentes para programas de melhoramento genético bovino. Também serão indicados processos celulares passíveis de intervenção por estratégias de modulação, direta ou indireta, objetivando reprogramar a resposta imune de animais susceptíveis de forma a torna-la o mais próximo do que é observado em animais resistentes. Avanços no conhecimento acerca da resposta de macrófagos de animais taurinos e zebuínos também serão de extrema utilidade para incremento da indústria de vacinas bovinas, podendo abrir portas para o desenvolvimento e/ou direcionamento estratégico de adjuvantes na área agropecuária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CARRAPATO *Rhipicephalus microplus*: ASPECTOS GERAIS

O carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) é um artrópode (filo Arthropoda), classe Arachnida, família Ixodidae, cujos membros são chamados de carrapato de corpo duro (POWELL E REID, 1982). Anteriormente denominado *Boophilus microplus*, sua reclassificação foi feita em 2003, baseada em análises moleculares e morfológicas (MURRELL E BARKER, 2003), incluindo este carrapato como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus* (VAZ JUNIOR et al., 2012). O *R. microplus* é um ectoparasito hematófago originário da Ásia, que se espalhou para grandes áreas de pecuária como a América do Sul (WALKER et al., 2014).

Carrapatos do gênero *Rhipicephalus* possuem hipostômio (parte do aparato bucal) relativamente pequeno, mas capaz de secretar grande quantidade de cimento ou cola, responsável pela forte fixação desses aos hospedeiros (FRANCISCHETTI et al., 2009). Quando aderidos aos hospedeiros, os carrapatos produzem saliva, que é uma mistura complexa de moléculas com diversas propriedades, e consiste no principal mecanismo de excreção de água (SAUER, 1997; BOWMAN E SAUER, 2004), alternando entre ingestão de sangue e salivação. O intestino do parasito bobeia água e eletrólitos para a hemocele (cavidade que contém a hemolinfa), que posteriormente retornam ao hospedeiro via saliva, enquanto que o alimento concentra-se no intestino (GREGSON, 1967; WALADDE et al., 1979).

Os carrapatos são categorizados de acordo com o número de hospedeiros que requerem para completar seu ciclo de vida. O *R. microplus* completa toda sua fase de vida parasitária sobre um mesmo hospedeiro sendo, portanto, monoxeno (KNOLHOFF E ONSTAD, 2014). Apesar de ser um parasito específico de bovinos, esse pode infestar também ovelhas, cavalos, veados, cães, cabras e outros animais, porém com baixa intensidade (GONZALES, 1975; GARCIA et al., 2014). O carrapato *R. microplus* possui duas fases de vida: uma livre e outra parasitária (Figura 1). A fase de vida livre se inicia após a queda da teleógina, a fêmea adulta acasalada e ingurgitada,

para realização da ovipostura no ambiente, cujos ovos dão origem às larvas infestantes. A fase de vida parasitária tem início com a instalação da larva infestante no hospedeiro, passando para larva parasitária, e várias transformações ocorrem até que o parasito se torne adulto (GONZALES, 1974; FURLONG, 1993).

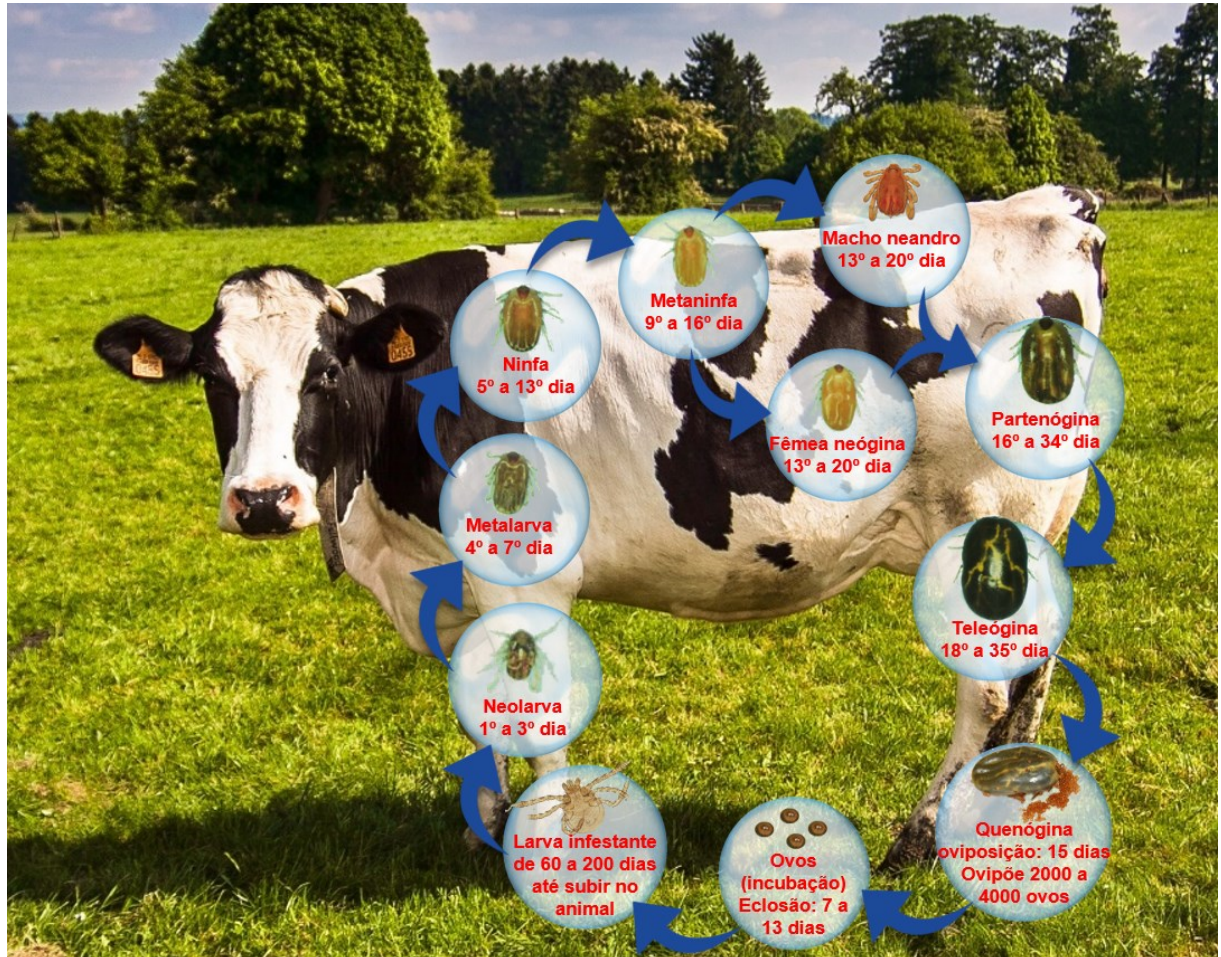


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *R. microplus*.

Em geral, considerando condições ótimas de temperatura e umidade, a queda/postura/eclosão do carrapato tem duração média de um mês (GONZALES, 1974). A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura, já a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1975).

2.2 DESTAQUE DA ATIVIDADE PECUÁRIA NO BRASIL E IMPACTOS GERADOS PELO PARASITISMO DO *R. microplus*

A bovinocultura constitui uma fonte de renda que aumenta a rotatividade do mercado econômico, sendo um dos setores mais importantes da economia nacional (CAVALCANTI E CARVALHO, 2017). O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo gerando crescimento em dois segmentos distintos, o de corte e o de leite (MAPA, 2017, 2018). Em 2015, o país ocupava a terceira posição mundial em exportação de carne e possuía uma produção de 35 bilhões de litros de leite (IBGE, 2015). Sua posição em produção de carne é crescente desde então, passando para maior exportador de carne desde 2017 (USDA, 2018), e com uma leve retração na produção de leite (33,5 bilhões de litros), atribuída à crise econômica do país (IBGE, 2018). Contudo, em 2018 a produção leiteira já saltou para 35,5 bilhões de litros e com projeções futuras entre 43,4 e 48,1 bilhões de litros até 2028 (MAPA, 2018). O valor bruto da produção de carne em 2018 foi de R\$70,6 bilhões (MAPA, 2018) e de leite foi de R\$31,95 bilhões (SEAPA, 2019). Destaca-se ainda o número de empregos gerados pela agropecuária, que é superior a 8 milhões (CEPEA, 2018).

O ganho econômico gerado pela pecuária é significativamente ameaçado por doenças infecciosas e ectoparasitos como os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, responsáveis por perdas econômicas expressivas estimadas, somente no Brasil, em U\$ 3,24 bilhões por ano (GRISI et al., 2014). Em 2013, Rodrigues e Leite atribuíram ao carrapato perdas calculadas em 90,24 litros na produção de leite por vaca em lactação apenas para o estado de Minas Gerais, o que contribui expressivamente para o prejuízo de U\$922,36 milhões no rebanho leiteiro nacional. Já as perdas econômicas no mercado de carnes conferidas ao *R. microplus* foram estimadas em U\$3.236,35 milhões (GRISI et al., 2014).

Os impactos diretos na produção pecuária causados pelo parasitismo do carrapato se devem às reações inflamatórias na pele, que causam irritabilidade, perda de sangue, acarretando na redução de peso, míases secundárias e consequentes danos no couro, e ainda a possibilidade de transmissão dos agentes da tristeza parasitária bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*; ALONSO et al., 1992). Como consequência, os bovinos não pastam normalmente, o que diminui a taxa diária de conversão do alimento em carne e leite. Além disso, as condições do clima

tropical brasileiro favorecem a manutenção e o aumento da população do carrapato, acarretando assim em um desequilíbrio no seu controle. Infestações com carrapato também acarretam prejuízos indiretos ao produtor, relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, aquisição de equipamentos e carrapaticidas para aplicação nos animais (ANDREOTTI et al., 2016).

O principal métodos de controle do carrapato bovino é realizado durante a fase de vida parasitária pelo uso de acaricidas químicos que agem sobre o sistema nervoso do ectoparasita resultando na sua morte (TAYLOR, 2001). O uso indiscriminado de acaricidas no combate de carrapatos bovinos, geralmente realizado com pouca ou nenhuma orientação técnica adequada, culmina na contaminação do meio ambiente, carne e leite (FURLONG E PRATA, 2005; DE MENEGHI et al., 2016), além de selecionar estirpes resistentes de parasitos (MILLER et al., 2013; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2013; VUDRIKO et al., 2016; COSSÍO-BAYÚGAR et al., 2018). Dessa forma, é crescente a preocupação com o desenvolvimento de estratégias alternativas e sustentáveis de controle das infestações por carrapatos em bovinos, dada sua consolidação como um problema de saúde única no mundo representados pelos danos direto e indireto ao meio ambiente, animais e humanos (OIE, 2019).

2.3 ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE ACARICIDAS PARA CONTROLE DE INFESTAÇÕES POR *R. microplus*

2.3.1 VACINAS ANTI-CARRAPATO

O uso de vacinas pode representar uma forma de prevenir as infestações e a seleção de carrapatos resistentes aos acaricidas, reduzindo os danos ambientais e resíduos em alimentos derivados da produção pecuária (GUERRERO et al., 2012). Os antígenos utilizados em vacinas contra ectoparasitos podem ser classificados como expostos ou ocultos (MANJUNATHACHAR et al., 2014). Antígenos expostos são aqueles que entram em contato direto com o sistema imune do hospedeiro e são continuamente expostos a eles durante a fase parasitária, como, por exemplo, componentes da saliva ou da cutícula do carrapato. Já os antígenos ocultos são

aqueles que não são expostos diretamente ao sistema imune do hospedeiro, como o epitélio intestinal do carrapato, e que, portanto, precisam de reforço contínuo da vacina para manter níveis altos de titulação dos anticorpos (MANJUNATHACHAR et al., 2014). Baseado no conceito de antígeno oculto, Willadsen et al. (1989) identificaram e demonstraram a eficácia do antígeno vacinal Bm86, proteína imunogênica do tubo digestivo de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Anticorpos anti-Bm86, produzidos pelos hospedeiros imunizados, culminaram em lesões do tecido intestinal do carrapato, reduzindo o número de fêmeas ingurgitadas, fecundidade e a produção de larvas (CANALES et al., 1997). Atualmente, existem duas vacinas comercialmente disponíveis baseadas no antígeno Bm-86, são elas: a australiana TickGARD® (WILLADSEN et al., 1995) e a Gavac® (CANALES et al., 1997), liberada em países da América Latina. Apesar de comercializadas, ambas as vacinas apresentam baixa eficácia à campo e necessitam do uso concomitante com acaricidas em regime de banho estratégico do gado, sendo importante para reduzir, e não necessariamente eliminar, infestações em locais endêmicos (PEREIRA et al., 2008). Ademais, Garcia-Garcia et al. (2000) revelaram polimorfismos no gene Bm86 que poderiam afetar sua expressão resultando em uma proteína solúvel ao invés de ancorada à membrana celular, diminuindo a efetividade das vacinas, uma vez que os anticorpos não provocariam lesão intestinal, mas sim indisponibilização da Bm86 solúvel. Nesse sentido, ultimamente, alternativas de entrega e diversos antígenos recombinantes baseados na sequência gênica da Bm86 têm sido testadas com intuito de melhorar a eficácia das vacinas (MANJUNATHACHAR et al., 2014; VALLE E GUERRERO, 2018). Da mesma forma, estudos voltados para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes têm sido realizados no mundo inteiro, identificando diversos outros antígenos candidatos, inclusive secretados na saliva do carrapato (LEW-TABOR et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2016; KUMARA et al., 2017; MARUYAMA et al., 2017; CSORDAS et al., 2018). Apesar de todos os esforços, até o momento, não existem alternativas vacinais com alta eficácia para controle do *R. microplus* a campo, sendo necessárias maiores informações acerca da imunidade bovina e relação parasito-hospedeiro que subsidiem avanços significativos na identificação de novos antígenos e adjuvantes específicos para bovinos.

2.3.2 MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA AO CARRAPATO BOVINO

Os bovinos constituem o único modelo animal no qual é possível examinar os desfechos distintos de resistência e susceptibilidade ao carrapato numa mesma espécie hospedeira. Fatores como sexo, idade, presença de glândulas sebáceas entre outros, afetam a resistência dos bovinos aos carrapatos e são discutidos na literatura, sendo a raça o fator de maior importância e com grande consenso entre os autores (ROCHA, 1999). Diferenças de resistência ao carrapato *R. microplus*, medida pelo número de fêmeas ingurgitadas presente no animal e parâmetros reprodutivos do parasito, foram observados entre e raças taurinas (*Bos taurus taurus*), mais susceptíveis a infestação, e as zebuínas (*Bos taurus indicus*), mais resistentes, sendo essa característica herdável (UTECH et al., 1978). O fenômeno de herdabilidade da resistência ao carrapato em bovinos é multigênico e evidente até mesmo nos indivíduos provenientes de cruzamento entre raças taurinas e zebuínas (MACKINNON et al., 1991; FRISCH E O'NEILL, 1998). Quanto maior a contribuição genética zebuína, maior a resistência ao carrapato (UTECH et al., 1978; LEE, 1979; OLIVEIRA et al., 1989; OLIVEIRA E ALENCAR, 1990). Esse fenômeno ocorre, possivelmente, devido à origem asiática de bovinos zebuínos, onde ocorre o clima mais favorável ao desenvolvimento do carrapato e, permitiu ao longo do tempo, uma coevolução parasito-hospedeiro, o que é diferente para raças taurinas de origem europeia, onde a incidência de infestações pelo *R. microplus* é pouco frequente (HOOGSTRAAL E WASSEF, 1985; ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Vale ressaltar que animais taurinos e zebuínos apresentam, também, diferentes fenótipos de resistência a diversas doenças infecciosas, parasitoses e até mesmo estresse fisiológico (MATTIOLI et al., 2000; BRUNELLE et al., 2008; EBERHARDT et al., 2009; PIPER et al., 2009; MACEDO et al., 2013; KNUBBEN-SCHWEIZER E PFISTER, 2017; GURAO et al., 2017).

A diferença no fenótipo bovino de resistência ao carrapato vem sendo largamente explorada, inclusive para animais cruzados, com diferentes níveis de resistência, para desenvolvimento de vacinas e identificação de genes associados com o desfecho fenotípico apresentado na interface parasito-hospedeiro (GONZALES, 1975; O'KELLY E SPIERS, 1976; WAMBURA et al., 1998; FERREIRA et al., 2003;

PIPER et al., 2009; ENGRACIA FILHO et al., 2017; FRANZIN et al., 2017; GARCIA et al., 2017; MOTA et al., 2017; TABOR et al., 2017; OTTO et al., 2018). Alguns autores avaliaram a participação da resposta imune de bovinos nos fenótipos contrastantes de resistência ao *R. microplus*, destacando-se variantes genéticas moleculares associadas à essa característica. Nesse contexto, destacam-se diversos trabalhos baseados na detecção genômica de QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Loci*) utilizando-se marcadores SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*) ou microssatélites (BARENDSE, 2007; GASPARIN et al., 2007; REGITANO et al., 2008; PRAYAGA et al., 2009; MACHADO et al., 2010; TURNER et al., 2010; PORTO NETO et al., 2010, 2011a, 2011b; CARDOSO et al., 2015; MAPHOLI et al., 2016; SOLLERO et al., 2017, OTTO et al., 2018). Na maioria dos trabalhos, menciona-se uma contribuição significativa do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, ou BoLA para bovinos) dos hospedeiros na variação de resistência, mas a maioria inconsistente e com loci de efeitos relativamente fracos (TABOR et al., 2017). Esses dados têm auxiliado programas de melhoramento genético com o intuito de prevenir a infestação por carrapatos a campo. No entanto, por se tratar de uma herança multigênica com herdabilidade variada, é necessário a utilização de estratégias mais robustas de análise em massa, como a genômica e a transcriptômica, entre outros, para seleção de marcadores com maior acurácia.

2.4 RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA: RELAÇÃO CARRAPATO-HOSPEDEIRO

Trager (1939) foi o primeiro a demonstrar que hospedeiros vertebrados seriam capazes de rejeitar ectoparasitos e que a resistência poderia ser transmitida pelo soro de animais infestados por carrapatos. Esse achado levou vários laboratórios do mundo a pesquisar sobre as bases moleculares e imunológicas envolvidas na interface hospedeiro-ectoparasito. A imunidade inata é a linha de defesa inicial do organismo, consistindo de mecanismos celulares e bioquímicos que agem rapidamente contra alterações homeostáticas como lesões, infecções e parasitoses (ABBAS et al., 2012). A fixação do carrapato na pele gera um dano tecidual responsável por ativar fatores como a inflamação mediada por células, sistema complemento, coagulação,

vasoconstrição e agregação plaquetária que consistem no mecanismo de defesa inato do hospedeiro (KUPPER E FUHLBRIGGE, 2004; MARTINON et al., 2009; NESTLE et al., 2009; CLARK, 2010). A ativação desses fatores em células imunes residentes, como células endoteliais e queratinócitos, macrófagos, células de Langerhans, mastócitos e células linfoides inatas, culminam na liberação de mediadores pró-inflamatórios e proteínas de fase aguda (HEATH E CARBONE, 2013) que aumentam o influxo sanguíneo (vasodilatação), e são quimiotáticos para células inflamatórias circulantes incluindo neutrófilos e monócitos, respectivamente (SUFFREDINI et al., 1999; SAEED et al., 2005; KOTÁL et al., 2015). A apresentação dos antígenos secretados pelo parasito para formação do cone de cimento, responsável por manter sua fixação na pele do hospedeiro durante toda fase parasitária, e saliva, que possui atividade imunomoduladora facilitando seu repasto sanguíneo, culminam na ativação de outro tipo de resposta, a imunidade adaptativa, e na consequente geração de memória imunológica (FRANCISCHETTI et al., 2009, ABBAS et al., 2012). Assim, ocorre a ativação dos ramos humoral e celular da resposta imune adquirida do hospedeiro (BROSSARD E WIKEL, 2004) e, no caso de infestações subsequentes, células T e B de memória amplificam a resposta, produzindo citocinas e anticorpos específicos contra moléculas da saliva ou antígenos derivados do aparato bucal do carrapato, ativando complemento ou sensibilizando mastócitos e basófilos (BROSSARD E WIKEL, 2004; BOWMAN E NUTTALL, 2008; MERAD et al., 2008; WIKEL, 2013).

Os mecanismos de defesa dos carrapatos e hospedeiros coevoluem, onde a interação carrapato-hospedeiro gera o desenvolvimento de formas de evasão e defesa, respectivamente (ANDRADE et al., 2005). Em resposta à ativação do sistema imunológico do hospedeiro, os carrapatos secretam a saliva no local de fixação, que é uma mistura complexa de substâncias imunomoduladoras (DAI et al., 2010; MATHIAS et al. 2011; HIDANO et al., 2014; JABLONKA et al., 2015; KOTÁL et al. 2015; PÁLENÍKOVÁ et al., 2015; BRANCO et al., 2016; HOURCADE et al., 2016; TIAN et al., 2016; XU et al., 2016). Apesar da especificidade parasito-hospedeiro existente, há uma redundância dentre as moléculas presentes na saliva das diferentes espécies de carrapatos, envolvidas no sucesso da alimentação e evasão da resposta imune do hospedeiro (ŠIMO et al., 2017). Essas moléculas vêm sendo reconhecidas em diversos estudos de proteoma, transcriptoma e sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequence*, NGS) (DAI et al., 2009; BELLGARD et al., 2012; CARVALHO et

al., 2014; COTTÉ et al., 2014; LIU et al., 2014; AYLLÓN et al., 2015; RICHARDS et al., 2015; RODRIGUEZ-VALLE et al., 2015; XU et al., 2015; VILLAR et al., 2016). Dentre as atividades de moléculas da saliva de diversas espécies de carrapatos, são descritas ações na modificação das respostas imune inata e adquirida do hospedeiro, permitindo o prolongamento do repasto sanguíneo pela inibição da coagulação e manutenção da vasodilatação e consequente inibição da cicatrização (TEMEYER E TUCKOW, 2016). A saliva de carrapato reprime a inflamação no local da picada, diminuindo ou aumentando a secreção de citocinas pro e anti-inflamatórias, respectivamente. Ramachandra e Wikel (1992) demonstraram que o extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* diminui a produção de IL-1 e TNF- α por macrófagos e IL-2 e IFN- γ por linfócitos T. Wu et al. (2010) relataram a inibição da secreção de TNF- α , CCL-2 e IFN- γ e aumento da secreção da citocina imunossupressora IL-10 por hialomina-A e -B da glândula salivar de *Hyalomma asiaticum asiaticum*, evidenciando a modulação da imunidade do hospedeiro para um perfil anti-inflamatório favorável ao carrapato. A saliva de carrapato também apresenta múltiplas funções efetoras sobre as células do sistema imune inato, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), fagocitose por neutrófilos (RIBEIRO et al., 1990; GUO et al., 2009) e macrófagos (KOPECKY E KUTHEJLOVA, 1998; KRAMER et al., 2011) e citotoxicidade de células NK (KUBES et al., 1994). Além disso, os carrapatos, incluindo o *R. microplus*, possuem moléculas salivares que são capazes de inibir o sistema complemento (SCHROEDER et al., 2009; SILVA et al., 2016) e agir na coagulação sanguínea (HORNAB et al., 2000; TIRLONI et al., 2016). Os carrapatos ixodídeos também controlam a cicatrização de feridas e angiogênese (FRANCISCHETTI, 2010; HAJNICKÁ et al., 2011) através da ligação de moléculas da saliva ao fator de transformação do crescimento (TGF)- β 1, ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ao fator de crescimento fibroblástico (FGF)-2 e ao fator de crescimento do hepatócito (HGF), dependendo da espécie do carrapato (KRAMER et al., 2008; HAJNICKÁ et al., 2011; SLOVÁK et al., 2014). Compostos de carrapatos similares a desintegrinas metaloproteases e trombospondina podem impedir interações célula-matriz e angiogênese (VALENZUELA et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2005; FUKUMOTO et al., 2006). Nos animais geneticamente resistentes, os componentes da imunidade celular parecem atuar como mecanismo de controle e/ou rejeição ao carrapato (BECHARA et al., 2000). Nesse contexto, as vias imunes efetoras correlacionadas não somente com a resposta imune anti-carrapato, mas com resistência a este, são descritas como reações de

hipersensibilidade imediata, envolvendo imunoglobulina E, e de hipersensibilidade tardia, envolvendo basófilos (WIKEL, 1996) e histamina (BROWN, 1985).

A resposta imune de memória mediada por linfócitos B também pode sofrer modulação por moléculas presentes na saliva do carrapato como as proteínas ligantes de imunoglobulinas (PAESEN et al., 2000; WANG et al., 1994) e um inibidor de linfócitos B (HANNIER et al., 2003; HANNIER et al., 2004). A presença dessas moléculas na saliva de carrapatos indica que anticorpos são mecanismos efetores importantes, desde que consigam contornar esses mecanismos de escape do parasito. Sabe-se que anticorpos produzidos pelo hospedeiro durante infestações com carrapatos ou após imunizações com antígenos do parasito estão presentes na forma ativa na hemolinfa de *R. microplus* (VAZ et al, 1998), de *Dermacentor variabilis* (ACKERMAN et al, 1981; JASINSKAS et al, 2000), de *Amblyomma americanum* (JASINSKAS et al, 2000) e de *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG E NUTTALL, 1994) durante, até pelo menos, 48 horas após sua ingestão podendo, portanto, exercer efeitos deletérios importantes sobre os tecidos do parasito. Vários patógenos possuem proteínas ligantes de IgG (PLIG) (TORPIER et al., 1979; DE MIRANDA SANTOS E CAMPOS NETO, 1981; LANGONE, 1982; WIDDERS, 1996) que participam de mecanismos de escape. Os carrapatos também possuem proteínas com esta mesma função (WANG E NUTTALL, 1999), sendo que em *R. microplus* sabe-se que cerca de 3% dos clones presentes em transcriptomas de glândulas salivares de machos codificam proteínas similares PLIGs de outros carrapatos, ou seja, é abundantemente expresso (WANG E NUTTALL, 1999; MARUYAMA et al., 2017). Os efeitos biológicos das diferenças alotípicas e haplotípicas que influenciam na capacidade de imunoglobulinas de hospedeiros ligarem-se a PLIGs de patógenos já foram descritos quanto ao desfecho clínico da interação de bovinos com a bactéria *Histophilus somni*, e o carrapato *R. microplus* (CORBEIL, 2007; CARVALHO et al, 2011). Dessa forma, seria de extrema importância caracterizar não só as moléculas imunomoduladoras presente na saliva como seu efeito nos diferentes fenótipos de infestação para que ferramentas de controle do carrapato sejam desenvolvidas com maior acurácia e efetividade à campo.

2.5 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS E SUA PARTICIPAÇÃO NA RELAÇÃO CARRAPATO-HOSPEDEIRO

Macrófagos são, prioritariamente, células fagocíticas, mas também atuam como células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen Presentation Cells*, APCs), produtoras de citocinas e quimiocinas que atuam em diversos sistemas, como a imunidade inata e adaptativa, o metabolismo sistêmico, hematopoiese, angiogênese e reprodução (MANTOVANI et al., 2004; GEISSMANN et al., 2010; MURRAY E WYNN, 2011; TUGAL et al., 2013). Os macrófagos podem ser divididos em duas diferentes populações: uma derivada de células hematopoiéticas da medula óssea, que circulam na corrente sanguínea como percursoros monocitários, e outra residente em tecidos, originada do saco embrionário, que são encontradas em praticamente todos os órgãos de mamíferos adultos incluindo a pele, com um papel imunomodulatório e regulador do metabolismo lipídico (GOMEZ PERDIGUERO et al., 2014). Os macrófagos residentes recebem diferentes nomes de acordo com o tecido onde ocorrem, como células de Langerhans (pele), osteoclastos (osso), macrófagos alveolares (pulmão), células da micróglia (sistema nervoso central) ou células de Kupffer (fígado), cujas populações possuem perfis transcricionais muito diferentes (GAUTIER et al., 2012; ITALIANI E BORASCHI, 2014). Macrófagos derivados de células hematopoiéticas da medula óssea, como os monócitos, após extravasamento para um sítio inflamatório, como o ponto de fixação do carrapato na pele, se diferenciam pelas vias de ativação clássica ou alternativa, em macrófagos pro-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios (M2), respectivamente (GUNDRA et al., 2014; DEY et al., 2015). Essas subpopulações de macrófagos se diferem com respeito a produção de citocinas, expressão de receptores e seu efeito geral no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (TAYLOR et al., 2005; DAVIES et al., 2013; GUNDRA et al., 2014).

A diferenciação de monócitos em macrófagos bem como os fenótipos M1 e M2 de resposta podem ser caracterizados pela expressão diferencial de receptores do tipo *Cluster of Differentiation* (CD), que se referem a proteínas de superfície celular, designadas por números que denominam cada molécula, identificando diferentes fenótipos celulares (ACTOR, 2014). Moléculas como CD11b, CD14, CD16, CX3CR1, CCR2, CD36, CD68, Ly6c, CCR2 e CD62L são marcadores expressos em monócitos em proporções diversas, que podem ser utilizadas para caracterizar estágios de

diferenciação celular em mamíferos, apresentando alta conservação genética entre as espécies (FERNANDEZ et al., 2000; PALFRAMAN et al., 2001; GEISSMANN et al., 2003; SUNDERKÖTTER et al., 2004; CASSADO, 2011). Em monócitos existe uma expressão positiva do marcador CD11b, que é diminuída após a diferenciação dessas células em macrófagos (CROCKER E GORDON, 1985; SEU et al., 2017). Já os marcadores de macrófagos são principalmente o CD14, CD16, MHC classe II, expressos em quantidades maiores quando comparado aos monócitos (ZIEGLER-HEITBROCK E ULEVITCH, 1993; SALDARRIAGA et al., 2003; ZHANG et al., 2008; AN et al., 2017). Para bovinos, são descritas algumas moléculas marcadoras de macrófagos, incluindo CD11b, CD11c, CD14, CD68, CD163 e CD172a, que apresentam expressão variada de acordo com o estágio de diferenciação e fenótipo de resposta (AKTER et al., 2012; CONTRERAS et al., 2015, 2016; BAQUERO E PLATTNER, 2017; NEWMAN et al., 2019).

Sendo altamente versáteis, os macrófagos são cruciais no controle de infecções e na homeostase de tecido e reagem a uma grande variedade de estímulos externos, sendo capazes de produzir diversas moléculas efetoras para comunicação intercelular, defesa contra micro-organismos e modulação de reações inflamatórias (MURRAY E WYNN, 2011). Exemplos disso são as citocinas produzidas por macrófagos (LIU E UZONNA, 2012) e também outras moléculas como espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS), o óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*, NO), que agem diretamente na eliminação de patógenos (MILLS, 2015; SCHATZ et al., 2016). Mills et al. (2000) propuseram a classificação fenotípica de macrófagos em M1/M2 baseados em observações acerca do desenvolvimento de padrões de resposta imune em camundongos C57BL/6, que apresentam uma forte resposta celular do padrão Th1 acompanhada de uma alta produção de NO quando estimulados com LPS ou IFN- γ , em comparação com células da linhagem BALB/c, que também apresentaram aumento do metabolismo de arginina para ornitina. Dado que o NO inibe a proliferação celular, enquanto a ornitina, como precursora de poliaminas, pode estimulá-la, esses autores demonstraram que macrófagos M1 direcionam a uma resposta de linfócitos do tipo Th1, enquanto os macrófagos M2, para uma resposta Th2 (MILLS, 2000; MILLS, 2001). Portanto, macrófagos M1 são microbicidas, pro-inflamatórios e responsivos ao IFN- γ , enquanto os macrófagos M2 são pouco microbicidas e tem propriedades anti-inflamatórias (MOSSER E EDWARDS, 2008).

Vários marcadores podem ser utilizados para identificar proteínas de superfície representando fenótipos específicos de macrófagos. Moléculas co-estimulatórias e apresentadoras de antígenos como CD80, CD86 e MHCII, são altamente expressas em macrófagos com perfil M1 (BENOIT et al., 2008). Já a expressão de CD-163, um receptor *scavenger*, está associado ao perfil M2 (OLIVEIRA et al., 2010). Macrófagos M1 também expressam relativamente grandes quantidades da enzima NOS2 (do inglês, *Nitric Oxide Synthase 2*), resultando numa produção aumentada de NO, e citocinas pro-inflamatórias como IL-12, IL-23 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Por outro lado, macrófagos M2 expressam altos níveis de arginase-1 com reduzida produção de NO e produção aumentada de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (MOSSER E EDWARDS, 2008). Castillo-Velázquez et al. (2013) foram os primeiros a relatar a polarização de macrófagos bovinos em resposta aos estímulos M1 e M2, demonstrando que os perfis estão presentes na espécie sem, contudo, avaliar se há diferenças entre animais taurinos e zebuínos. Hussen et al. (2013) ainda identificaram três diferentes perfis fenotípicos e funcionais em monócitos bovinos, o que se assemelha ao que é observado para humanos. Mais recentemente, a polarização de macrófagos bovinos foi caracterizada por Fernández et al. (2017), relacionando o perfil M1 ou M2 com a gravidade de lesões granulomatosas em resposta a infecções por *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

Muitas interações já foram descritas entre macrófagos e saliva ou extrato de glândula salivar de carrapatos sugerindo que eles têm um importante papel na defesa do hospedeiro contra infestações (Figura 2; Kotál et al. 2015). Kuthejlová et al. (2001) demonstraram a capacidade inibitória do extrato de glândulas salivares de *Ixodes ricinus* sobre a produção de superóxido e óxido nítrico por macrófagos ativados por *Borrelia afzelii*, bem como redução na produção de IFN- γ , TNF- α e fagocitose de espiroquetas em modelo murino (KYCKOVA E KOPECKY, 2006). Também já foi demonstrado que a saliva de *I. scapularis* inibe a produção de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12p40 por macrófagos murinos derivados de medula óssea após estimulação com LPS ou *Anaplasma phagocytophilum*. A saliva desse carrapato ixodídeo também inibe a secreção de IL-8 e NO por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas após estímulo com TNF α ou LPS, respectivamente (URIOSTE et al., 1994; CHEN et al., 2012). Várias espécies de carrapatos, como o *Amblyomma americanum* e *Haemaphysalis longicornis*, expressam um homólogo do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) de vertebrados capazes de inibir a migração de macrófagos em

ensaios *in vitro*, sugerindo seu papel na diminuição do recrutamento dessas células para o local da picada *in vivo* (JAWORSKI et al., 2001; UMEMIYA et al., 2007; WASALA E JAWORSKI, 2012).

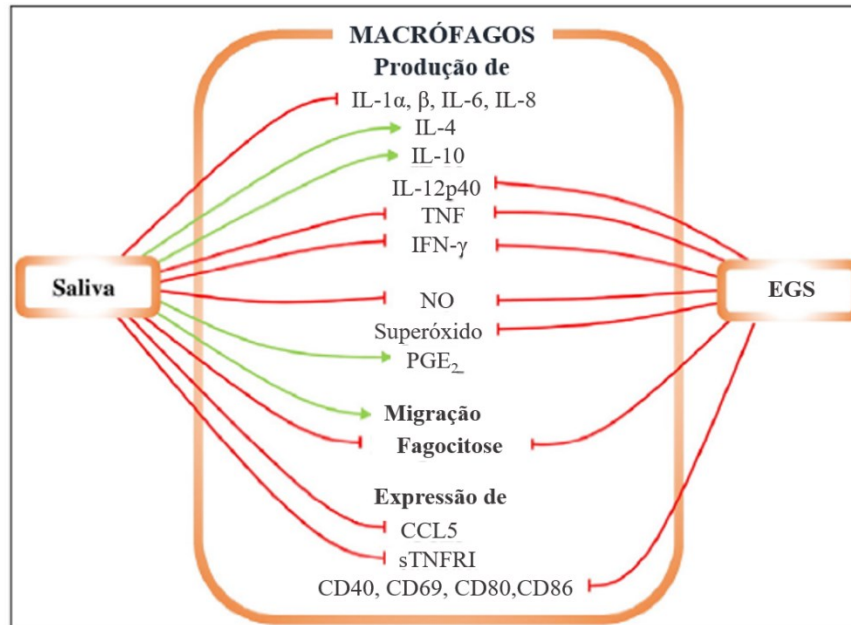


Figura 2. Efeitos da saliva e do extrato de glândula salivar nos macrófagos. As linhas vermelhas representam inibição e linhas verdes, enriquecimento. A saliva de carrapato inibe a produção de IL-1a, IL-1b, IL-8 TNF, IFN-g, NO, superóxido e CCL5, assim como expressão de sTNFRI e fagocitose. A saliva aumenta a produção de IL-4, IL-10 e PGE₂ e a migração de macrófagos. O extrato de glândula salivar (EGS) inibe a produção de IL-12p40, TNF, IFN-γ e NO, expressão de CD40, CD69, CD80 e CD86 e fagocitose. Figura adaptada de KOTÁL et al. (2015).

A saliva de várias espécies de carrapatos é capaz de suprimir o início da imunidade adaptativa, interferindo na capacidade de células dendríticas e macrófagos de apresentar antígenos para células T e primar respostas Th apropriadas (CAVASSANI et al., 2005; MEJRI E BROSSARD, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; SKALLOVÁ et al., 2008; CARVALHO-COSTA et al., 2015). Vale ressaltar que atividade imunomoduladora exercida por carrapatos ixodídeos, como o *R. microplus*, atua não só como estratégia de evasão para facilitar o ingurgitamento, como altera a resposta imune para um perfil de polarização Th2, que beneficia a transmissão de patógenos veiculados pela saliva do carrapato, contrário ao que ocorre na resposta de defesa do tipo Th1 do hospedeiro (HAJNICKA et al., 2005). Nesse contexto, o único trabalho que até o momento avaliou a resposta de macrófagos bovinos foi publicado por Brake e Pérez de León (2012) que demonstraram uma inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície (CD80, CD86, CD40 e CD69), acompanhada pela diminuição na produção de TNF, IFN-γ e IL-12 em macrófagos bovinos estimulados com LPS e extrato de glândula salivar de *R. microplus*. Em relação à resposta de

polarização de macrófagos contra a saliva de carrapatos, Brake et al. (2010) utilizaram extrato de glândula salivar de *R. microplus* em linhagem de macrófagos murinos, ativados por LPS, e encontraram um efeito dependente da concentração do extrato sobre a expressão de moléculas CD86, que favorece uma polarização para M2. Nesse contexto, observa-se, portanto, a importância dos macrófagos, enquanto células com ação na interface inata e adquirida da imunidade. Porém, faltam abordagens que elucidem a ativação e perfil de resposta de macrófagos frente a saliva do carrapato *R. microplus*, bem como a participação dos fenótipos M1 e M2 no desfecho da interação parasito-hospedeiro em hospedeiros bovinos taurinos e zebuínos.

2.6 GENÔMICA FUNCIONAL NA CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES E METABÓLICAS

A genômica funcional descreve o papel de genes e proteínas, concentrando-se em aspectos dinâmicos como a transcrição, a tradução e interações entre proteínas. Objetivando avaliar os padrões de expressão gênica e proteica nas células e tecidos, pré-requisito básico para se entender como estas macromoléculas interagem para produzir organismos complexos, capazes de se adaptar às influências do meio ambiente e a situações fisiológico-metabólicas específicas. Para isso, são utilizados métodos de análise em massa (*high-throughput*), como a genômica, transcriptoma, lipidoma, proteoma, entre outras (FURLAN et al., 2007). Estudos de genômica funcional associados às patologias, infecciosas ou não, apresentam perspectivas promissoras no que se refere à identificação de fatores de risco, marcadores de gravidade, alvos terapêuticos e novas metodologias de tratamentos (BENETTI et al., 2012; SEDIC et al., 2012; WARD E KELLIS, 2012; ALVAREZ-CALDERON et al., 2013; MEHAN et al., 2013). Várias são as técnicas utilizadas no melhoramento animal para diversas finalidades, como a predição genômica combinada a marcadores moleculares (HAY et al., 2018; WANG et al., 2019b) e seleção genômica (WIGGANS et al., 2017; THISTLETHWAITE et al., 2019), a identificação de genes associados a uma determinada característica (ALFANO et al., 2014; YANG et al., 2016; ZHANG et al., 2018; FONSECA et al., 2018; GAO et al., 2018), estudo de estrutura genética populacional (BROUARD et al., 2017; GOSZCZYNSKI et al., 2018; WANG et al., 2018),

entre outros. Em outros campos, metodologias de tratamentos utilizando metodologias moleculares de análise em massa envolvem o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (CHAIPAN et al., 2017; HSU E O'CONNELL, 2017), identificação de miRNA relacionados a replicação e infecção de linfócitos (LU et al., 2017) e também estudos relacionados com câncer (AOKI et al., 2019; CHUMAKOVA et al., 2019; TODENHÖFER et al., 2019; VARBANOV et al., 2019).

Avanços em análises funcionais em massa tem se intensificado com projetos genoma que permitiram desvendar muitas das informações contidas em moléculas como genes e proteínas, que são homólogos e altamente conservados entre organismos, formando complexos sistemas (LEVY et al., 2007; THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM et al., 2009; LÉVESQUE et al., 2016). As células de mamíferos são complexos sistemas celulares compartimentalizados, responsáveis por uma série de reações bioquímicas simultâneas, onde muitas interações podem ocorrer (GERDTZEN, 2012). A compreensão desses sistemas envolve a pesquisa de diversos comportamentos, redes de interações, componentes e interações, controle e regulação, entre outras características, que abrangem as funções e respostas celulares (KITANO, 2002). Os componentes desses sistemas são moléculas que guardam informações a curto e longo prazo (OLTVAI E BARABASI, 2002). Uma vez que o DNA é responsável por orientar os processos de transcrição e tradução, outras técnicas de análise em massa foram surgindo, como os macro e microarranjos, cujos princípios são baseados na hibridização entre uma sonda (DNA complementar - cDNA ou oligonucleotídeo) que contém sequências complementares a uma molécula-alvo marcada com fluoróforo, e são fixadas em uma superfície sólida e lidas através de um *scanner*, produzindo resultados quantitativos, como a expressão gênica. Mais tarde, o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou a transcriptômica, permitindo análises do RNA através do sequenciamento do cDNA (WANG et al., 2009). Esse método é denominado sequenciamento de RNA (RNA-Seq), e possui vantagens sobre abordagens mais antigas, com uma visão mais geral e detalhada da expressão gênica, *splicing* alternativo e expressão alelo específica (KUKURBA E MONTGOMERY, 2015).

Análises de rotas metabólicas são baseadas em ferramentas de modelagem matemática e estatística para descrição da interação de sistemas biológicos de interesse que utilizam informações em massa de diferentes níveis (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, etc.) proveniente de diversas fontes de

dados (Figura 3) para uma resolução de biologia de sistemas. Modelos matemáticos são responsáveis por incorporar informações dos componentes das vias e suas interações e distribuição nos sistemas, que podem ser obtidas a partir de metodologias de alto rendimento e serem associados a um contexto biológico (REED et al., 2006) como, por exemplo, os fenótipos de infestação por carrapatos em bovinos. Por isso, é importante a predefinição do modelo a ser utilizado, levando em conta a interação do sistema com o ambiente de maneira quantitativa ou qualitativa, considerando suposições e restrições de cada técnica envolvida (GERDTZEN, 2012). Com isso, é possível inferir acerca da relevância e impacto de cada componente molecular, permitindo sua identificação a partir da topologia do sistema de redes integradas e de pontos chaves de modulação (GERDTZEN, 2012).

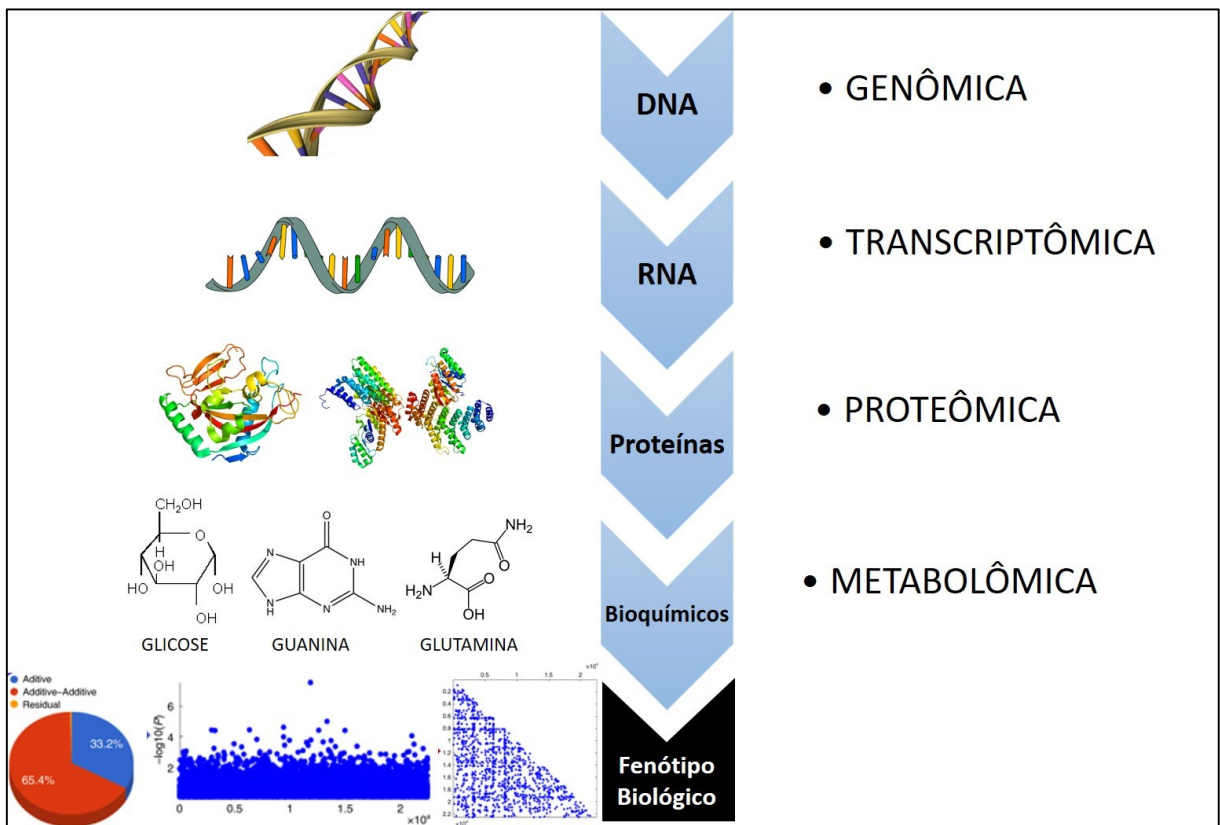


Figura 3. Fontes de dados para estudo do fenótipo biológico de um organismo. Alguns componentes celulares são fontes importantes para análises em massa e obtenção de informações acerca de um determinado fenótipo biológico de um organismo observado. A genômica engloba o estudo do genoma, cuja fonte de informação é o DNA das células de um organismo. A transcriptômica está relacionada ao estudo da expressão gênica, específica de um dado momento, em uma célula, tecido ou organismo, que reflete a transcrição do RNA. A proteômica consiste na análise global do conjunto de proteínas expressas em uma amostra biológica, capaz de fornecer informações como estrutura, localização, modificação pós-traducional, função e interação com outras proteínas e ligantes. Já a metabolômica, estuda a composição de todos os metabólitos presentes em um organismo. Em conjunto, essas análises em massa permitem a extração de inúmeras informações relacionadas a uma característica de interesse em um organismo.

No campo veterinário a aplicação de técnicas de análise em massa por sequenciamento tem avançado nas últimas décadas, em especial para bovinos devido à publicação do genoma em 2009 (THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM et al., 2009). Metodologias de análise em massa foram utilizadas em diversos modelos de doenças em bovinos para avanços no conhecimento acerca da interação parasito-hospedeiro visando o desenvolvimento de metodologias avançadas de tratamento e diagnóstico (DUARTE et al., 2015; RAMOS et al., 2015; BOLAÑOS et al., 2017; ASHRAF E IMRAN, 2018).

Estratégias de análise em massa são interessantes no estudo comparativo da expressão gênica relacionada a fenótipos distintos ligados a genótipos semelhantes, como características de resistência e susceptibilidade ao carrapato *R. microplus* em bovinos. A identificação de genes diferencialmente expressos em resposta à infestação em animais taurinos e zebuínos pode fornecer dados que possibilitem identificar os padrões de resposta imune desenvolvido por esses hospedeiros que estão ligados à resistência da infestação, permitindo a busca de alvos terapêuticos específicos para controle do carrapato. Nesse contexto, resultados de análises de microarranjo de pele infestada com o carrapato *R. microplus*, obtidos pelo grupo de Genética Molecular e Imunologia da Embrapa Gado de Leite, demonstraram uma expressão gênica diferencial na pele infestada de animais F2 (Gir x Holandês) previamente caracterizados quanto ao seu fenótipo de infestação (CARVALHO et al., 2014). Animais resistentes apresentaram maior expressão de genes ligados à atividade do sistema complemento, estresse oxidativo e funções de macrófagos quando comparados a animais susceptíveis nas primeiras 48 horas de infestação (CARVALHO et al., 2014). Recentemente, Franzin et al. (2017) demonstraram que hospedeiros taurinos, susceptíveis ao carrapato *R. microplus*, apresentavam menor produção de citocinas e quimiocinas relacionadas com a migração de granulócitos e linfócitos T. Ambos os trabalhos foram pioneiros em apresentar os resultados de expressão gênica em massa contextualizados na forma de rotas metabólicas para associação com os fenótipos de resistência apresentados por bovinos. Apesar de exibirem resultados importantes para a caracterização da relação carrapato-hospedeiro bovino, as técnicas de microarranjo apresentam limitações, principalmente no que tange o número de genes avaliados, que é restrito a 23.000 transcritos no caso dos *chips* utilizados, o que compromete uma resolução robusta de biologia de sistemas. Apesar das limitações, as análises de pele infestada com *R. microplus* apresentadas por Franzin et al. (2017) e Carvalho et al.

(2014) evidenciam um papel importante da resposta pró-inflamatória mediada por citocinas como IL-1, reativos de oxigênio e complemento na resistência ao carrapato tanto no contraste entre animais taurinos e zebuínos, quanto em bovinos F2 previamente fenotipados, respectivamente. Os processos apontados são desempenhados majoritariamente por macrófagos, cujos estudos em bovinos ainda são escassos, inclusive no que tange à sua participação na resposta contra o *R. microplus*.

Nesse contexto, o presente trabalho visa caracterizar as vias metabólicas envolvidas na ativação da resposta de macrófagos oriundos de animais taurinos e zebuínos contra estímulos pro-inflamatório e saliva do *R. microplus* para descrição da interação de sistemas biológicos envolvidos na resistência a infestações por *R. microplus*. Para tal, monócitos derivados de sangue periférico de animais taurinos e zebuínos foram diferenciados em macrófagos, *in vitro*, e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS, um controle positivo de ativação de macrófagos M1) e saliva obtida de *R. microplus*. Essas células foram submetidas ao sequenciamento de RNA e os genes diferencialmente expressos analisados no contexto de rotas metabólicas para caracterização da resposta dos macrófagos oriundos de bovinos taurinos e zebuínos, inclusive no contexto fenotípico de M1 e M2. A caracterização de genes e vias metabólicas contribuirão significativamente para avanços no conhecimento acerca da biologia de sistemas envolvida na resistência ao carrapato bovino em animais taurinos e zebuínos. Os dados gerados possibilitarão o desenvolvimento de incrementos tecnológicos, como adjuvantes e estratégias de reprogramação metabólica, associados a características de resposta imune protetora contra o carrapato, de forma a tornar a resposta de hospedeiros susceptíveis mais próxima do que é verificado em bovinos resistentes. Os resultados também poderão contribuir de forma significativa para programas de melhoramento genético bovino possibilitando identificar alelos em éxons que participam de processos chave associados a resposta imune protetora contra carrapatos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e identificar os principais genes, processos e rotas metabólicas envolvidos na ativação de macrófagos de animais taurinos (*Bos taurus*; susceptível ao carrapato) e zebuínos (*Bos indicus*; resistente ao carrapato) estimulados, *in vitro*, com lipopolissacarídeo, um potente indutor do fenótipo celular M1, e saliva de *R. microplus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil do transcriptoma, obtido por sequenciamento de RNA, e identificar genes diferencialmente expressos em macrófagos diferenciados *in vitro*, sem ativação e estimulados com lipopolissacarídeo derivado de parede celular de *E. coli* (LPS) ou saliva do carrapato *R. microplus*;
2. Identificar, por análise de ontologia gênica, as classes de genes que estão envolvidas na resposta de macrófagos não-estimulados, ativados com LPS ou saliva do carrapato *R. microplus*, em animais taurinos e zebuínos;
3. Identificar e caracterizar vias de sinalização metabólicas envolvidas na resposta de macrófagos não-estimulados, ativados com LPS e saliva do carrapato *R. microplus* em animais taurinos e zebuínos;
4. Verificar se a saliva do carrapato *R. microplus* induz a expressão diferencial de genes relacionados a perfis de macrófagos M1 (*NFκB2* e *NOS2*) e M2 (*IL-10*, *NRROS* e *OAT*) nos diferentes fenótipos bovinos de infestação;
5. Identificar genes e/ou processos biológicos candidatos para intervenções imunomodulatórias de hospedeiros taurinos, susceptíveis ao carrapato *R. microplus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Resumidamente, o delineamento experimental do presente trabalho se baseou no uso de macrófagos diferenciados, *in vitro*, a partir de monócitos obtidos por isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de bovinos. Para tal, sangue periférico foi coletado de animais resistentes ao carrapato (*Bos indicus*, Gir, n=7) e susceptíveis (*Bos taurus*, Holandês, n=10). Essas células foram diferenciadas em macrófagos, analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão dos marcadores CD11b e CD14, e tratadas com saliva de *R. microplus*, previamente coletada, lipopolissacarídeo de membrana de *E.coli* (LPS, controle positivo de ativação de macrófagos M1) ou somente meio de cultura sem estímulo (controle negativo). Para o ensaio de caracterização da polarização de macrófagos pela salivagem de *R. microplus*, utilizou-se ainda um tratamento combinado de LPS com saliva diluída 1.000x. Ao todo, foram produzidas 68 amostras de células diferencialmente tratadas (17 animais x 4 tratamentos), cujo RNA foi extraído individualmente. Amostras de RNA, dentro de cada grupo genético, foram selecionadas de acordo com a quantidade e integridade das moléculas e utilizadas para construção das bibliotecas de cDNA. Estas foram submetidas ao sequenciamento em massa com a tecnologia de nova geração (RNA-Seq), utilizando o equipamento HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, EUA). Os resultados foram analisados por técnicas de bioinformática comparando os diferentes fenótipos e tratamentos para obtenção de uma lista de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os contrastes analisados. Os DEGs foram utilizados para análises de enriquecimento e identificação de rotas metabólicas associadas com os padrões de resposta nos contrastes analisados através dos programas disponíveis em bases de dados de acesso gratuito *online* como o *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID) e o *Reactome* v67 (FABREGAT et al., 2018), respectivamente. A polarização dos macrófagos, assim como a confirmação dos genes diferencialmente expressos apontados pela análise dos dados de RNA-Seq, foram avaliados por PCR em tempo real.

4.1 OBTENÇÃO DA SALIVA DO CARRAPATO *R. microplus* PARA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

4.1.1 INFESTAÇÃO POR *R. microplus* E ESTIMULAÇÃO PARA COLETA DE SALIVA

Os carrapatos utilizados para obtenção da saliva foram coletados de bovinos estabulados no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), em Coronel Pacheco/MG. Os animais sofreram infestação natural ou artificial, ambos sem tratamento com acaricida por pelo menos trinta dias para evitar alterações fisiológicas e bioquímicas, tanto do hospedeiro quanto do carrapato, que pudessem influenciar na composição da saliva coletada (CATTO et al., 2010). As infestações artificiais foram realizadas na ausência de carrapatos suficientes para salivação disponíveis por infestação natural. As infestações artificiais foram conduzidas com cepas de larvas de *R. microplus* sensíveis a carrapaticidas, cujas colônias são mantidas pelo Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora/MG. Para tal, fêmeas adultas (fase de teleógina) do carrapato *R. microplus* foram coletadas de bovinos infestados e testadas quanto à resistência aos carrapaticidas comerciais mais utilizados no mercado. As cepas consideradas susceptíveis a todos os carrapaticidas testados, conforme protocolo descrito por Drummond et al. (1973), foram utilizadas para amplificação de colônia e infestação artificial dos bovinos. As teleóginas susceptíveis aos carrapaticidas foram acondicionadas em placas de Petri com tampa e mantidas em estufa incubadora para BOD a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com umidade superior a 80% para oviposição. Após três dias do início da postura, os ovos foram recolhidos com o auxílio de espátulas, pesados e colocados em seringas de 10 ml com o bico cortado e tampadas com algodão, e mantidos na mesma condição descrita anteriormente. O protocolo utilizado preconizou a coleta dos ovos apenas até o terceiro dia de postura, visando evitar a possível transmissão transovariana de *Babesia bovis*, que é acentuada a partir desse período (HOWELL et al., 2007). A pesagem dos ovos foi realizada visando a obtenção aproximada de 10.000 larvas eclodidas, o que corresponde a 0,5 g de ovos (SUTHERST E BOURNE, 2006). A eclosão de aproximadamente 100% das

larvas era observada, em média, entre os dias 13 e 21 após a postura. As larvas eclodidas foram mantidas em estufa por 15 dias, quando foram utilizadas.

A infestação artificial foi realizada pela fixação das seringas contendo as larvas na parte interna das patas traseiras de bovinos da raça holandesa utilizando-se, aproximadamente, 60.000 larvas por animal (Figura 4). A evolução do ciclo dos carrapatos foi acompanhada semanalmente até que esses atingissem a fase de partenógena/teleógena, o que ocorre após cerca de 21 dias da infestação (FURLONG, 1993). As fêmeas adultas foram coletadas antes de seu desprendimento do hospedeiro, ocorrendo entre o décimo oitavo e o vigésimo terceiro dia. Essa coleta foi realizada manualmente por ligeira torção dos mesmos, para evitar o dano à probóscide, dado que as glândulas salivares desses parasitos secretam uma substância chamada cimento, que é responsável pela fixação da peça bucal do carrapato na pele do hospedeiro (KAUFMAN, 1989).



Figura 4. Infestação artificial de bovinos. Para infestação artificial, os animais foram mantidos em baias, parcialmente imobilizados, com seringas contendo aproximadamente 60.000 larvas do carrapato *R. microplus*, fixadas na parte interna da pata traseira com fita adesiva, por 6 - 8 horas. Após esse período, necessário para uma fixação eficiente das larvas sem interferência de lambedura, os animais foram mantidos em piquetes para acompanhamento do ciclo de vida e coleta das teleóginas para salivação entre o décimo oitavo e o vigésimo terceiro dia após infestação.

As teleóginas foram coletadas a campo e imediatamente lavadas com água corrente, secas com papel toalha e coladas ventralmente, por meio de fita adesiva dupla face, em ripas de madeira, com o aparelho bucal para cima, de forma a permitir a visualização e coleta, com micropipeta, da gota de saliva expelida (Figura 5). A saliva do carrapato *R. microplus* foi coletada estimulando as fêmeas adultas com 5 μ L de uma solução alcoólica de pilocarpina 5% aplicada topicamente no dorso. A pilocarpina é uma substância agonista da salivação, que age nos gânglios neurais que inervam as

glândulas salivares dos carrapatos, estimulando os receptores colinérgicos presentes na superfície das glândulas exócrinas (KAUFMAN, 1978; ALMEIDA E KOWALSKI, 2010). A saliva foi coletada por aproximadamente 2 horas após estimulação com a pilocarpina, acondicionada em microtubo de 1,5 ml, em gelo, para evitar a formação de coágulos de fenol ou proteólise da saliva (LEE et al., 2007). Ao final de cada coleta, a saliva foi acondicionada a -20°C , para futura homogeneização em *pool* dos volumes recolhidos nos diferentes dias. O *pool* de saliva coletado dos carrapatos foi submetido a análise quantitativa de proteínas pelo método de Bradford, análise qualitativa através de eletroforese em gel desnaturante em gradiente de poliácridamida e potencial de contaminação microbiológica em cultivo celular. O volume total de saliva foi dividido em alíquotas e acondicionado a -20°C até seu uso.



Figura 5. Carrapatos *R. microplus* utilizados para obtenção de saliva. Carrapatos *R. microplus* foram coletados de bovinos infestados e imediatamente fixados em ripas de madeira (A), através de fita adesiva dupla face, com o dorso voltado para fora e probóscide para cima, para permitir a aplicação da pilocarpina alcoólica 5% ($5\mu\text{l}/\text{carrapato}$) e coleta da saliva (seta vermelha - B) com auxílio de micropipetas.

Para a quantificação de proteínas presente na saliva de *R. microplus* foi utilizado o método de Bradford baseado na construção de uma curva analítica com Albumina Sérica Bovina (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) com concentrações variando entre 3,1 e $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$, de acordo com as recomendações do fabricante (BioRad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). Três diferentes concentrações do *pool* de saliva foram avaliadas, 1:10, 1:50 e 1:100. A leitura foi realizada em Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), no comprimento de onda de 595 nm.

A avaliação qualitativa de proteínas presente na saliva de *R. microplus* foi realizada por gel de eletroforese desnaturante em gradiente de poliácridamida pré-fabricado Amersham ECL Gel 8-16%, conforme recomendações do fabricante (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). Primeiramente foi realizada uma

pré-corrída com o tampão do kit, Amersham ECL Gel 1X (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) e o cassete do gel, fornecido pelo kit, adicionados à cuba eletroforética, na condição de 160 V por 12 min. Posteriormente, as amostras foram carregadas no gel em tampão desnaturante, contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; solução SDS 10%; glicerol, solução azul de bromefenol; e ditioneitol (DTT) 1M. Como marcador de peso molecular foi utilizado o *Novex Sharp Pre-Stained Protein* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). A análise foi realizada a 140 v por 90 min e o gel foi, em seguida, corado em solução contendo o corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). A retirada do *background* de coloração foi feita em solução de etanol e ácido acético (25% de etanol, 8% de ácido acético em 1000 ml com água destilada). Para conservação do gel após descoloração foi usada uma solução de glicerol 87% v/v em água destilada.

O *pool* de saliva de *R. microplus* também foi submetido ao teste de esterilidade onde 130 µL foi adicionado em 2mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) em uma placa de Petri pequena (60x10mm). A preparação foi acondicionada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante sete dias e a contaminação foi avaliada por microscopia óptica e características de turbidez e cor do meio de cultivo que contém vermelho de fenol, um indicador de pH.

4.2 DIFERENCIAÇÃO E ESTÍMULOS DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS

4.2.1 ESCOLHA DOS ANIMAIS

Animais taurinos (*Bos taurus*, Holandês) e zebuínos (*Bos indicus*, Gir), previamente sensibilizados com infestação pelo *R. microplus*, foram selecionados a partir de rebanhos puros de origem criados no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco/MG. O contato prévio com carrapatos foi importante para se estabelecer um protocolo experimental mais próximo da realidade da produtividade bovina no Brasil, onde os animais são mantidos a campo, sendo expostos, desde os primeiros dias de vida à

infestação pelo *R. microplus*. O critério de resistência e susceptibilidade ao parasito levou em consideração a composição genética do animal, que já é bem descrita na literatura (MACHUGH et al., 1997; BRADLEY et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2013; BIEGELMEYER et al., 2015). A fim de se evitar qualquer efeito imunomodulador que pudesse interferir no ensaio, os animais selecionados ficaram estabulados, sem contato com carrapatos ou com acaricidas, por pelo menos três meses antes das coletas. Esse período foi estabelecido com base no tempo de meia vida dos componentes do acaricida Colosso FC30 (Ourofino, Cravinhos, São Paulo, Brasil), utilizado no CEJHB para controle da infestação por carrapatos. Para garantir a ausência de carrapatos durante esse período de quarentena, os animais foram escovados e a área onde estavam alocados foi limpa com auxílio de lança-chamas. A idade dos animais durante o período de coletas de sangue variou entre 6 e 12 meses (Tabela 1), sendo realizadas entre fevereiro e novembro de 2017. Foram escolhidos animais jovens, objetivando-se evitar possíveis respostas preexistentes contra infecções ou vacinação, normalmente realizadas no gado, e que podem alterar o perfil de resposta imune inata. Todo o delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG, protocolado sob o CEUA nº 5578010817.

Tabela 1. Descrição dos animais utilizados no experimento de RNA-seq. ID DO ANIMAL= identificação dos bovinos utilizada no campo experimental (CEJHB); CÓDIGO DO ANIMAL= identificação atribuída às amostras de células e RNA; SEXO: Fêmea (F) ou Macho (M); RAÇA: Bovino Gir Leiteiro (Gir) ou Bovino Holandês Preto e Branco (HPB); SUBESPÉCIE: *Bos indicus* ou *Bos taurus*.

CÓDIGO DO ANIMAL	ID DO ANIMAL	SEXO	NASCIMENTO	IDADE (MESES)	RAÇA	SUBESPÉCIE
G5	6300-1	F	10/05/2016	8	Gir	<i>Bos indicus</i>
G1	6301-1	F	09/06/2016	7	Gir	<i>Bos indicus</i>
G2	6302-1	F	10/06/2016	7	Gir	<i>Bos indicus</i>
G7	6304-1	F	12/06/2016	7	Gir	<i>Bos indicus</i>
G3	6305-1	F	18/06/2016	6	Gir	<i>Bos indicus</i>
G4	6306-1	F	21/06/2016	6	Gir	<i>Bos indicus</i>
G6	6307-1	F	21/06/2016	6	Gir	<i>Bos indicus</i>
H2	6200-1	M	15/04/2016	9	HPB	<i>Bos taurus</i>
H4	6202-1	F	24/04/2016	8	HPB	<i>Bos taurus</i>
H1	6203-1	M	24/04/2016	8	HPB	<i>Bos taurus</i>
H3	6204-1	F	25/04/2016	8	HPB	<i>Bos taurus</i>
H6	6163-1	F	24/09/2016	9	HPB	<i>Bos taurus</i>
H5	6157-1	F	23/08/2016	10	HPB	<i>Bos taurus</i>
H8	6159-1	F	12/09/2016	12	HPB	<i>Bos taurus</i>
H7	6161-1	F	14/09/2016	10	HPB	<i>Bos taurus</i>
H9	6156-1	F	22/08/2016	10	HPB	<i>Bos taurus</i>
H10	6172-1	F	29/12/2016	7	HPB	<i>Bos taurus</i>

4.2.2 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO BOVINO

O estabelecimento do protocolo de isolamento e diferenciação de macrófagos bovinos, *in vitro*, foi baseado no trabalho de Saldarriaga et al. (2003). Brevemente, o sangue periférico de animais resistentes (Gir, n=7) e susceptíveis (Holandês, n=10; Tabela 1) ao carrapato *R. microplus* foi coletado através de punção na veia jugular com tubos a vácuo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) após assepsia do local com álcool iodado. A camada leucoplaquetária foi separada por centrifugação a 300xg por 10 minutos e, em seguida, solubilizada em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*). A separação de células mononucleares foi feita por gradiente de polissacarídeo hidrofílico de densidade

1,077 g/ml (Ficoll, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) por centrifugação a 400xg por 40 min em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares foi submetido a lavagem com PBS, centrifugada a 300xg por 10 minutos e, em seguida, ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo), 2mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 mM piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e 1% de solução de aminoácidos não essenciais (MEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). As células obtidas foram cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ pelo período de 11 dias. Após 24 horas de incubação, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultivo substituído. Novas trocas do meio foram realizadas a cada três dias de cultura durante os 11 dias de diferenciação celular. No protocolo original descrito por Saldarriaga et al. (2003) foi utilizado o soro autólogo que, nesse trabalho, foi substituído pelo SFB para garantir uniformização de estímulos durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos, evitando uma polarização influenciada pela composição do soro que poderia variar individualmente.

O acompanhamento da mudança morfológica das células isoladas de sangue periférico bovino foi realizado por microscopia de luz (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as populações celulares caracterizadas por citometria de fluxo para verificar a expressão das moléculas de superfície celular CD14 e CD11b na primeira troca de meio (24h) e após 11 dias de diferenciação. Para tal, as células aderentes foram descoladas das placas utilizando-se uma Solução de Dissociação Celular Não Enzimática (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), conforme recomendações do fabricante, e contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer pelo ensaio de exclusão do azul de Tripán (STROBER, 2015), o qual avalia a integridade da membrana plasmática e viabilidade celular. Um total de 5×10^5 células foram incubadas com 5ul do anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD14-FITC bovino (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) e do anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD11b-FITC bovino (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) bovinos, separadamente, em um volume final de 50ul de PBS-SFB 5%, por 40 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS-SFB 5% e ressuspensas em 150 µL de PBS-SFB5% para análise no citômetro de fluxo BD FACSVersé (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). O protocolo de análise no citômetro consistiu em realizar a leitura da fluorescência primeiramente em células não marcadas, estabelecendo-se o limiar de fluorescência intrínseco das mesmas,

seguida da leitura das células marcadas com os anticorpos específicos. Toda a análise foi realizada após caracterização e monitoramento do desempenho do equipamento, utilizando-se o reagente CS&T (*Cytometer Setup and Tracking*; BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), objetivando a manutenção dos parâmetros analisados permitindo maior precisão e reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo citômetro. Os dados acerca dos percentuais de células expressando os marcadores CD14 e CD11b, no segundo e décimo primeiro dia de diferenciação *in vitro*, foram analisados pelo programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Com teste T para comparação dos valores encontrados, adotando significância com $p < 0,05$.

4.2.3 ESTIMULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS APÓS DIFERENCIAÇÃO

Os macrófagos de animais taurinos e zebuínos foram incubados, *in vitro*, com os seguintes tratamentos:

- Controle negativo, onde as células foram cultivadas apenas com meio RPMI completo com 10% de SFB;

- Lipopolissacarídeo de membrana de *E. coli* (LPS) na concentração de 100 ng/ml, que é conhecidamente um indutor do perfil M1 de resposta de macrófagos (WANG et al., 2014; MA et al., 2003; WANG et al., 2019a; RUI-ZHIA et al., 2019; FEITO et al., 2019; TOKARZ et al., 2019);

- Saliva do carrapato *R. microplus* em duas diferentes diluições, de 100x e 1.000x, realizadas em meio de cultura RPMI completo com 10% de SFB;

- LPS (100 ng/ml) + Saliva (diluída 1.000x), pipetados individualmente no meio de cultura previamente à adição no frasco contendo as células, realizado para verificar a influência de moléculas inoculadas pelo carrapato sobre o perfil de resposta de macrófagos previamente ativados para um fenótipo pró-inflamatório.

Os tratamentos foram mantidos por 48h em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e após esse período as células foram coletadas utilizando-se a Solução de Dissociação Celular Não Enzimática (Sigma, Missouri, EUA), conforme recomendações do fabricante e submetidas, em seguida, à extração de RNA.

4.3. PRAPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-SEQ)

4.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DAS CÉLULAS EM CULTURA

Os macrófagos coletados de frascos de cultura, estimulados conforme descrito acima, foram submetidos à extração de RNA com o *RNeasy Micro Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante com adaptações para melhorar a lise das células e rendimento do material genético extraído. Para tal, as células submetidas aos diferentes tratamentos foram coletadas, utilizando-se a Solução de Dissociação Celular Não Enzimática (Sigma, Missouri, EUA), e centrifugadas a 300xg, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo apenas as células foi mergulhado em nitrogênio líquido para imediato congelamento e rompimento das células. Em seguida, adicionou-se tampão de lise do kit (*RNeasy Micro Kit*; Qiagen) com homogeneização por pipetagem manual das amostras, em gelo. Desse ponto em diante, seguiu-se o protocolo do *RNeasy Micro Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme recomendação do fabricante. Brevemente, foi adicionado o mesmo volume, do tampão de lise, de álcool 70%. O conteúdo do tubo foi transferido para uma coluna de sílica, a qual o RNA se liga com alta afinidade, acoplada a um tubo coletor. Seguiu-se por etapas sucessivas de lavagem com tampão específico e uma etapa de tratamento com DNase para remoção de qualquer resquício de DNA remanescente na coluna. Após mais algumas etapas de lavagem, o RNA foi então eluído em 14 µL de água ultrapura, livre de RNases, fornecida pelo kit, e acondicionado em alíquotas de 2 µL e 4 µL a -80°C, até utilizações posteriores.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA

O RNA extraído de cada amostra foi quantificado no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As amostras de RNA também foram avaliadas quanto à sua

integridade. Para isso, foi utilizado o equipamento Bioanalyzer, e o RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, com 1 µL de amostra sem qualquer diluição. O valor de RIN (*RNA Integrity Number*), fornecido pelo 2100 Expert Programa (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), acoplado ao equipamento, foi o parâmetro utilizado para determinar a integridade da amostra de RNA. Esse índice varia de 1 a 10, onde 1 indica RNA muito degradado e 10 indica RNA íntegro (SCHROEDER et al., 2006).

4.3.3 PREPARO DA BIBLIOTECA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-SEQ)

A escolha das amostras a serem sequenciadas foi determinada pela quantidade e qualidade mínimas de RNA necessárias para o sequenciamento, de 100ng totais e valores mínimos de RIN igual a seis. Foram submetidos ao RNA-Seq as amostras de quatro animais de cada grupo genético (resistente - Gir: animais G2, G5, G6 e G7; e susceptível - Holandês: animais H1, H2, H3 e H5), tratados com LPS, saliva de carrapato diluída 1.000x e controle negativo apenas com meio de cultura, totalizando 24 amostras (oito animais x três tratamentos). As amostras que tiveram o RNA extraído, mas que não foram utilizadas para o sequenciamento (tanto as provenientes dos demais tratamentos realizados, quanto as dos outros animais coletados), foram utilizadas em ensaios como o de caracterização dos perfis de macrófagos e de RT-qPCR, ou permaneceram armazenadas a -80°C, para serem utilizadas em estudos posteriores.

O preparo da biblioteca de cDNA e o sequenciamento de nova geração através da técnica RNA-Seq foram realizados no Laboratório Multiusuário FAPESP localizado na ESALQ-USP (Piracicaba - SP). Para o preparo das bibliotecas de cDNA, o RNA total de cada amostra, contendo de 0,1 a 4 µg, foi purificado de acordo com o Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS Protocol (disponível em: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqstrandedmrna/truseq-stranded-mrna-sample-prep-ls-euc-ltf-15031058-e.pdf), utilizando microesferas magnéticas ligadas a oligos poli-T para separação do RNA

mensageiro contendo cauda poli-A. O mRNA purificado foi fragmentado em tampão específico (Illumina, San Diego, EUA) e ligado a *primers* para síntese do cDNA. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada com o *Second Strand Marking Master Mix* fornecido no kit da Illumina, obtendo-se, ao final do processo, o cDNA de extremidades abruptas, com uso de microesferas AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). A adenilação na extremidade 3' dos fragmentos foi realizada com o A-Tailing Mix (Illumina, San Diego, EUA). Essa tem como objetivo, evitar que os mesmos se liguem uns aos outros durante a reação com os adaptadores que, em contrapartida possuem um nucleotídeo T na extremidade 3' que permite a ligação complementar ao nucleotídeo A do fragmento. A hibridização para sequenciamento na *flow cell* foi feito com uso do Ligation Mix (Illumina, San Diego, EUA) que possui diversos conjuntos de adaptadores que se ligam aos fragmentos de cDNA. As bibliotecas foram purificadas e amplificadas por meio de PCR com *primers* específicos para os adaptadores (Illumina, San Diego, EUA) cujas condições seguem: 98°C por 30 s, 15 ciclos a 98°C por 10 s, 60°C por 30 s e 72 °C por 30 s, seguidos por 5 min a 72 °C.

Após o término do preparo das bibliotecas de cDNA, a qualidade do material genético foi avaliada no equipamento *Bioanalyser 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) usando o chip DNA 1000, com intuito de verificar a pureza e o tamanho das amostras, cujo produto final deve apresentar uma banda de aproximadamente 260 pb. A seguir, as bibliotecas foram quantificadas individualmente via PCR em Tempo Real (qPCR), com o uso do *Kit KAPA Library Quantification* (Roche, Basileia, Suíça), o qual possui 6 amostras padrões de concentração (entre 20 a 0,0002 pM) e tamanho de fragmento conhecido (452 pb), presentes no kit. A partir dos valores de Ct dos padrões foram determinadas as concentrações das amostras por meio de uma regressão linear. Uma vez calculadas essas concentrações, elas foram diluídas 10.000x, combinadas e então inseridas na lâmina de sequenciamento para clusterização.

4.3.4 SEQUENCIAMENTO DE mRNA

O sequenciamento do mRNA, feito a partir da biblioteca de cDNA dos macrófagos bovinos estimulados, foi realizado com a tecnologia de nova geração utilizando o equipamento *HiSeq 2500* (Illumina, San Diego, EUA). Essa metodologia é baseada na tecnologia de sequenciamento por síntese onde cada base nitrogenada é identificada à medida que é adicionada à cadeia recém-formada pela enzima DNA polimerase. As amostras contendo adaptadores específicos foram ligadas a oligos complementares posicionados na superfície das canaletas da lâmina, *HiSeq Flow Cell v4* e, posteriormente, amplificadas resultando em *clusters* (agrupamentos) de fragmentos iguais. A sequência dos agrupamentos foi, em seguida, determinada com uso do kit *HiSeq SBS Kit v4* (Illumina, San Diego, EUA) e leituras pareadas de 100 bp (2x), conforme recomendações do fabricante. Através dessa metodologia, nucleotídeos, complementares às sequências geradas nos *clusters*, especificamente marcados por fluorescência são incorporados a cada ciclo da reação e detectados após excitação por uma fonte luminosa conforme representado na Figura 6.

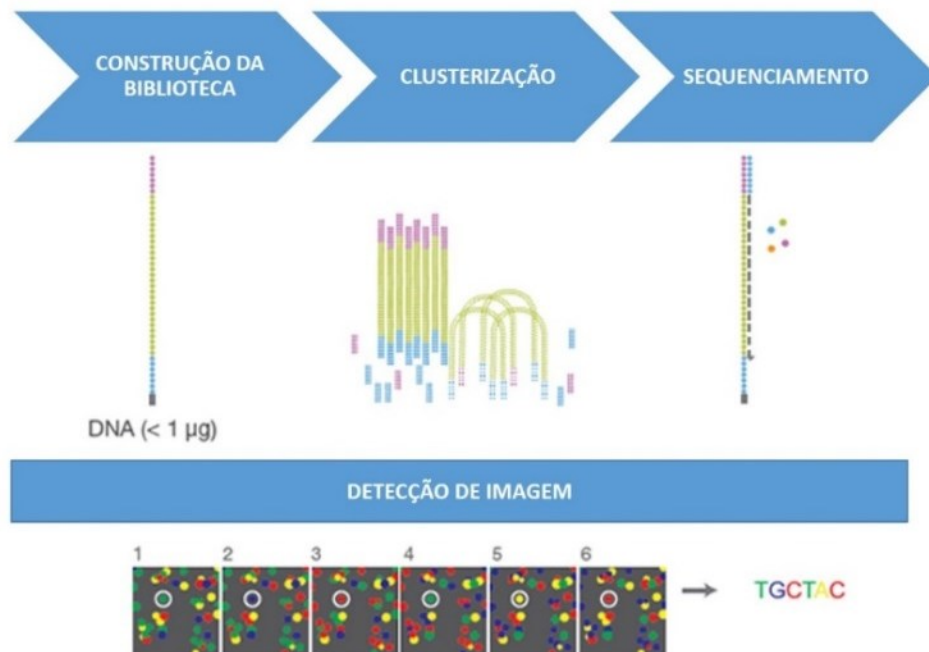


Figura 6. Esquema representativo da metodologia utilizada pela plataforma Illumina®. A metodologia de sequenciamento de RNA pela plataforma Illumina (San Diego, EUA) se baseia na construção de uma biblioteca de cDNA com adaptadores específicos para identificação se sequencias *sense* e *anti-sense* geradas pela amplificação e *clusterização* de sequencias de bases nitrogenadas marcadas com fluorocromos específicos. Adaptado de Illumina, 2019.

4.4 ANÁLISES *IN SILICO* DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

4.4.1 ANÁLISE DE QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

A análise da qualidade do sequenciamento de mRNA foi realizada pelo programa FastQC v0.11.7 (Babraham Bioinformatics, Cambridge, Reino Unido) a partir dos arquivos no formato *.fastq de cada biblioteca. Essa ferramenta apresenta, primeiramente, alguns parâmetros básicos das sequências, como número total e comprimento da menor e da maior sequência do arquivo. Um gráfico de Whisker foi gerado para analisar a qualidade média da biblioteca utilizando o *Phred quality score*, que é uma metodologia que avalia a confiabilidade dos dados gerados, atribuindo a cada nucleotídeo adicionado ao fragmento montado um valor que representa a probabilidade estimada de erro, ou seja, de uma base estar incorreta.

Também foi realizada a análise das sequências geradas pelo *Tile*, um módulo do *FastQC* (Babraham Bioinformatics, Cambridge, Reino Unido) que apresenta os *scores* de perda de qualidade associada com apenas parte da *flowcell*. O *score* de qualidade por sequência verifica se apenas um subconjunto tem valores de qualidade universalmente baixos. O conteúdo de cada base na sequência mostrou a proporção das bases em determinada posição das *reads*. O conteúdo GC foi comparado com a distribuição normal esperada para o genoma bovino. As bases não nomeadas (N) foram atribuídas quando o sequenciador foi incapaz de atribuir uma base específica com confiança suficiente. Com o module *Tile*, foi possível calcular a porcentagem de bases para cada posição na qual um N foi atribuído. O módulo tamanhos das sequências do *FastQC* foi utilizado para avaliar graficamente a distribuição dos tamanhos dos fragmentos nos arquivos analisados. Também foram listadas todas as sequências super-representadas (mais de 0,1% do total) para avaliar potenciais resultados significativos do ponto de vista biológico e contaminação da biblioteca com a presença de adaptadores. Após verificação da inexistência de problemas relativos à construção das bibliotecas e no sequenciamento, os arquivos obtidos foram submetidos a análises de bioinformática através do sistema operacional Linux® (Linux Foundation, São Francisco, Califórnia, EUA).

4.4.2 INDEXAÇÃO DO GENOMA, MAPEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS

A indexação e o mapeamento dos fragmentos gerados pelo sequenciamento do material genético foram realizadas pelo programa *Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (STAR) 2.6.0c (DOBIN et al., 2013), utilizando-se o genoma de referência bovino (UMD3.1.94) e o arquivo de anotação do genoma. Estes arquivos de genoma e anotação estão disponíveis no diretório de ftp do banco de dados Ensembl (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-94/fasta/bos_taurus/dna/ e ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-94/gtf/bos_taurus/, respectivamente). Para cada biblioteca foi gerado um arquivo com extensão “.sam”, contendo o alinhamento dos fragmentos em relação ao genoma de referência (UMD3.1.94). O passo seguinte consistiu na contagem das *reads* alinhadas em cada posição conhecida ou não do genoma de referência (genes), para cada biblioteca, realizada através da comparação com o arquivo de anotação genômica de bovinos fornecido juntamente com o genoma, no passo de indexação. Essas informações foram obtidas pelo arquivo de anotação do genoma indexado. Para estimar a abundância de transcritos gerados, foi utilizado o programa HTSeq-count v0.10.0 (ANDERS et al, 2015).

4.4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES

Para identificação dos genes diferencialmente expressos (DEG), utilizou-se a biblioteca edgeR versão 3.8 (ROBINSON et al., 2010), executada no ambiente R versão 3.5.0 “Joy in Playing” (<http://www.rproject.org/>). Utilizou-se como *input* para o edgeR, as contagens das leituras mapeadas no genoma de referência, para cada biblioteca gerada pelo sequenciamento, conforme descrito no item 4.4.2. Dois arquivos foram gerados após execução do *script* utilizado. Uma tabela, contendo os genes diferencialmente expressos entre os contrastes e o *p-value* calculado para cada gene. O *p-value* é a probabilidade de um valor tão ou mais extremo quanto o observado ocorrer dentro da hipótese nula. Além do *p-value*, também se obteve o valor de FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) que é muito utilizado para análises de genoma, proposto por

Benjamini e Hochberg (1995). Esse valor de FDR representa a proporção de erros atribuídos devido a descobertas falsas, ou seja, a taxa de falsos positivos dentre os valores significativos sendo, idealmente, a menor possível. Neste caso foram considerados os DEGs com $FDR \leq 0,05$. O segundo arquivo gerado pelo *script* do edgeR foi um gráfico de expressão relativa entre os tratamentos, que exhibe os valores obtidos do logaritmo na base 2 do *FoldChange* (logFC) em relação ao logaritmo na base 2 das contagens por milhão (logCPM, *Counts Per Million*) médias para cada gene, destacando os DEGs. Esse gráfico, do tipo *Volcano plot*, exhibe os genes com grande expressão diferencial (baixo *p-value* e *FoldChange* alto, chamados *upregulated*) e baixa expressão (baixo *p-value* e *FoldChange* baixo, chamados *down-regulated*). O *FoldChange* é a razão do total de *reads* de um determinado transcrito entre duas condições contrastantes. No presente trabalho, foram selecionados apenas os DEGs encontrados entre valores de logFC >1 (*upregulated*) ou <1 (*down-regulated*).

4.4.4 ONTOLOGIA GÊNICA

A anotação e interpretação das listas de DEGs obtidas nos contrastes avaliados no item 4.3.3, foram realizados pelo programa *online Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8 (HUANG et al., 2009), disponível em: <https://david.ncifcrf.gov/>. Para isso, foram utilizadas ferramentas como *Gene Accession Conversion Tool*, para conversão dos códigos de genes obtidos pelo Ensembl para os símbolos gênicos convencionais. A ferramenta *Functional Annotation Tool* foi utilizada para determinar os termos de ontologia gênica (*Gene Ontology*) mais relevantes de cada lista de genes.

4.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE VIAS METABÓLICAS

A partir das listas de DEGs identificados pelo edgeR, descrito no item 4.3.3, foi criado um arquivo contendo o campo de identificação do gene (ID) e FDR para

entrada de dados no Reactome® v67 (FABREGAT et al, 2018), plataforma gratuita disponível *online* (<http://www.reactome.org>) para interpretação biológica de vias e processos biológicos. Essa plataforma consiste em uma base de dados, curada semanalmente, que permite integrar dados moleculares, como DEGs, para identificação de processos biológicos e vias metabólicas de resposta utilizando-se aplicações de bioinformática (JOSHI-TOPE et al, 2005). Para atribuir função biológica, os dados enviados foram mapeados na base de dados do Reactome® seguida da criação de redes metabólicas pelo algoritmo de exploração de estudos genômicos que calcula a significância, baseado na quantidade de genes/moléculas que mapearam em uma função, rede ou via. A análise dos dados foi realizada selecionando-se o parâmetro “*Project to human*”, que converte os identificadores gênicos dos bovinos nos seus equivalentes humanos, pois todas as espécies possuem um conjunto próprio de identificadores. Esse parâmetro foi utilizado pelo Reactome® com base em informações de ortologia, extraída do banco de dados *Ensembl Compara* (VILELLA et al., 2009), utilizando as vias curadas para humanos e inferências computacionais. Os genes com ID e FDR, inseridos no programa, foram mapeados nas vias dos bancos de dados do Reactome® e realizadas análises de topologia e super-representações. Essas últimas constituem-se de testes estatísticos de distribuição hipergeométrica, que determinam se certas vias do Reactome® são enriquecidas (super-representadas) nos dados submetidos, isto é, se a proporção de genes diferencialmente expressos, dentro de uma dada via, excede a proporção de genes que poderiam ser esperados aleatoriamente. Esses testes indicam um *score* de probabilidade, corrigido pelo FDR, utilizando-se o método de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI E HOCHBERG, 1995). O *p-value* mostra a significância estatística de cada correspondência para uma dada amostra e o banco de dados para o qual a análise foi realizada, utilizando-se o Teste Binomial (FABREGAT et al., 2018). As análises de topologia consideraram a conectividade entre as moléculas representadas nas vias, chamadas de reações, agrupando-as. Se essas moléculas estão entre os dados inseridos, isto representa uma correspondência com as reações, e também pode indicar que os dados correspondem ao início, fim ou uma ramificação específica de um processo da via. Uma representação gráfica e interativa do conjunto de todas as vias biológicas do Reactome®, organizadas hierarquicamente, foi apresentada para cada lista de entrada baseada nos DEGs obtidos. Os resultados foram verificados através de representações gráficas onde o nível hierárquico mais alto é destacado por nós centrais (círculos) com vias secundárias organizadas

concentricamente (em anéis) ao redor deles. Os nós das vias podem ser conectados às sub-vias por arestas (linhas). As vias que continham identificadores dos dados inseridos foram realçadas em uma escala de cores de vermelho indicando a probabilidade corrigida (FDR). Em níveis intermediários, as vias foram representadas como ilustrações interativas associando os DEGs em processos bioquímicos com compartimentalização celulares.

4.5 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVO RELATIVO (RT-qPCR) PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO DE RNA E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MACROFÁGICO

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados para validar o sequenciamento de mRNA e verificar a participação da saliva do carrapato *R. microplus* na modulação de um perfil M1, induzido por LPS, em animais taurinos e zebuínos.

Para a validação do sequenciamento de RNA, foram escolhidos 7 genes diferencialmente expressos baseados em moléculas associadas à resposta imune, apontadas pelas análises de ontologia gênica, para os três tratamentos avaliados, contrastando-se as raças susceptível e resistente ao carrapato. Os genes avaliados foram *NRROS* (do inglês, *Negative Regulator of Reactive Oxygen Species*), *NFκB2* (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*), *C3* (do inglês, *Complement 3*), *BMPR1A* (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A*), *GATA3* (do inglês, *GATA Binding Protein 3*), *EGLN3* (do inglês, *Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3*) e *IRAK2* (do inglês, *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2*). Para avaliação da modulação de um perfil M1 induzida por saliva do carrapato *R. microplus* foram verificadas as expressões dos genes *NOS2* (do inglês, *Nitric Oxide Synthase 2*), *NRROS* (do inglês, *Negative Regulator of Reactive Oxygen Species*), *NFκB2* (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*), *IL-10* (interleucina-10) e *OAT* (do inglês, *Ornithine Aminotransferase*) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos estimulados com LPS (10ng/ml) e saliva diluída 1.000x. Todos os *primers*, sequencias, temperaturas de *melting* e referência estão apresentados posteriormente na Tabela 2.

4.5.1 TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA de todas as amostras de macrófagos (estimulados com as duas diluições de saliva – 100x e 1.000x; LPS; LPS com saliva diluída 1.000x; controle negativo, apenas com meio de cultura) foi extraído com auxílio do kit *RNAeasy* (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante. Essas amostras de RNA foram submetidas, individualmente, à reação de transcrição reversa para síntese de cDNA com o kit *SuperScript IV First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com recomendações do fabricante. O volume de RNA utilizado variou de acordo com a quantificação obtida após a extração, sendo utilizado 150ng por reação de síntese de cDNA em termociclador a 50-55°C por 10 min, seguidos de 10 min a 80°C, para inativação da transcriptase reversa, e resfriamento a 4°C. O cDNA produzido foi então armazenado a -20°C até o momento da reação de PCR quantitativo em Tempo Real.

4.5.2. SÍNTESE DE PRIMERS

Pares de *primers* foram desenhados com base em sequências específicas de mRNA para bovino, pesquisadas no banco de dados *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) no modo *Nucleotide*. As sequências de mRNA para bovinos, de cada uma das moléculas, foram submetidas a análise pelo programa *Primer Express v.3.0* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), que permite desenhar pares de *primers* através de alguns parâmetros específicos, como tamanho de sequência, percentual de bases CG e formação de estruturas secundárias. Em geral, foram escolhidos pares de *primers* com melhores valores de *score*, calculados com base em parâmetros de qualidade das sequências e baixa formação de estruturas secundárias. A formação de estruturas secundárias e temperatura de *melting* dos pares de *primers* foram confirmados na plataforma online *OligoAnalyzer 3.1* (IDT, Newark, Nova Jersey, EUA).

A busca pela especificidade por sequências bovinas dos pares de *primers* obtidos foi realizada com a ferramenta *online Blastn*, disponível em:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. *Primers* que se alinhavam com alta similaridade a sequências de outras espécies foram descartados. Para cálculo da expressão relativa dos genes no ensaio de RT-qPCR foram desenhados *primers* para os controles endógenos: *NADPH* (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*); *GAPDH* (do inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*); *RPLP0* (do inglês, *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*); Ubiquitina (do inglês, *Ubiquitin*); *18S* (do inglês, *18S ribosomal RNA*), descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências de primers utilizados para experimento de RT-qPCR. Genes: Nome dos alvos em inglês com abreviação; Sequência dos primers: sequência de nucleotídeos componentes do par de primer; Tipo: orientação do primer (F, Forward; R, Reverse); Tm: Temperatura de *melting* dos primers; Referência: número de acesso do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) da sequência utilizada como referência para cada par de primer. Em negrito estão indicados os genes utilizados para avaliar a modulação da resposta de macrófagos estimulados com LPS (10ng/ml) na presença de saliva do carrapato *R. microplus* diluída 1.000x. Os demais genes foram utilizados para validação do RNA-Seq. # controles endógenos para cálculo da expressão relativa por RT-qPCR.

GENES	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS (5' - 3')	TIPO	TM (°C)	REFERÊNCIA
Ornithine Aminotransferase (OAT)	CCAACCCACGGCGACAT TCTAGAATCTCATCCTCCTTGATCA	F R	64,5 63,2	NM_001034240.1
Interleukin 10 (IL-10)	GCACTACTCTGTTGCCTGGTCTT GCTGGTTGGCAAGTGGATACA	F R	66,2 64,8	NM_174088.1
Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2)	GCAGCGGAGTGACTTTCCAA GGATGCCAGGCAAGACTTG	F R	64,8 62,9	XM_019982494
Negative Regulator of Reactive Oxygen Species (NRROS)	CCAACATCACCACCGTCAAC TCATATCCAGGAAGCGGAGACT	F R	63,2 64,5	NM_001034391.1
Nuclear Factor Kappa B Subunit 2 (NFkB2)	CGAGAAGGGCCGGAAGAC ATCTTGGCAGGTCCCTCGTA	F R	63,8 64,7	NM_001102101.1
Complement 3 (C3)	GCTGCACGAGGCTAAAGACAT TTCGCAACTCTCTGTAGTGGTTTT	F R	64,7 65	NM_001040469.2
Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A (BMPR1A)	GATGGTTCGGCAGGTTGGT TCTCCCCACGCCATTTACC	F R	58 57,3	NM_001076800.1
GATA Binding Protein 3 (GATA3)	TGCTAAACTACCCCGCAAAGAT GGGTCGTTTAAGGATTTGTTTTCA	F R	64,2 62,5	XM_005214127
Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3 (EGLN3)	CCTAGTTGGCCAGCGGTTTA TGCTTTCAGGTTCTTGCTTTGAT	F R	64,1 63,6	NM_001101164.2
Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2 (IRAK2)	CCCAGCGCATCAGCATCT AACATTGGAGCTCTTGACATTGC	F R	64,5 63,9	NM_001075696.2
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase (NADPH)#	CAGCAGTATTCGCCAGTTCC CAACCAACACAGCCACTTCA	F R	62,8 62,7	XM_005227789.2
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)#	GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT	F R	56,8 57,8	NM_001034034
Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0)#	CAACCCTGAAGTGCTTGACAT AGGCAGATGGATCAGCCA	F R	62,9 63	NM_001012682
Ubiquitin#	GGCAAGACCATCACCCCTGGAA GCCACCCCTCAGACGAAGGA	F R	66,3 67,5	XM_005217976
18S ribosomal RNA (18S)#	GTAACCCGTTGCACCCATT CCATCCAATCGGTAGTAGCG	F R	65 61,8	XR_003508809.1

4.5.3 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-qPCR

A padronização das reações de RT-qPCR consistiu em estabelecer a melhor condição de amplificação das amostras e dos pares de *primers* utilizados (Tabela 2). Para isso, foi utilizado um *pool* equimolar contendo cDNA oriundo todas as amostras de macrófagos cultivados sob os diferentes estímulos (controle negativo, saliva diluída 1.000x, saliva diluída 1.000x combinada com LPS e apenas LPS). Foram testadas cinco quantidades de amostra de cDNA do *pool* equimolar (100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng e 6,25ng) e duas concentrações diferentes de *primer* (100nM e 200nM), em duplicata. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos (15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60 ou 63°C e mais 30 segundos a 60°C). Ao final de cada reação, foi analisada a curva de dissociação (*melting point*), para assegurar que cada reação amplificou um fragmento único. Os valores de Ct (do inglês, *Cycle threshold*) indicaram o número de ciclos da PCR no qual o sinal de fluorescência alcançou o limiar da curva de amplificação (BUSTIN, 2000). Valores de Ct dos pares de *primers* cujas diluições seriadas das amostras, foram satisfatoriamente amplificadas (quando ocorreu a amplificação de pelo menos três das quantidades de *pool* de amostra, com um pico único da curva de *melting*) foram utilizados para o cálculo de eficiência pelo programa REST© 2009 (PFAFFL et al., 2002). Para cada gene, foi escolhida a melhor condição de concentração de *primer* e amostra de cDNA, de modo que proporcionassem valores de eficiência entre 90-110% para todos os genes, alvos e controles endógenos, tal como descrito por Livak e Schmittgen (2001). A eficiência da reação indica o desempenho geral do ensaio da qPCR (WONG E MEDRANO, 2005). O cálculo da eficiência foi baseado na análise de regressão linear simples dos valores de Ct em função do logaritmo das concentrações do cDNA para a obtenção do *slope* (inclinação da reta) (LOBO E LOBO, 2014). A eficiência para cada par de *primer* foi calculada pela equação:

$$E = 10(-1/\text{inclinação da reta})$$

Onde, E é a eficiência da reação (PFAFFL et al., 2002).

O valor de *slope* de -3.32 resulta em uma eficiência igual a 2, o que indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Isso quer dizer que a quantidade de produto formado deve dobrar a cada ciclo. Os *slopes* menores que -3,32 indicam reações com menos de 100% de eficiência e *slopes* maiores que -3.32 podem indicar

uma má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; VANGUILDER et al., 2008). A análise de eficiência foi realizada para todos os pares de *primers* descritos na Tabela 2.

A estabilidade dos pares *primers* de controle endógeno testados (NADPH, GAPDH, RPLP0, Ubiquitina e 18S) foi avaliada pela ferramenta GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), dada pelo valor de *M*. Esse valor é calculado para cada gene, baseando-se na variação par a par com todos os outros genes de controle endógeno. Quanto menor o valor de *M*, mais estável é a expressão do gene e confiável seu uso como controle endógeno para ensaios de PCR em tempo real relativo (VANDESOMPELE et al., 2002). Foram selecionados dois genes como controle endógeno mais estáveis, apresentando valores de *M* inferior a 0,5, para cálculos de expressão relativa de todos os alvos.

4.5.4 REAÇÕES DE RT-qPCR E CÁLCULOS DE EXPRESSÃO

Após estabelecimento das melhores condições de reação para cada par de *primer* e escolha dos genes de controles endógenos mais estáveis, foram realizadas as reações de amplificação por RT-qPCR, em triplicata, para cada alvo analisado. Cada reação consistiu em 10 µl de volume total contendo quantidades variáveis de cDNA, conforme estabelecido no teste de eficiência, *primers forward* e *reverse*, 5 µl de PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e água *nuclease free* para completar o volume final. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60 ou 63°C por 30 segundos e mais 30 segundos a 60°C, em termociclador *ABI Prism 7500 fast* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Foram calculados os valores de Ct médio do gene alvo e dos controles endógenos para cada amostra no programa *ABI Real Time PCR 7500 v2.3* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Esses resultados foram compilados em uma planilha no software *Microsoft Excel* e utilizados para cálculo dos valores de ΔCt . Para tal, a diferença entre o Ct de cada alvo (Ct alvo) e a média geométrica dos Cts dos controles endógenos (Ct ref) foi calculada, normalizando-se os dados de expressão através da fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ ref}$$

As análises estatísticas foram feitas no programa *Sigma Plot* (Systat Programa Inc., San Jose, California) e, basicamente, consistiram em testar igualdade entre médias da variação de expressão gênica relativa das diferentes raças e tratamentos considerados neste experimento. Foi adotado $p < 0,05$ para representar diferenças significativas nos contrastes experimentais analisados. A representação gráfica desses dados foi realizada pelo programa *GraphPad Prism versão 5.0* (GraphPad Programa, La Jolla California, USA).

5 RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS BOVINOS EM MACRÓFAGOS

O protocolo para isolamento de monócitos e diferenciação em macrófagos, *in vitro*, foi desenvolvido conforme descrito por Saldarriaga et al. (2003), com modificação no uso do soro autólogo que, nesse trabalho, foi substituído pelo soro fetal bovino (SFB) para garantir uniformização de estímulos durante a diferenciação celular, evitando influência da composição do soro, que poderia variar individualmente. A diferenciação de monócitos em macrófagos foi acompanhada pela análise da morfologia das células, por microscopia de luz, e da expressão dos marcadores CD11b e CD14, por citometria de fluxo. Houve modificação do aspecto morfológico das células ao longo do tempo de diferenciação (Figura 7). Após 24h de cultura, as células apresentavam um aspecto arredondado com tamanhos variados (Figura 7a), condizente com os diversos subtipos de células mononucleares isolados pelo gradiente de Ficoll (descrito no item 4.2.2). Após 11 dias de diferenciação, houve mudanças na morfologia das células, todas aderentes, formando projeções de membrana e tomando um formato espreado, característicos de macrófagos observados *in vitro* (Figura 7b). As mudanças morfológicas também foram acompanhadas por um aumento significativo na expressão de CD14 (Figuras 7c e 7e), e diminuição da expressão de CD11b (Figura 7c e 7d), após 11 dias de diferenciação celular. De acordo com a literatura, macrófagos apresentam uma alta expressão de CD14 e baixa de CD11b quando comparado aos monócitos (ZIEGLER-HEITBROCK E ULEVITCH, 1993; SALDARRIAGA et al., 2003; AN et al., 2017), o que indica que o protocolo de diferenciação celular foi desenvolvido com sucesso.

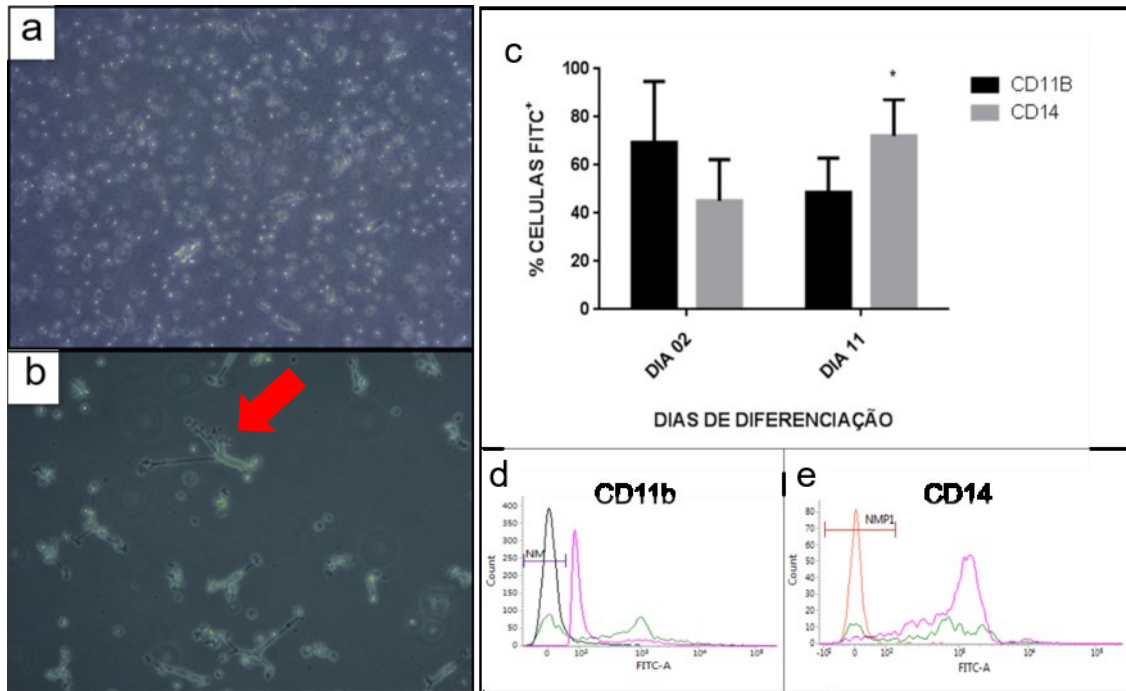


Figura 7. Caracterização da diferenciação de monócitos de sangue periférico bovino em macrófagos, in vitro. Fotografias obtidas por microscopia de luz de campo escuro no aumento de 20x. (a) PBMC com 24 h de cultura, já apresentando alguns monócitos aderidos. (b) Células diferenciadas com aspecto morfológico de macrófagos após 11 dias de cultura (seta vermelha). A expressão dos marcadores CD14 e CD11b foi avaliada, individualmente, por citometria de fluxo com anticorpos conjugados com FITC. (c) Média do percentual de células expressando os marcadores CD11b (preto) e CD14 (cinza) nos dias 02 e 11 de diferenciação em animais taurinos (HPB; n=4) e zebuínos (Gir; n=4). Histogramas representativos da expressão dos marcadores CD11b (d) e CD14 (e), respectivamente, destacando as populações não marcadas (NM e NMP1) e a expressão dos marcadores analisados com 2 dias (verde) e 11 dias (rosa).

5.1.1 ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS IN VITRO: AVALIAÇÃO DA SALIVA DE CARRAPATO *R. microplus* E QUALIDADE DO MATERIAL GENÉTICO

Uma vez que o protocolo de diferenciação de monócitos de sangue periférico bovino em macrófagos foi estabelecido, as células foram estimuladas, por 48h, com lipopolissacarídeo de membrana de *E.coli* (LPS; 100 ng/ml), saliva do carrapato *R. microplus* em duas diferentes diluições, de 100x e 1.000x, além da combinação de LPS (100 ng/ml) + Saliva (diluída 1.000x) e o controle negativo sem estimulação, apenas com meio de cultura, em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

A saliva de *R. microplus*, coletada conforme descrito no item 4.2.3, resultou em um pool de, aproximadamente, 10ml com concentração média de proteínas de 1254 ng/ml, avaliada pelo método de Bradford. A integridade da amostra de saliva foi

avaliada por gel desnaturante de poli(acrilamida) que revelou ausência de bandas de degradação abaixo de 10KDa (Figura 8). Também foi realizado um teste de esterilidade da saliva em placa com meio de cultura DMEM suplementado com 5% SFB, em estufa a 37°C com 5% de CO₂, não apresentando crescimento de micro-organismos no período de 7 dias avaliados (dados não mostrados). Esses resultados demonstram que a saliva de *R. microplus*, utilizada nos experimentos, apresentou quantidade e qualidade suficientes para desenvolvimento dos ensaios propostos com os macrófagos diferenciados.

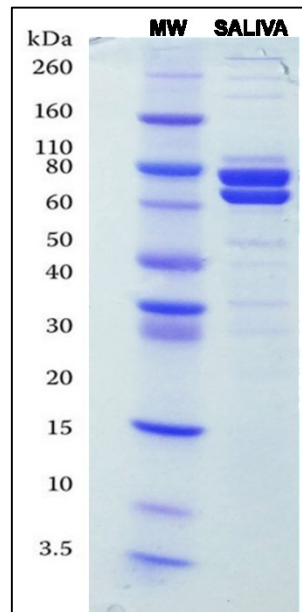


Figura 8. Eletroforese para análise qualitativa da saliva do carrapato *R. microplus*. A saliva do carrapato foi coletada de teleóginas, armazenadas na forma de *pool*, e submetida a eletroforese em gel de poli(acrilamida) com gradiente 8-16% para verificar degradação proteica. A ausência de bandas fortes com peso molecular abaixo de 10KDa indica integridade da amostra (saliva). MW: Marcador molecular.

Para atender as características de quantidade e qualidade do RNA para sequenciamento foram necessárias várias etapas prévias de padronização utilizando quantidades variadas de PBMC para diferenciação de macrófagos, objetivando maior rendimento, além da avaliação da quantidade e qualidade do RNA obtido após estimulação tanto com saliva de *R. microplus*, nas diluições de 100 e 1.000x, quanto LPS. Os resultados demonstraram que seria necessário um *input* mínimo de 1×10^8 PBMC para obtenção de quantidades superiores a 1ug de RNA por estímulo (dados não mostrados). As análises do material genético extraído dos macrófagos, estimulados pelo período de 48 horas, indicaram que o uso da saliva diluída 100x afetou quantidade de RNA, quando comparado aos outros estímulos (Tabela 3), no

entanto, os índices de qualidade se apresentaram dentro do que é aceitável para as reações de sequenciamento (RIN \geq 6; GTEX, 2009).

Tabela 3. Concentração e qualidade do RNA extraído dos macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos, *in vitro*. Valores de concentração do RNA, expressos em ng/ μ l \pm desvio padrão da média (DP; n=4 para cada tratamento dentro de cada raça), foram obtidos em equipamento Nanodrop 1000 e valores de RIN (do inglês, *RNA integrity number*) obtidos por Bioanalyzer, com o kit RNA 6000 Pico.

Tratamento	Zebuino/ GIR		Taurino/HPB	
	Concentração RNA (ng/ μ l) \pm DP	RIN	Concentração RNA (ng/ μ l) \pm DP	RIN
Controle negativo	48,99 \pm 8,44	7,18 \pm 0,41	62,35 \pm 25,76	7,03 \pm 0,26
LPS	47,65 \pm 5,20	7,18 \pm 0,15	56,34 \pm 34,56	6,38 \pm 0,85
Saliva diluída 100x	28,90 \pm 8,19	7,58 \pm 0,22	37,40 \pm 10,22	6,95 \pm 0,34
Saliva diluída 1.000x	39,75 \pm 6,23	6,85 \pm 0,78	36,36 \pm 9,49	7,00 \pm 0,27
Saliva 1.000x + LPS	35,75 \pm 3,59	7,20 \pm 0,39	45,31 \pm 13,00	6,84 \pm 0,43

5.2 SEQUENCIAMENTO DO mRNA DE MACRÓFAGOS BOVINOS E ANÁLISE DE PERFIL QUALITATIVO DO TRANSCRIPTOMA

Para o sequenciamento de RNA foram selecionadas as seguintes amostras:

- **Controle negativo:** para caracterização dos macrófagos em homeostase, indicando potenciais diferenças entre animais taurinos e zebuínos que pudessem influenciar na ativação celular e estivessem associados com os fenótipos de infestação por carrapatos apresentado pelos bovinos;

- **LPS:** para caracterização da resposta pró-inflamatória associada com o fenótipo M1 de macrófagos diferenciados de animais taurinos e zebuínos;

- **Saliva diluída 1.000x:** para verificar como a saliva do carrapato *R. microplus* ativa, em pequenas quantidades, macrófagos em animais taurinos e zebuínos. Esse tratamento foi escolhido em detrimento à diluição de 100x dada a concentração de RNA mais alta, conforme demonstrado na Tabela 3.

As demais amostras foram estocadas a -80°C para sequenciamento em projetos futuros. Para verificar se a saliva modula o estado pró-inflamatório induzido pelo LPS também foram feitos ensaios de PCR em tempo real com genes chave para

a caracterização de uma resposta M1 nas amostras de células estimuladas com LPS + saliva diluída 1.000x. Os resultados serão apresentados nos tópicos seguintes.

5.2.1 ESTABELECIMENTO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA PARA SEQUENCIAMENTO

A qualidade das bibliotecas de cDNA, obtidas a partir do mRNA extraído dos macrófagos bovinos, diferenciados *in vitro*, sem ativação ou estimulados com saliva do carrapato *R. microplus* (diluída 1000x) ou LPS, foi avaliada por Bioanalyzer utilizando o chip DNA 1000. Previamente ao sequenciamento, dez das 24 amostras submetidas (8 animais x 3 tratamentos) foram escolhidas aleatoriamente, cinco em cada raça, para essa avaliação. Para todas elas foi observada a formação de apenas uma banda com aproximadamente 260 pb (Figura 9), indicando a integridade das bibliotecas.



Figura 9. Análise de integridade das bibliotecas de cDNA. Amostras provenientes de macrófagos bovinos não estimulados (S. est.) e estimulados com LPS ou saliva de *R. microplus* diluída 1.000x (Saliva), submetidas ao sequenciamento de RNA. Estão representadas dez amostras, sendo 5 de animais taurinos (HPB; H1, H2, H3 e H5) e 5 de animais zebuínos (Gir; G2, G5, G6 e G7), escolhidas aleatoriamente entre as 24 amostras totais submetidas ao sequenciamento, para a análise pelo equipamento Bioanalyzer com chip DNA 1000. Bandas únicas de aproximadamente 260pb são indicativas de integridade e portanto, boa qualidade das amostras. Linhas em roxo são alinhadas ao marcador de 1500 pb e linhas verdes alinhadas ao marcador de 15 pb. *Ladder*: Marcador de peso molecular.

Todas as amostras das bibliotecas de cDNA sequenciadas (n=24) foram quantificadas individualmente por RT-qPCR, previamente ao sequenciamento, utilizando-se o *Kit KAPA Library Quantification* (Roche, Basileia, Suíça). As quantidades de cDNA estimadas (Tabela 4) foram baseadas na análise de regressão linear simples dos valores de concentração de seis padrões de amostras do kit em função dos valores de Ct obtidos para cada um. Tendo-se determinado as quantidades de cada amostra, elas foram diluídas 10.000x e submetidas ao sequenciamento de larga escala.

Tabela 4. Quantidades de cDNA das bibliotecas submetidas ao RNA-Seq. Concentrações das 24 amostras de cDNA provenientes de macrófagos bovinos cultivados, *in vitro*, sem estimulação (S.est.), ativados com LPS (10ng/ml) ou saliva de carrapato *R. microplus* diluída 1.000x (Saliva), em nanomolar (nM), calculadas por meio de uma regressão linear, estabelecida a partir das concentrações conhecidos dos padrões, através de reações RT-qPCR com o kit KAPA Library Quantification (Roche, Basileia, Suíça).

Animal	Subespécie	Raça	Amostra	Concentração (nM)
H1	<i>Bos taurus</i>	HPB	S. est.	307,68
			LPS	346,23
			Saliva	351,07
H2	<i>Bos taurus</i>	HPB	S. est.	184,04
			LPS	297,18
			Saliva	189,23
H3	<i>Bos taurus</i>	HPB	S. est.	299,25
			LPS	126,49
			Saliva	343,83
H5	<i>Bos taurus</i>	HPB	S. est.	311,98
			LPS	318,55
			Saliva	371,13
G2	<i>Bos indicus</i>	Gir	S. est.	234,68
			LPS	426,43
			Saliva	210,00
G5	<i>Bos indicus</i>	Gir	S. est.	256,85
			LPS	307,68
			Saliva	260,44
G6	<i>Bos indicus</i>	Gir	S. est.	123,88
			LPS	222,00
			Saliva	155,79
G7	<i>Bos indicus</i>	Gir	S. est.	283,08
			LPS	314,15
			Saliva	264,09

5.2.2 ANÁLISE QUALITATIVA DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE cDNA

O sequenciamento do cDNA foi feito pelo método *paired-end* gerando 48 arquivos referentes às 24 amostras (Tabela 4) que foram disponibilizados através da plataforma *online* BaseSpace (<http://basespace.illumina.com>), localizada em nuvem para armazenamento e análise de dados de sequenciamento oriundos de equipamentos Illumina®. Como resultado foram obtidas, em média, 10,6 milhões de sequências por amostra, cada uma com comprimento de 101 pares de base, apresentados na forma de arquivos *.fastq.

Características intrínsecas às *reads* sequenciadas que podem interferir na montagem, como conteúdo GC (percentual de guanina mais citosina), adaptadores, vetores, contaminação, sequências super-representadas, regiões de baixas qualidades e *reads* duplicadas foram analisadas pelo programa FastQC utilizando como entrada os arquivos no formato *.fastq. Os parâmetros apresentados pela ferramenta foram bastante uniformes entre todas as amostras sequenciadas (Figura 10, representativa). De modo geral, as sequências geradas apresentaram bases com valor de *Phred* superior a 30, indicando uma alta probabilidade de identificação assertiva das nucleobases de acordo com os algoritmos descritos por Ewing et al. (1998).

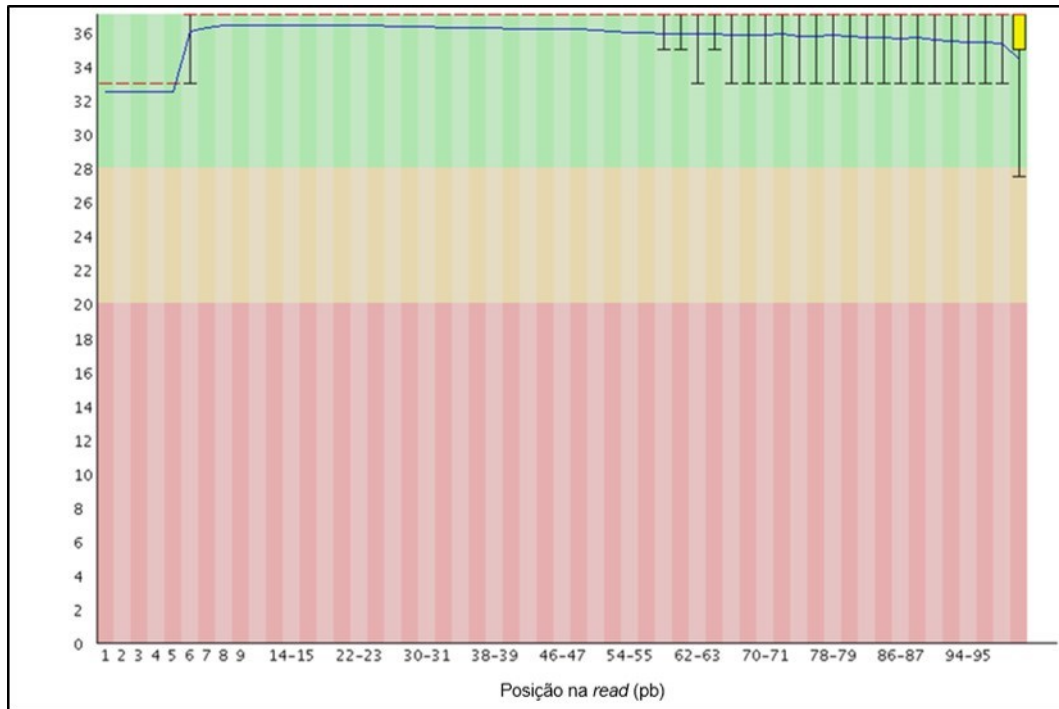


Figura 10. Gráfico representativo da qualidade das sequências por base. Informações básicas obtidas com o programa FastQC referentes às sequências do animal G5 do grupo não estimulado. O fundo do gráfico divide o eixo y em três níveis de confiança: muito confiável (verde), qualidade razoável (laranja) e baixa qualidade (vermelho). A linha vermelha central e a azul representam, respectivamente, o valor da mediana e a média da qualidade. As caixas amarelas representam a amplitude interquartil (25-75%). No eixo das abscissas (eixo X) tem-se a posição ou intervalo de posição das *reads* em pares de bases e no eixo das coordenadas (eixo Y) tem-se o valor *Phred* associado a cada posição ou intervalo de posições. Quanto maior o valor de *Phred*, melhor é a confiança do *base call* e a qualidade do sequenciamento.

Os demais parâmetros apresentados pelo programa FastQC como *scores* de qualidade, conteúdo de sequências por base, presença de adaptadores também foram analisados. Os 48 arquivos *.fastq apresentaram uniformidade em qualidade, ausência de sequências de adaptadores Illumina®, ou qualquer contaminação (Figura 11, representativa). Portanto, não foi necessário utilizar nenhuma ferramenta para tratamento/limpeza das *reads* obtidas, indicando um sequenciamento de alta qualidade com excelente acurácia.

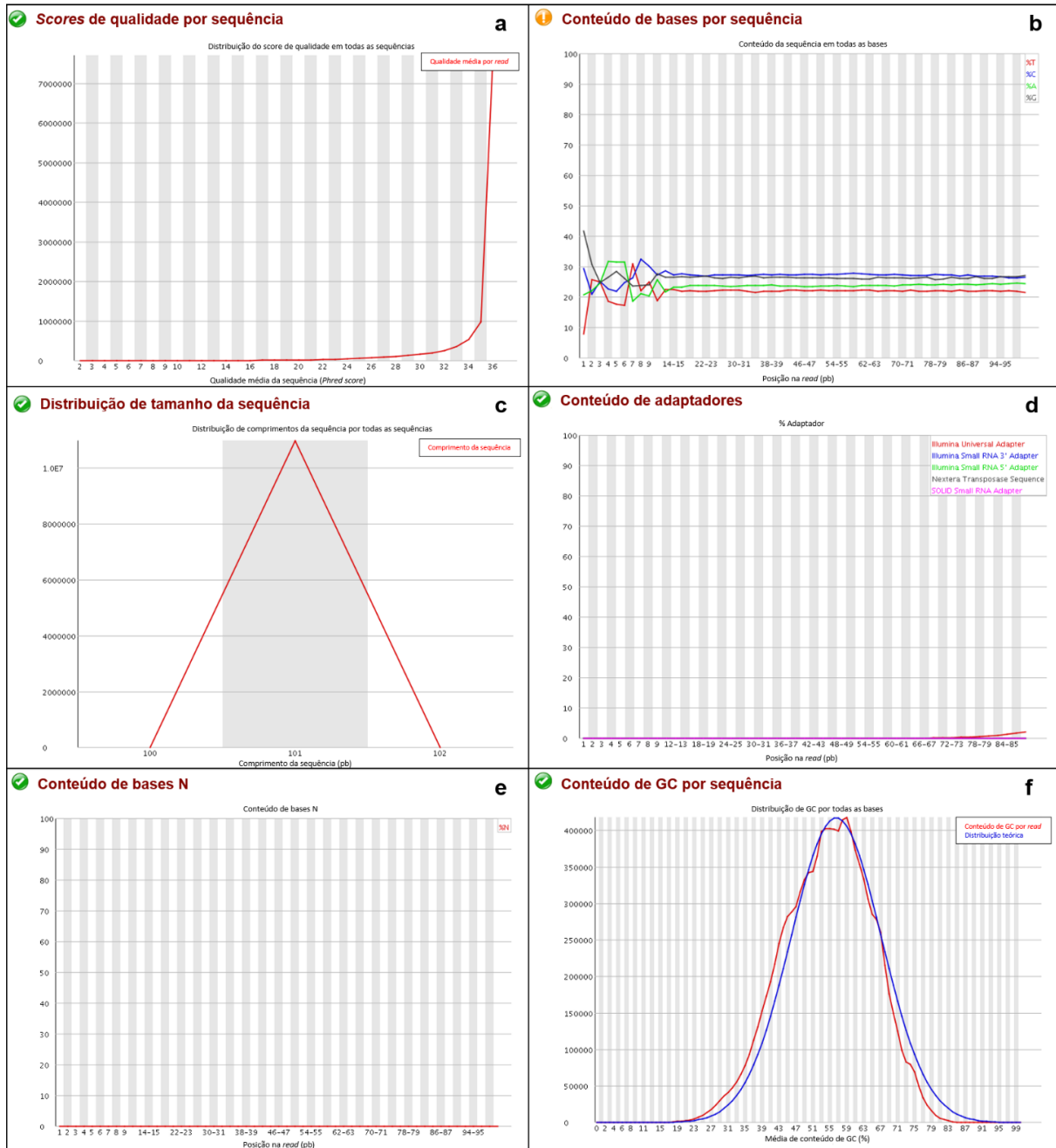


Figura 11. Gráficos representativos dos parâmetros de qualidade do sequenciamento de cDNA. Informações básicas obtidas com o programa FastQC referentes às sequências do animal G5 do grupo não estimulado. (a) Gráfico de score de qualidade, onde a média de qualidade é indicada pelo algoritmo *Phred* variando entre 30 e 36 por sequência; (b) Conteúdo de bases por sequências indicados pela variação de cor onde vermelho representa as timinas, azul, as citosinas, verde, as adeninas e preto, as guaninas; (c) Distribuição média de tamanhos das sequências, indicando 101 pares de bases por sequência; (d) % do conteúdo de adaptadores (eixo y) de acordo com a posição nos *reads* (eixo x) indicando ausência de contaminação por adaptadores; (e) % do conteúdo de bases N (não lidas; eixo y) em relação a posição das sequências obtidas (eixo x), indicando ausência das mesmas; (f) % do conteúdo de GC por sequência (eixo x), em vermelho, a distribuição do conteúdo médio encontrado por *read* e em azul, uma distribuição hipotética.

5.2.3 ALINHAMENTO E CONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS NAS DIFERENTES AMOSTRAS

As sequências de cada biblioteca (*reads*) foram alinhadas, separadamente, ao genoma referência de *Bos taurus* (UMD3.1.94) pelo programa STAR (DOBIN et al., 2013) que mapeia as *reads* que se alinham com cada gene do genoma, sendo capaz de distinguir a quantidade de sequências não mapeadas e/ou alinhadas em um único ou mais genes (mapeamento único ou múltiplo, respectivamente). Os resultados obtidos indicaram taxas de mapeamento único variando entre 84,64 - 90,58% e de *reads* não mapeadas abaixo de 10% entre todas as bibliotecas, exceto para o animal G6 (células não estimuladas) cujas *reads* não mapeados ficaram em cerca de 11% (Tabela 5). Os dados de mapeamento único, obtidos para todos os genes, sem distinção entre eles, pelo programa STAR (DOBIN et al., 2013), foram utilizados, em seguida, pelo programa HTSeq-count (ANDERS et al, 2015) para quantificar as *reads* mapeadas uma única vez em cada gene (Tabela 5). Baseados nos resultados, podemos inferir que qualidade e especificidade do sequenciamento foram elevadas, gerando dados confiáveis para as análises posteriores de quantificação da expressão gênica nos contrastes experimentais.

Tabela 5. Alinhamento das reads geradas pelo sequenciamento de cDNA de macrófagos no genoma de *Bos taurus* (UMD3.1.94). O alinhamento de reads de cada amostra submetida ao sequenciamento foi realizado pelo programa STAR (DOBIN et al., 2013), apresentando como resultados a taxa de mapeamento múltiplo (%Map. Múltiplo), mapeamento único (%Map. Único) e taxa de reads não mapeadas (%Não Mapeados) para cada amostra sequenciada.

Animal	Raça	Subespécie	Tratamento	%Map. Múltiplo	%Map. Único	%Não Mapeados
H1	Holandês	<i>Bos taurus</i>	LPS	3,5	90,59	5,91
			Saliva	3,55	89,76	6,69
			Sem estímulo	3,5	89,76	6,74
H2	Holandês	<i>Bos taurus</i>	LPS	4,22	88,86	6,92
			Saliva	4,06	89,33	6,61
			Sem estímulo	4,4	88,85	6,76
H3	Holandês	<i>Bos taurus</i>	LPS	4,24	87,91	7,84
			Saliva	4,07	89,61	6,32
			Sem estímulo	4,11	88,86	7,03
H5	Holandês	<i>Bos taurus</i>	LPS	3,36	89,54	7,1
			Saliva	2,81	90,06	7,13
			Sem estímulo	3,39	89,6	7,01
G2	Gir	<i>Bos indicus</i>	LPS	3,13	90,41	6,46
			Saliva	3,92	89,44	6,63
			Sem estímulo	3,68	90,21	6,11
G5	Gir	<i>Bos indicus</i>	LPS	3,99	89,21	6,81
			Saliva	4,39	88,54	7,08
			Sem estímulo	3,81	89,03	7,16
G6	Gir	<i>Bos indicus</i>	LPS	4,23	88,86	6,91
			Saliva	3,07	89,19	7,74
			Sem estímulo	3,99	84,64	11,38
G7	Gir	<i>Bos indicus</i>	LPS	3,29	90,24	6,47
			Saliva	3,56	89,97	6,47
			Sem estímulo	3,29	89,36	7,35

5.3. ANÁLISE EXPERIMENTAL DAS RESPOSTAS DE MACRÓFAGOS DE ANIMAIS TAURINOS E ZEBUÍNOS FRENTE AOS DIFERENTES ESTÍMULOS DE ATIVAÇÃO

A biblioteca edgeR do pacote estatístico R (ROBINSON et al., 2010) foi utilizada para uma análise comparativa entre tratamentos para obtenção dos DEGs, com intuito de caracterizar as respostas de macrófagos de animais taurinos e zebuínos aos estímulos utilizados. Essa identificação dos DEGs foi realizada contrastando-se os seguintes grupos:

A - Macrófagos não estimulados (n=4) versus macrófagos tratados com LPS (100ug/ml; n=4) em animais taurinos e zebuínos: utilizado para validar a eficácia do ensaio, já que o LPS é um ativador de macrófagos M1 e, conseqüentemente, como controle positivo do ensaio, deve induzir DEGs relacionadas com a ativação de respostas inflamatórias específicas;

B - Macrófagos não estimulados de animais taurinos (HPB, *Bos taurus*, n=4) versus macrófagos não estimulados de animais zebuínos (Gir, *Bos indicus*, n=4): uma vez que os monócitos derivados de sangue periférico, de ambas as raças, sofreram a mesma pressão seletiva de diferenciação, *in vitro*, esse contraste indicará se há diferenças no comprometimento genérico de macrófagos com padrões de resposta associados à raça bovina;

C - Macrófagos tratados com LPS (100ug/ml) de animais taurinos (HPB, *Bos taurus*, n=4) versus macrófagos tratados com LPS (100ug/ml) de animais zebuínos (Gir, *Bos indicus*, n=4): utilizado para indicar se há diferenças na ativação de cascatas inflamatórias comprometidas com o fenótipo M1 de macrófagos que estejam associados com as raças bovinas;

D - Macrófagos tratados com saliva de *R. microplus*, diluída 1.000x, de animais taurinos (HPB, *Bos taurus*, n=4) versus macrófagos de animais zebuínos (Gir, *Bos indicus*, n=4) tratados com saliva de *R. microplus*, diluída 1.000x: utilizado para indicar se há diferenças significativas frente à ativação de macrófagos pela saliva do carrapato que possam estar associadas com os fenótipos de resistência e susceptibilidade a esse parasito observado nessas raças.

Para facilitar a interpretação dos resultados acerca dos DEGs, os dados serão apresentados, conjuntamente, na forma de tópicos. Primeiramente, serão

apresentados os dados para validação do ensaio experimental, utilizando os DEGs no contraste de tratamentos dentro de uma mesma raça (contraste A). Em um segundo momento, serão avaliadas as diferenças de resposta entre as raças taurinas e zebuínas, considerando um mesmo tratamento das células (Contrastes B, C e D).

5.3.1 VALIDAÇÃO DOS ESTÍMULOS EXPERIMENTAIS NA ATIVAÇÃO CELULAR DOS MACRÓFAGOS

A eficácia do ensaio de estimulação das células foi estabelecida pelo contraste dos dados de contagem de *reads* do sequenciamento de macrófagos não estimulados *versus* macrófagos tratados com LPS, já que o LPS é um potente ativador de macrófagos M1 e, conseqüentemente, como controle positivo do ensaio, deve induzir DEGs relacionadas com a ativação de respostas inflamatórias específicas.

O panorama geral da quantidade de genes diferencialmente expressos no contraste de macrófagos não tratados e estimulados com LPS foi analisado através da biblioteca edgeR (ROBINSON et al., 2010) com base nos valores de $\log_{2}FC > 1$ (*upregulated*) ou < -1 (*down-regulated*) e $FDR < 0,5$ para cada raça bovina (Figura 12). O contraste de amostras não tratadas e estimuladas com LPS reportou 96 DEGs para macrófagos de animais taurinos e 309 para zebuínos (Figura 12). As listas contendo todos os DEGs para o contraste entre macrófagos que não receberam estímulos (controle negativo) *versus* LPS, para animais taurinos e zebuínos, estão descritas no Apêndice A. Esses resultados indicam a existência de diferença de expressão gênica relacionadas aos tratamentos nos macrófagos bovinos, o que demonstra que os macrófagos foram estimulados com sucesso. Ademais, as diferenças na contagem de DEGs para animais taurinos e zebuínos, tanto *upregulated* (n=60 para animais taurinos e n=114 para zebuínos) quanto *down-regulated* (n=36 para animais taurinos e n=195 para zebuínos) frente à uma mesma pressão seletiva de diferenciação e concentração de LPS, *in vitro*, sugerem que as vias de ativação e controle metabólico de macrófagos são diferenciadas de acordo com a raça bovina e isso pode influenciar diretamente no padrão inflamatório induzido, *in vivo*, e conseqüentemente, nos fenótipos de resistência a doenças apresentadas por esses animais.

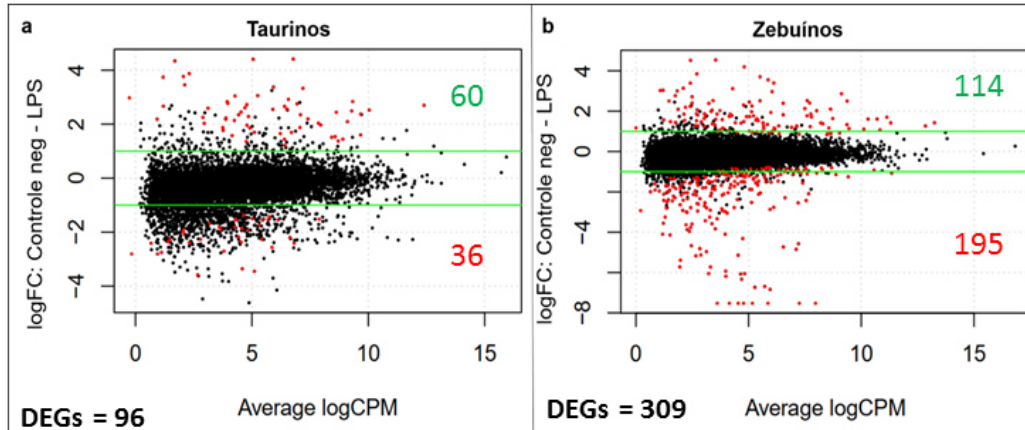


Figura 12. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos estimulados com lipopolissarídeos de *E. coli* (LPS) *in vitro*. Gráficos relacionando o log FoldChange (logFC; eixo Y) versus o log de contagens por milhão (logCPM; eixo X) obtidos a partir de *reads* para macrófagos não estimulados (controle negativo) versus macrófagos tratados com LPS para animais taurinos (a) e zebuínos (b). Pontos vermelhos representam DEGs com logFC >1 (*upregulated* – parte superior da linha verde– número de genes em verde) ou logFC <1 (*down-regulated* - parte inferior da linha verde– número de genes em vermelho) com FDR < 0,05. O número total de DEGs está destacado em preto na parte inferior das figuras (a) e (b) de acordo com a raça bovina.

Uma vez que os ensaios foram positivamente validados, confirmando a ativação de resposta diferencial na expressão gênica dos macrófagos submetidos a diferentes tratamentos, partiu-se para a comparação das respostas entre macrófagos de animais susceptíveis (taurinos) e resistentes (zebuínos) ao carrapato *R. microplus*. Foram confrontados os dados de contagens de *reads* entre animais taurinos e zebuínos, para cada estímulo a que os macrófagos foram submetidos, pretendendo-se avaliar a expressão gênica diferencial entre os fenótipos de resistência ao carrapato bovino.

5.3.2 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS VERSUS ZEBUÍNOS SEM ESTIMULAÇÃO

Nessa análise, o transcriptoma dos macrófagos, cultivados *in vitro*, provenientes de animais taurinos (HPB, n=4) que receberam apenas meio de cultura, sem qualquer estimulação, foram comparados ao de zebuínos (GIR, n=4) na mesma condição. Para isso, os arquivos de contagem de *reads* para os respectivos grupos foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R (ROBINSON et al., 2010). No total, foram reportados 116 DEGs para macrófagos

não estimulados no contraste entre animais taurinos e zebuínos, atendendo as condições de $\logFC > 1$ ou < -1 e $FDR < 0,05$ (Figura 13).

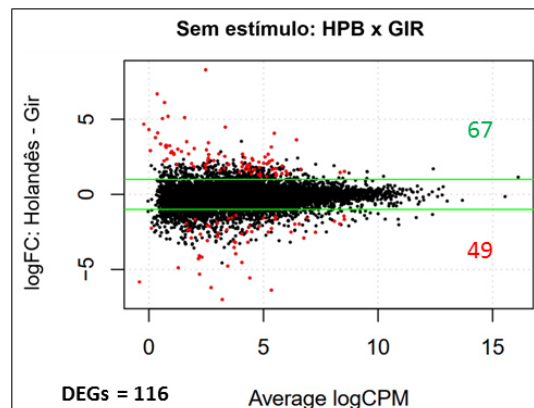


Figura 13. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos, sem estimulação, *in vitro*. Gráfico relacionando o log FoldChange (\logFC ; eixo Y) versus o log de contagens por milhão (\logCPM ; eixo X) obtidos a partir da contagem de reads para macrófagos não estimulados (controle negativo) de animais taurinos (HPB, $n=4$) versus macrófagos não estimulados de animais zebuínos (Gir, $n=4$). Pontos vermelhos representam DEGs com $\logFC > 1$ (upregulated – parte superior da linha verde– número de genes em verde) ou $\logFC < -1$ (down-regulated - parte inferior da linha verde– número de genes em vermelho) com $FDR < 0,05$. O número total de DEGs está destacado em preto na parte inferior da figura.

A lista dos DEGs encontrados no contraste entre macrófagos de taurinos *versus* zebuínos que não receberam estimulação (Apêndice B) foram submetidos à análise de ontologia gênica para avaliar os processos biológicos envolvidos no comprometimento fenotípico dessas células, em homeostase, *in vitro*, submetidas a uma mesma pressão seletiva de diferenciação a partir de monócitos periféricos (Quadro 1). Foram apontados seis processos biológicos com alta significância estatística ($P < 0,05$) (Quadro 1) que influenciam diretamente no processamento e apresentação de antígenos via MHC de classe II e regulação positiva do fator de transcrição NF-Kappa B (do inglês *Nuclear Factor Kappa B*; NFKB), ambos importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune do padrão Th1 (BUATOIS et al., 2003; TSAI et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2014; TUNCEL et al., 2017) e amplificação de inflamação via produção de citocinas pleiotrópicas, como interferons do tipo I e II, respectivamente.

Quadro 1. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEGs) no contraste entre macrófagos não estimulados de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos não estimulados de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05) com FDR < 0,05. Os DEGs (n=116) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. N°: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido (continuação na próxima página).

Categoria	Termo	N°	P-Value	Benjamini
GOterm BP	Processamento antigênico e apresentação de peptídeo ou polissacarídeo de antígeno via MHC de classe II	3	7,40E-03	9,70E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG00000000590	<i>DNA polymerase epsilon, catalytic subunit</i> (POLE)			
ENSBTAG00000026971	<i>cell division cycle associated 5</i> (CDCA5)			
ENSBTAG00000019496	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 3</i> (CDKN3)			
GOterm BP	Transporte de citrato	2	1,40E-02	9,70E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG00000000873	<i>solute carrier family 13 member 3</i> (SLC13A3)			
ENSBTAG00000004680	<i>solute carrier family 13 member 5</i> (SLC13A5)			
GOterm BP	Resposta imune	6	2,00E-02	9,60E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG000000031355	<i>C-C chemokine receptor type 1-like</i> (LOC529196)			
ENSBTAG00000008099	<i>C-C motif chemokine receptor 5</i> (CCR5)			
ENSBTAG00000000231	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i> (BMPR1A)			
ENSBTAG00000009656	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2</i> (BOLA-DQA2)			
ENSBTAG000000038128	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 5</i> (BOLA-DQA5)			
ENSBTAG000000021077	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ beta</i> (BOLA-DQB)			
GOterm BP	Regulação positiva do fator de transcrição NF-kappaB	4	2,80E-02	9,60E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG00000008868	<i>calpain 3</i> (CAPN3)			
ENSBTAG00000014698	<i>caspase recruitment domain family member 11</i> (CARD11)			
ENSBTAG00000015261	<i>caspase recruitment domain family member 14</i> (CARD14)			
ENSBTAG00000005574	<i>clusterin</i> (CLU)			
GOterm BP	Manutenção da população de células tronco	3	3,40E-02	9,60E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG00000016958	<i>PHD finger protein 19</i> (PHF19)			
ENSBTAG00000000231	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i> (BMPR1A)			
ENSBTAG00000012052	<i>peptidyl arginine deiminase 4</i> (PADI4)			

Quadro 1. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos não estimulados de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos não estimulados de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=116) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. N°: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido.

Categoria	Termo	N°	P-Value	Benjamini
GOterm BP	Transição G1/S do ciclo celular mitótico	3	3,40E-02	9,60E-01
ID Gene ENSEMBL	Nome do Gene			
ENSBTAG00000000590	<i>DNA polymerase epsilon, catalytic subunit</i> (<i>POLE</i>)			
ENSBTAG00000026971	<i>cell division cycle associated 5</i> (<i>CDCA5</i>)			
ENSBTAG00000019496	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 3</i> (<i>CDKN3</i>)			

Os 116 DEGs para macrófagos não estimulados no contraste entre animais taurinos e zebuínos (Quadro 1; Apêndice B) também foram submetidos à análise de redes gênicas para identificação de rotas metabólicas que pudessem estar envolvidas no desenvolvimento de respostas inflamatórias com padrões específicos associados a cada raça bovina. Essas análises foram feitas no programa Reactome® (FABREGAT et al., 2018) que apresentou reconhecimento de 59 dos 116 DEGs com base em alinhamento múltiplo de dados de sequência entre bovinos e humanos, essencial para identificação e seleção de genes com alta homologia para construção de rotas metabólicas. Esse passo, disponibilizado pelos algoritmos do Reactome®, é essencial, uma vez que a maioria das rotas são descritas em literatura, e que compõe informações desse programa, foram construídos com base em dados de humanos, o que evita falsas extrapolações entre espécies que venham a ser analisadas. Sendo assim, os 59 DEGs para macrófagos não estimulados com alta homologia entre bovinos e humanos foram atribuídos a 25 vias metabólicas sendo que, destas, 12 apresentaram $p < 0,05$ (Quadro 2).

Quadro 2. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, *in vitro*, sem estimulação. Macrófagos foram diferenciados a partir de monócitos de sangue periférico de animais taurinos (HPB; n=4) e zebuínos (Gir; n=4) sobre uma mesma pressão seletiva de meio de cultura. O mRNA foi sequenciado, os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados (Apêndice B) e submetidos a análise de rota metabólica pelo programa Reactome® (FABREGAT et al., 2018). *Pathway name*: nome da rota metabólica; *Entities*: parâmetros associados às rotas metabólicas identificadas; *Found*: número de entidades inseridas / número total de entidades que compõem a via; *Ratio*: relação proporcional entre DEGs e número de identidades de genes na rota descrita; *P-value*: significância estatística do achado calculado por algoritmo específico do programa Reactome®; *FDR**: do inglês *False Discovery Ratio* indica a taxa de erros do tipo I em testes de hipótese nula ao realizar comparações múltiplas.

Pathway name	Entities			
	found	ratio	p-value	FDR*
Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in GG-NER	2 / 25	0.001	0.013	0.619
Synthesis of Prostaglandins (PG) and Thromboxanes (TX)	2 / 25	0.001	0.013	0.619
Telomere C-strand (Lagging Strand) Synthesis	2 / 28	0.002	0.016	0.619
Vitamins B6 activation to pyridoxal phosphate	1 / 3	1.79e-04	0.021	0.619
PCNA-Dependent Long Patch Base Excision Repair	2 / 34	0.002	0.023	0.619
Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs	2 / 35	0.002	0.025	0.619
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	3 / 98	0.006	0.031	0.619
Resolution of AP sites via the multiple-nucleotide patch replacement pathway	2 / 40	0.002	0.032	0.619
G2 Phase	1 / 5	2.98e-04	0.034	0.619
PRC2 methylates histones and DNA	2 / 42	0.003	0.035	0.619
Synthesis of 15-eicosatetraenoic acid derivatives	1 / 6	3.57e-04	0.041	0.619
Threonine catabolism	1 / 7	4.17e-04	0.047	0.619
DNA replication initiation	1 / 8	4.76e-04	0.054	0.619
Telomere C-strand synthesis initiation	1 / 8	4.76e-04	0.054	0.619
Transport of nucleosides and free purine and pyrimidine bases across the plasma membrane	1 / 8	4.76e-04	0.054	0.619
Early Phase of HIV Life Cycle	2 / 54	0.003	0.054	0.619
Assembly of active LPL and LIPC lipase complexes	2 / 56	0.003	0.058	0.619
Interleukin-10 signaling	3 / 129	0.008	0.061	0.619
Sodium-coupled sulphate, di- and tri-carboxylate transporters	2 / 58	0.003	0.061	0.619
Fatty acyl-CoA biosynthesis	2 / 60	0.004	0.065	0.619
Activation of NOXA and translocation to mitochondria	1 / 10	5.95e-04	0.067	0.619
MHC class II antigen presentation	4 / 222	0.013	0.069	0.619
Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in TC-NER	2 / 64	0.004	0.073	0.619
Condensation of Prometaphase Chromosomes	1 / 11	6.55e-04	0.073	0.619
Urea cycle	1 / 11	6.55e-04	0.073	0.619

Dentre as vias que estão associadas com diferenças significativas ($p < 0.05$) no comprometimento de resposta de macrófagos em estado de homeostase, ou seja, sem estimulação, em animais taurinos e zebuínos, podemos destacar o metabolismo de lipídeos com ênfase na síntese de prostaglandinas e tromboxanos (Figura 14), que regulam o desenvolvimento de resposta inflamatória (WASSEF et al., 1989; TILLEY et al., 2001), ativação e ciclo celular em mamíferos (MASOODI et al., 2015), através dos genes *prostaglandina D2 sintetase (PTGDS)* e *prostaglandina endoperóxido sintetase-2 (PTGS2)*, cujos resultados apontam para maior expressão em animais zebuínos (Quadro 1 e Apêndice B).

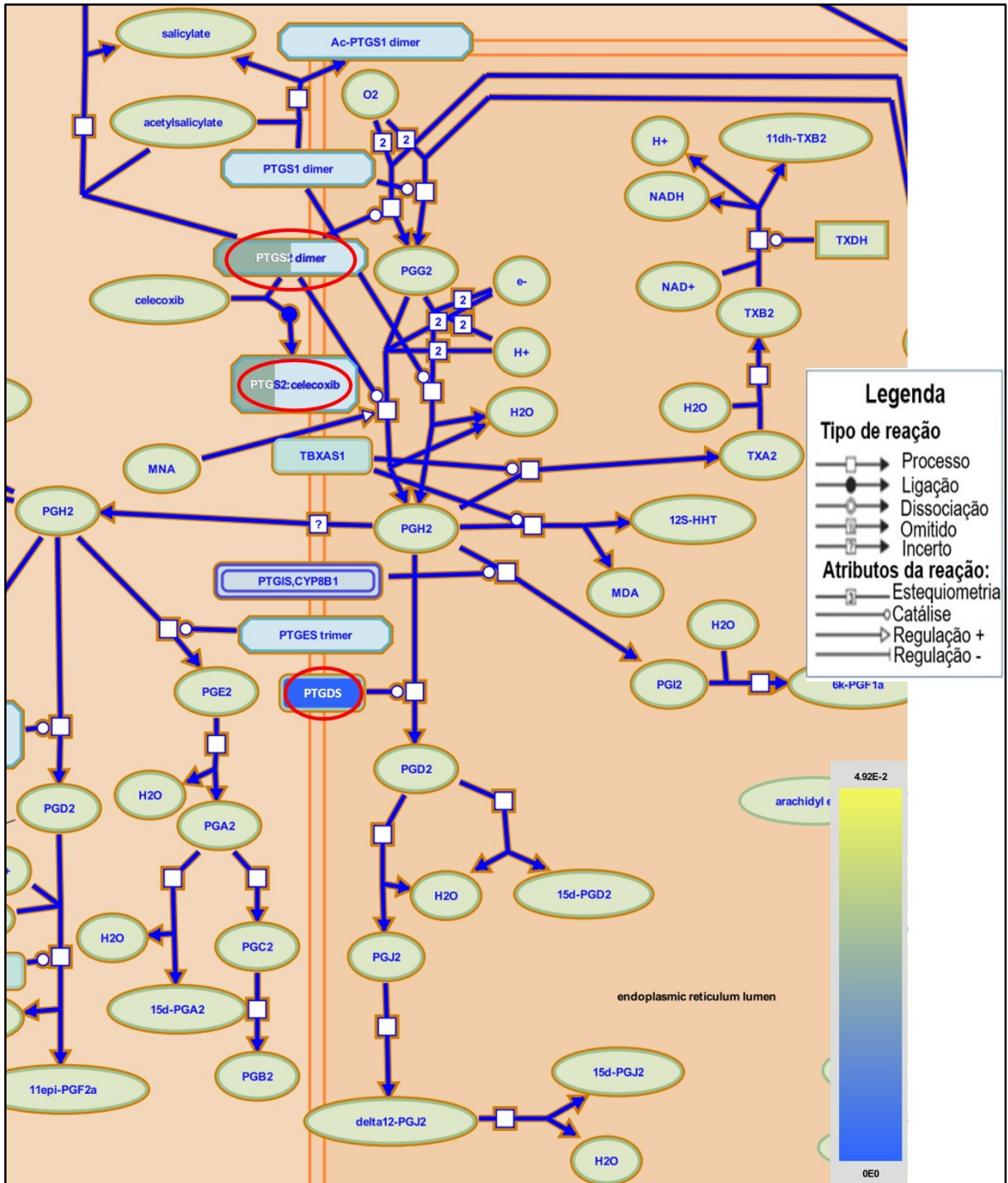


Figura 14. Via da síntese de prostaglandinas e tromboxanos destacando DEGs entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos não estimulados. Estão representadas as reações/moléculas para as quais os genes prostaglandina D2 sintetase (*PTGDS*) e prostaglandina endoperóxido sintase-2 (*PTGS2*), apresentados com expressos em maior quantidade por macrófagos de animais zebuínos não estimulados ($\log_{FC} > 1$, $FDR < 0.05$; destacados no círculo vermelho), localizadas na membrana do retículo endoplasmático da célula. A cor indicada nos quadros destacados em vermelho reflete a significância estatística de FDR, atribuída ao enriquecimento, conforme escala mostrada no canto inferior direito.

5.3.3 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS *VERSUS* ZEBUÍNOS TRATADOS COM LPS: CARACTERIZAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE RESPOSTA M1 EM BOVINOS

O transcriptoma dos macrófagos de animais taurinos (HPB, n=4) e zebuínos (GIR, n=4) ativados com LPS, *in vitro*, foi comparado para caracterização do desenvolvimento de uma resposta M1 nas diferentes raças bovinas. A análise, utilizando-se os arquivos de contagem de *reads* de cada grupo, realizada pela biblioteca edgeR do pacote R (ROBINSON et al., 2010), reportou 605 DEGs ($\log_{2}FC > 1$ ou < -1 , $FDR < 0,05$) entre os macrófagos estimulados com LPS em animais taurinos e zebuínos (Figura 15). Desses genes, 266 foram *upregulated* e 339 *downregulated* nos taurinos. A lista contendo todos os genes e valores de $\log_{2}FC$, assim como *p*-vale e FDR, está discriminada no Apêndice C.

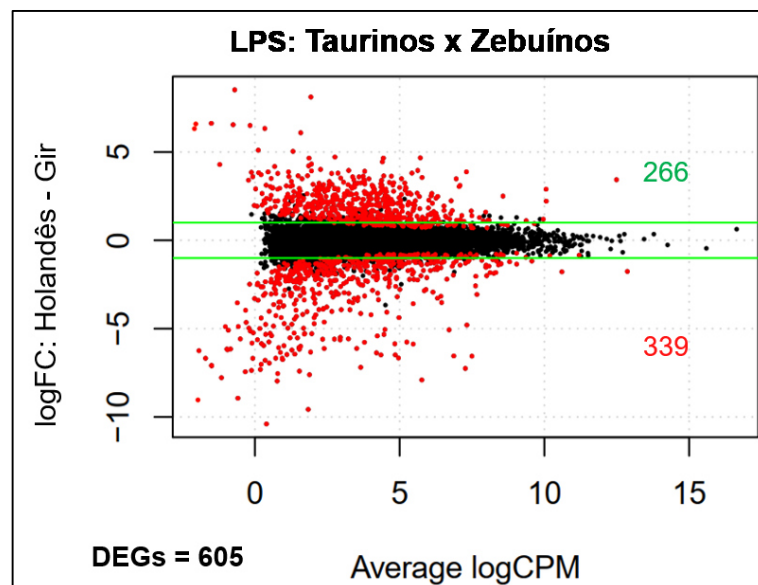


Figura 15. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com LPS, *in vitro*. Gráfico relacionando o *log FoldChange* ($\log_{2}FC$; eixo Y) versus o *log* de contagens por milhão ($\log_{2}CPM$; eixo X) obtidos a partir da contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS (controle positivo de ativação de resposta M1) de animais taurinos (HPB, n=4) *versus* animais zebuínos (Gir, n=4). Pontos vermelhos representam DEGs com $\log_{2}FC > 1$ (*upregulated* – parte superior da linha verde– número de genes em verde) ou $\log_{2}FC < -1$ (*downregulated* - parte inferior da linha verde– número de genes em vermelho) com $FDR < 0,05$. O número total de DEGs está destacado em preto na parte inferior da figura.

A análise de ontologia gênica apontou 13 processos biológicos significativos associados aos DEGs reportados entre macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com LPS (Quadro 3; $P < 0,05$). Alguns DEGs foram apontados em mais de um processo, como o gene codificador do regulador negativo de espécies

reativas de oxigênio (*NRROS*), do fator de transcrição NFκB subunidade 2 (*NFκB2*), ambos *upregulated* nos taurinos, e também os genes da enzima óxido nítrico sintase 2 (*NOS2*) e da enzima prostaglandina endoperóxido sintase 2 (*PTGS2*), apontados com maior expressão nos animais zebuínos. Esses genes estão relacionados com a amplificação da inflamação, ciclo e proliferação celular, com o perfil de resposta imune pro-inflamatória ativado pelo LPS de bactérias gram negativas (NUSSLER et al., 1994; NOUBADE et al., 2014; SEELEY E GHOSH, 2017), à resposta inflamatória via TLR4 (RYAN et al., 2004; CHIEN et al., 2012), todos característicos de um perfil M1 de macrófagos (SCHALAPFER et al., 2014; MILLS et al., 2015; FEITO et al., 2019). Taurinos e zebuínos também apresentaram diferenças na expressão de genes relacionados à quimiotaxia de leucócitos, importantes no desenvolvimento ou resolução da resposta inflamatória (ABBAS et al., 2012). Em conjunto, os resultados indicam que macrófagos de animais zebuínos parecem desenvolver uma resposta pró-inflamatória, do padrão M1, mais intensa que animais taurinos, inclusive no que diz respeito a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-36, relacionadas com ativação e amplificação de respostas Th1 (SULLIVAN et al., 2018), e produção de espécies reativas de oxigênio, importantes no controle da infestação por carrapatos (SEGAL, 2005; CITELLI et al., 2007).

Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=605) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. Nº: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido (continuação na próxima página).

Categoria	Termo	Nº	P-Value	Benjamini
GOterm BP	Resposta inflamatória	20	2,00E-04	3,00E-01
ID Gene	Nome do Gene			
617258	<i>C-C motif chemokine ligand 24</i> (CCL24)			
282488	<i>Fas cell surface death receptor</i> (FAS)			
528782	<i>TNF receptor superfamily member 4</i> (TNFRSF4)			
613667	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i> (CXCL3)			
280677	<i>complement C3</i> (C3)			
787326	<i>gamma-glutamyltransferase 5</i> (GGT5)			
282691	<i>high mobility group box 1</i> (HMGB1)			
515034	<i>interleukin 1 receptor associated kinase 2</i> (IRAK2)			
100297786	<i>interleukin 36, beta</i> (IL36B)			
510688	<i>negative regulator of reactive oxygen species</i> (NRROS)			
282876	<i>nitric oxide synthase 2</i> (NOS2)			
526392	<i>nuclear factor kappa B subunit 2</i> (NFKB2)			
281368	<i>oxidized low density lipoprotein receptor 1</i> (OLR1)			
518283	<i>platelet activating factor receptor</i> (PTAFR)			
507790	<i>platelet factor 4</i> (PF4)			
282023	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> (PTGS2)			
282470	<i>solute carrier family 11 member 1</i> (SLC11A1)			
539123	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 3</i> (S1PR3)			
281536	<i>toll like receptor 4</i> (TLR4)			
510798	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 26</i> (LOC510798)			
GOterm BP	Processo catabólico da arginina	3	1,10E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
540386	<i>dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i> (DDAH2)			
508724	<i>fumarylacetoacetate hydrolase</i> (FAH)			
282876	<i>nitric oxide synthase 2</i> (NOS2)			

Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=605) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. N^o: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido (continuação na próxima página)

GOterm BP	Regulação de proliferação celular	12	1,30E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
282488	<i>Fas cell surface death receptor</i> (FAS)			
528782	<i>TNF receptor superfamily member 4</i> (TNFRSF4)			
614893	<i>cell division cycle associated 7</i> (CDCA7)			
513678	<i>checkpoint kinase 1</i> (CHEK1)			
613667	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i> (CXCL3)			
618412	<i>dual specificity phosphatase 15</i> (DUSP15)			
535578	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i> (EGLN3)			
282876	<i>nitric oxide synthase 2</i> (NOS2)			
507790	<i>platelet factor 4</i> (PF4)			
282023	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> (PTGS2)			
512754	<i>replication protein A3</i> (RPA3)			
510798	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 26</i> (LOC510798)			
GOterm BP	Ritmo circadiano	5	2,00E-02	9,60E-01
ID Gene	Nome do Gene			
503577	<i>D-box binding PAR bZIP transcription factor</i> (DBP)			
282488	<i>Fas cell surface death receptor</i> (FAS)			
538690	<i>inhibitor of DNA binding 3, HLH protein</i> (ID3)			
282876	<i>nitric oxide synthase 2</i> (NOS2)			
282431	<i>prokineticin receptor 2</i> (PROKR2)			
GOterm BP	Regulação negativa da proliferação celular	15	2,00E-02	9,60E-01
ID Gene	Nome do Gene			
505169	<i>GATA binding protein 3</i> (GATA3)			
767586	<i>KN motif and ankyrin repeat domains 2</i> (KANK2)			
617904	<i>MDM2 binding protein</i> (MTBP)			
506520	<i>WNK lysine deficient protein kinase 2</i> (WNK2)			
521761	<i>adenosine deaminase, RNA specific B1</i> (ADARB1)			
505010	<i>calmin</i> (CLMN)			

Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=605) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. N^o: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido (continuação na próxima página)

GOterm BP	Regulação negativa da proliferação celular	15	2,00E-02	9,60E-01
ID Gene	Nome do Gene			
614159	<i>chromosome 24 open reading frame, human C18orf54</i> (C24H18orf54)			
510244	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2D</i> (CDKN2D)			
618849	<i>high mobility group AT-hook 1</i> (HMGA1)			
535951	<i>integrin subunit alpha 1</i> (ITGA1)			
510334	<i>neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1</i> (NEURL1)			
100848839	<i>prolyl 3-hydroxylase 3</i> (P3H3)			
785924	<i>receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2</i> (ROR2)			
281478	<i>scinderin</i> (SCIN)			
540153	<i>tensin 2</i> (TNS2)			
GOterm BP	Regulação negativa da sinalização de I-kappaB quinase/NF-kappaB	5	2,40E-02	9,60E-01
ID Gene	Nome do Gene			
614198	<i>NFKB inhibitor delta</i> (NFKBID)			
539974	<i>NLR family member X1</i> (NLRX1)			
508105	<i>TNF alpha induced protein 3</i> (TNFAIP3)			
526103	<i>TNFAIP3 interacting protein 1</i> (TNIP1)			
768307	<i>ras homolog family member H</i> (RHOH)			
GOterm BP	Quimiotaxia de leucócito	3	3,00E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
540287	<i>G protein-coupled receptor 183</i> (GPR183)			
282196	<i>coronin 1A</i> (CORO1A)			
507790	<i>platelet factor 4</i> (PF4)			
GOterm BP	Regulação positiva da proliferação de célula B	5	3,60E-02	9,80E-01
ID Gene	Nome do Gene			
511435	<i>CD81 molecule</i> (CD81)			
540287	<i>G protein-coupled receptor 183</i> (GPR183)			
534137	<i>SAM and SH3 domain containing 3</i> (SASH3)			
512254	<i>myocyte enhancer factor 2C</i> (MEF2C)			
281536	<i>toll like receptor 4</i> (TLR4)			

Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC < -1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=605) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. Nº: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido (continuação na próxima página)

GOterm BP	Regulação negativa da produção de interleucina-2	3	3,70E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
505169	<i>GATA binding protein 3</i> (<i>GATA3</i>)			
508105	<i>TNF alpha induced protein 3</i> (<i>TNFAIP3</i>)			
614262	<i>V-set and immunoglobulin domain containing 4</i> (<i>VSIG4</i>)			
GOterm BP	Regulação da produção de citocina	3	3,70E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
281258	<i>F11 receptor</i> (<i>F11R</i>)			
100847218	<i>ankyrin repeat domain 2</i> (<i>ANKRD2</i>)			
520564	<i>lipopolysaccharide induced TNF factor</i> (<i>LITAF</i>)			
GOterm BP	Resposta imune	14	3,90E-02	9,70E-01
ID Gene	Nome do Gene			
788634	<i>BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7-like</i> (<i>LOC788634</i>)			
617258	<i>C-C motif chemokine ligand 24</i> (<i>CCL24</i>)			
282488	<i>Fas cell surface death receptor</i> (<i>FAS</i>)			
407173	<i>MHC Class I JSP.1</i> (<i>JSP.1</i>)			
508105	<i>TNF alpha induced protein 3</i> (<i>TNFAIP3</i>)			
528782	<i>TNF receptor superfamily member 4</i> (<i>TNFRSF4</i>)			
404101	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i> (<i>BMPR1A</i>)			
613667	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i> (<i>CXCL3</i>)			
100297786	<i>interleukin 36, beta</i> (<i>IL36B</i>)			
506214	<i>major histocompatibility complex, class II, DR alpha</i> (<i>BOLA-DRA</i>)			
510688	<i>negative regulator of reactive oxygen species</i> (<i>NRROS</i>)			
507790	<i>platelet factor 4</i> (<i>PF4</i>)			
509642	<i>tubulointerstitial nephritis antigen like 1</i> (<i>TINAGL1</i>)			
510798	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 26</i> (<i>LOC510798</i>)			
GOterm BP	Resposta a glicocorticoide	3	4,60E-02	9,80E-01
ID Gene	Nome do Gene			
282488	<i>Fas cell surface death receptor</i> (<i>FAS</i>)			
282691	<i>high mobility group box 1</i> (<i>HMGB1</i>)			
1860	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i> (<i>IL1RN</i>)			

Quadro 3. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos tratados com LPS de animais taurinos e zebuínos. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos tratados com LPS de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=605) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. N^o: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido.

GOterm BP	Regulação negativa da cascata de ERK1 e ERK2	5	5,00E-02	9,80E-01
ID Gene	Nome do Gene			
515063	<i>NDRG family member 2</i> (<i>NDRG2</i>)			
526103	<i>TNFAIP3 interacting protein 1</i> (<i>TNIP1</i>)			
506520	<i>WNK lysine deficient protein kinase 2</i> (<i>WNK2</i>)			
515266	<i>activating transcription factor 3</i> (<i>ATF3</i>)			
281536	<i>toll like receptor 4</i> (<i>TLR4</i>)			

O programa Reactome® (FABREGAT et al., 2018) apontou as principais vias metabólicas associadas aos DEGs entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com LPS (Figura 16; Apêndice C). Dentre os 605 DEGs submetidos a análise, o programa associou 299 genes às vias metabólicas presente no banco de dados do programa. No Quadro 4 foram indicadas as 25 principais vias às quais esses genes foram atribuídos, com alta significância estatística, baseada no *p-value*.

Quadro 4. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, *in vitro*, tratados com LPS. O mRNA de macrófagos de animais taurinos (HPB; n=4) e zebuínos (Gir; n=4), tratados com LPS, foi sequenciado, os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados e submetidos a análise de vias metabólicas pelo programa Reactome (FABREGAT et al., 2018). *Pathway name*: nome da rota metabólica; *Entities*: parâmetros associados às rotas metabólicas identificadas; *Found*: número de entidades inseridas / número total de entidades que compõem a via; *Ratio*: relação proporcional entre DEGs e número de identidades de genes na rota descrita; *P-value*: significância estatística do achado calculado por algoritmo específico do programa Reactome; *FDR**: do inglês, *False Discovery Ratio*.

Pathway name	Entities			
	found	ratio	p-value	FDR*
Lagging Strand Synthesis	8 / 24	0.001	3.47e-06	0.001
Removal of the Flap Intermediate	7 / 18	0.001	5.28e-06	0.001
Processive synthesis on the lagging strand	7 / 19	0.001	7.48e-06	0.001
Telomere C-strand (Lagging Strand) Synthesis	8 / 28	0.002	1.05e-05	0.001
Polymerase switching	6 / 14	8.34e-04	1.45e-05	0.001
Leading Strand Synthesis	6 / 14	8.34e-04	1.45e-05	0.001
Polymerase switching on the C-strand of the telomere	6 / 14	8.34e-04	1.45e-05	0.001
DNA strand elongation	10 / 59	0.004	7.29e-05	0.005
DNA replication initiation	4 / 8	4.76e-04	2.26e-04	0.012
Telomere C-strand synthesis initiation	4 / 8	4.76e-04	2.26e-04	0.012
Activation of the pre-replicative complex	8 / 57	0.003	0.001	0.059
Metabolism of ingested SeMet, Sec, MeSec into H2Se	4 / 13	7.74e-04	0.001	0.062
Recognition of DNA damage by PCNA-containing replication complex	6 / 34	0.002	0.002	0.07
Purine ribonucleoside monophosphate biosynthesis	4 / 14	8.34e-04	0.002	0.074
Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in GG-NER	5 / 25	0.001	0.002	0.091
Cysteine formation from homocysteine	2 / 2	1.19e-04	0.002	0.094
Nucleobase biosynthesis	4 / 17	0.001	0.004	0.129
Chromosome Maintenance	15 / 189	0.011	0.004	0.149
G2/M DNA damage checkpoint	10 / 108	0.006	0.007	0.221
Activation of ATR in response to replication stress	7 / 60	0.004	0.007	0.221
Electric Transmission Across Gap Junctions	2 / 5	2.98e-04	0.014	0.411
Transmission across Electrical Synapses	2 / 5	2.98e-04	0.014	0.411
Deposition of new CENPA-containing nucleosomes at the centromere	6 / 54	0.003	0.015	0.411
Nucleosome assembly	6 / 54	0.003	0.015	0.411
Removal of the Flap Intermediate from the C-strand	3 / 14	8.34e-04	0.015	0.411

Corroborando com a análise de ontologia gênica feitas no DAVID (HUANG et al., 2009), essas vias estão envolvidas em diversas atividades biológicas, como metabolismo celular, replicação e reparo de DNA, ciclo celular, entre outros, que podem estar direta e indiretamente associados com a resposta imune. Uma via destacada entre as associadas com diferenças no comprometimento de resposta de macrófagos pela estimulação com LPS, em animais taurinos e zebuínos, é a via do TLR4 (Figura 16). Sua ativação gera um cascata de sinalização intracelular que culmina na atividade do fator de transcrição NFκB e na produção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela progressão da resposta do sistema imune inato (VAURE E LIU, 2014). Os DEGs, apontados nas vias metabólicas destacadas, sugerem que animais taurinos expressam menos genes codificantes de CD14, afetando a endocitose e ativação de MYD88 (Figura 16), refletindo diretamente na ativação de macrófagos, mecanismos de apresentação de antígenos e amplificação de padrões distintos de resposta Th1, mediada por citocinas pró-inflamatórias transcritas pela ativação de NFκB via MYD88 (SEELEY E GHOSH, 2017).

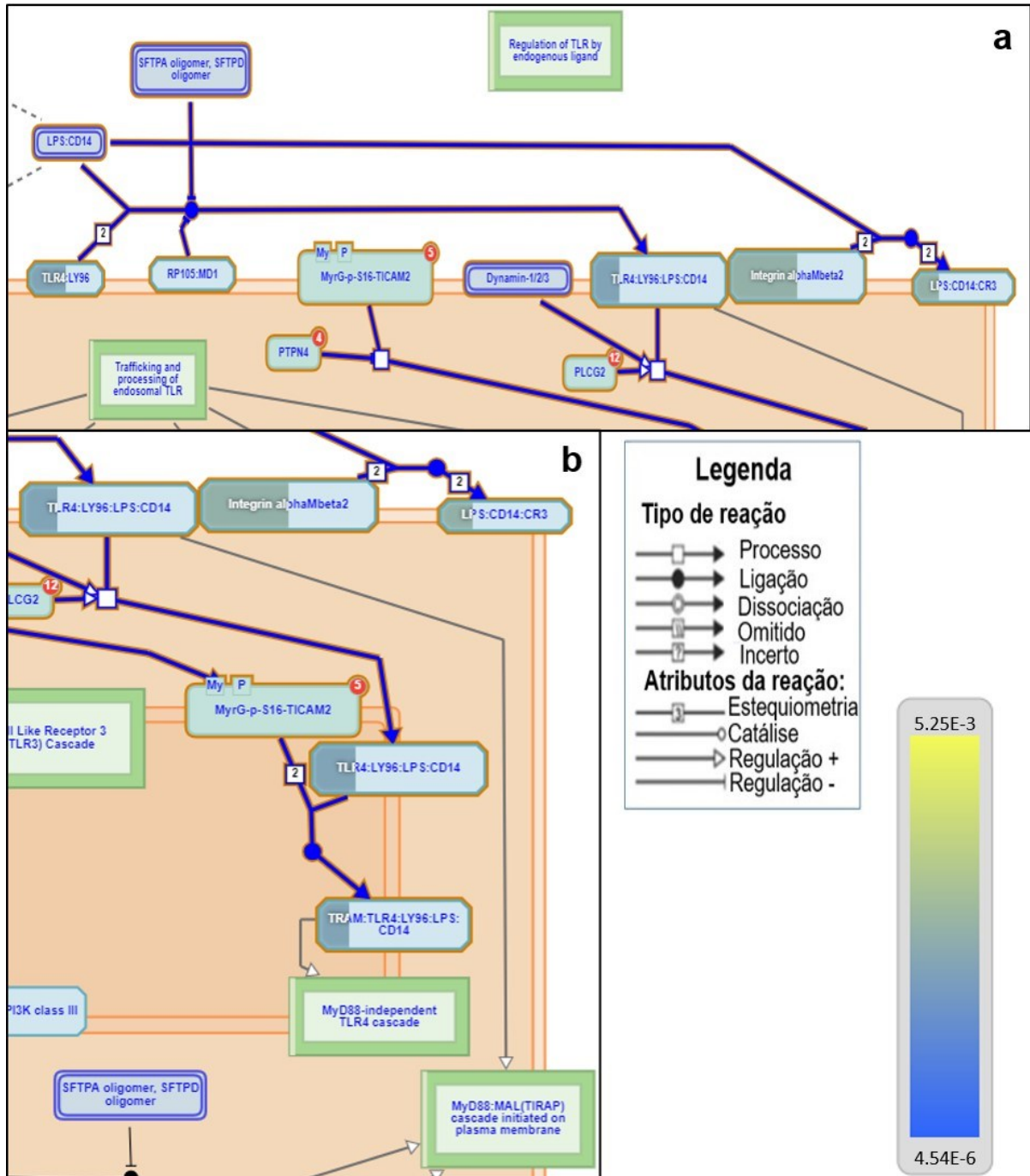


Figura 16. Vias componentes da sinalização de TLR4 contendo DEGs entre macrófagos de animais taurinos (HPB, n = 4) e zebuínos (Gir, n = 4) tratados com LPS. As setas azuis destacadas representam (a) a via de ligação do complexo CD14:LPS ao CR3 e os passos da via de transferência do LPS para o receptor TLR4; (b) a via de endocitose do complexo TLR4:LY96:LPS:CD14. As formas parcialmente coloridas indicam onde estão representados os genes inseridos na análise e sua representatividade no conjunto de moléculas dentro da reação. A cor indicada nos quadros destacados reflete a significância estatística de FDR, atribuída ao enriquecimento, conforme escala mostrada no canto inferior direito.

5.3.4 DEGs ENTRE MACRÓFAGOS TAURINOS *VERSUS* ZEBUÍNOS TRATADOS COM SALIVA DE *R. microplus*

Os resultados de transcriptoma dos macrófagos bovinos ativados, *in vitro*, com saliva do carrapato *R. microplus*, diluída 1.000x, foram comparados pela biblioteca edgeR do pacote R (ROBINSON et al., 2010). A análise consistiu no contraste dos dados de contagem de *reads* provenientes dos macrófagos taurinos (HPB, n=4) *versus* zebuínos (GIR, n=4), ambos ativados com saliva do carrapato *R. microplus*, para busca de possíveis diferenças na ativação dessas células associadas com fenótipos de resistência e susceptibilidade ao carrapato. No total, 126 DEGs, com $\logFC > 1$ ou < -1 e $FDR < 0,05$, foram reportados (Apêndice D), sendo 67 *upregulated* e 59 *downregulated* nos taurinos (Figura 17).

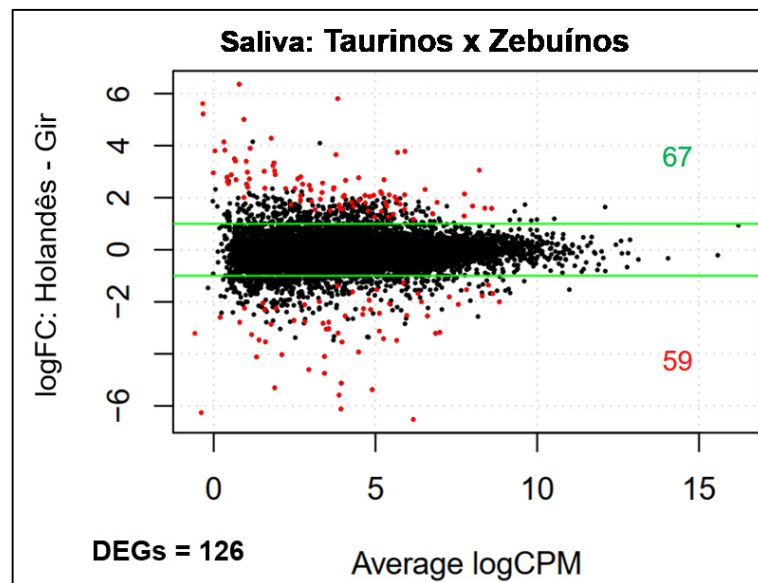


Figura 17. Representação gráfica dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com saliva de *R. microplus*, *in vitro*. Gráfico relacionando o *log FoldChange* (\logFC ; eixo Y) versus o *log* de contagens por milhão (\logCPM ; eixo X) obtidos a partir da contagem de *reads* para macrófagos tratados com saliva de carrapato de animais taurinos (HPB, n=4) *versus* animais zebuínos (Gir, n=4). Pontos vermelhos representam DEGs com $\logFC > 1$ (*upregulated* – parte superior da linha verde– número de genes em verde) ou $\logFC < -1$ (*down-regulated* - parte inferior da linha verde– número de genes em vermelho). O número total de DEGs está destacado em preto na parte inferior da figura. Foram considerados DEGs com $FDR < 0,05$.

A análise de ontologia gênica de todos os DEGs encontrados no contraste entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos estimulados com saliva do carrapato apontou seis processos biológicos relacionados, principalmente, com a replicação e divisão celular (Quadro 5).

Quadro 5. Análise de ontologia gênica com os genes diferencialmente expressos (DEG) no contraste entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos, tratados com saliva de *R. microplus*, *in vitro*. Os arquivos de contagem de *reads* para macrófagos, tratados com saliva de *R. microplus*, de animais taurinos (HPB; n=4) *versus* zebuínos (Gir; n=4) foram contrastados utilizando-se o *script* desenvolvido na biblioteca edgeR do pacote R para obtenção dos DEGs (logFC >1 ou logFC <1; FDR < 0,05). Os DEGs (n=116) foram submetidos a análise de categorias GOterm BP (do inglês, *Biological Process* - Processos Biológicos) no programa online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* v6.8 (DAVID). Em azul estão indicados os DEGs *downregulated* e em vermelho *upregulated*, nos taurinos. Nº: indica a quantidade de genes, a partir do conjunto total de DEGs, envolvidos em dado processo biológico. O método de Benjamini foi aplicado para correção de múltiplas hipóteses do *p-value* obtido.

Categoria	Termo	Nº	P-Value	Benjamini
GOterm BP	Regulação negativa da replicação viral	3	1,00E-02	9,90E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000014707	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i> (<i>ISG15</i>)			
ENSBTAG00000015074	<i>prostaglandin D2 synthase</i> (<i>PTGDS</i>)			
ENSBTAG00000016061	<i>radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i> (<i>RSAD2</i>)			
GOterm BP	Transporte de citrato	2	1,50E-02	9,50E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000000873	<i>solute carrier family 13 member 3</i> (<i>SLC13A3</i>)			
ENSBTAG00000004680	<i>solute carrier family 13 member 5</i> (<i>SLC13A5</i>)			
GOterm BP	Regulação positiva da citocinese	3	1,60E-02	8,80E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000008436	<i>cell division cycle 25B</i> (<i>CDC25B</i>)			
ENSBTAG00000008963	<i>citron rho-interacting serine/threonine kinase</i> (<i>CIT</i>)			
ENSBTAG00000021874	<i>kinesin family member 14</i> (<i>KIF14</i>)			
GOterm BP	Montagem da placa do fuso mitótico	3	2,20E-02	8,90E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000014326	<i>cell division cycle associated 8</i> (<i>CDCA8</i>)			
ENSBTAG00000021874	<i>kinesin family member 14</i> (<i>KIF14</i>)			
ENSBTAG00000001631	<i>kinesin family member C1</i> (<i>KIFC1</i>)			
GOterm BP	Processo biossintético do piruvato	2	2,20E-02	8,40E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000012721	<i>4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1</i> (<i>HOGA1</i>)			
ENSBTAG00000031814	<i>serine dehydratase</i> (<i>SDS</i>)			
GOterm BP	Divisão celular	5	2,50E-02	8,20E-01
ID Gene ENSEMBL	GENE NAME			
ENSBTAG00000010048	<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component</i> (<i>SPC25</i>)			
ENSBTAG00000007860	<i>abnormal spindle microtubule assembly</i> (<i>ASPM</i>)			
ENSBTAG00000000660	<i>family with sequence similarity 83 member D</i> (<i>FAM83D</i>)			
ENSBTAG00000021874	<i>kinesin family member 14</i> (<i>KIF14</i>)			
ENSBTAG00000012925	<i>non-SMC condensin I complex subunit H</i> (<i>NCAPH</i>)			

Em análise das vias metabólicas pelo programa Reactome (FABREGAT et al., 2018), 55 dos 126 DEGs encontrados entre macrófagos de animais taurinos e zebuínos tratados com a saliva de carrapato foram associados a vias de sinalização contidas no banco de dados. Dentre as 25 vias mais significativas reportadas (Quadro 6), apenas três delas apresentaram $p < 0,05$. Entre elas, a via dos canais TRP (do inglês, *Transient Receptor Potential*; Figura 18a), com os dois genes reportados *upregulated* nos taurinos (*TRPC6* e *TRPM2*), cuja atividade pode ser regulada por estresse oxidativo (WU et al. 2010), e a via de terminação da síntese de DNA translesão (Figura 18b), da qual participa o gene *ISG15*, codificante de proteínas mitóticas e oncogênicas (YANG et al., 1998; JEON et al., 2012) *downregulated* em taurinos. Tais resultados sugerem que animais taurinos, susceptíveis ao *R. microplus*, podem apresentar alteração de proliferação celular com influência, inclusive, na taxa de mitose, refletido por inflamações mais acentuadas e menos efetivas no controle do carrapato (TABOR et al., 2017).

Quadro 6. Vias metabólicas associadas com a diferença de expressão gênica apresentada pelo transcriptoma de macrófagos diferenciados de monócitos periféricos de animais taurinos e zebuínos, *in vitro*, tratados com saliva de *R. microplus*. O mRNA de macrófagos de animais taurinos (HPB; n=4) e zebuínos (Gir; n=4), tratados com saliva de carrapato, foi sequenciado, os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados e submetidos a análise de vias metabólicas pelo programa Reactome (FABREGAT et al., 2018). *Pathway name*: nome da rota metabólica; *Entities*: parâmetros associados às rotas metabólicas identificadas; *Found*: número de entidades inseridas / número total de entidades que compõem a via; *Ratio*: relação proporcional entre DEGs e número de identidades de genes na rota descrita; *P-value*: significância estatística do achado calculado por algoritmo específico do programa Reactome; *FDR**: do inglês, *False Discovery Ratio*.

Pathway name	Entities			
	found	ratio	p-value	FDR*
TRP channels	2 / 28	0.002	0.019	0.765
Vitamins B6 activation to pyridoxal phosphate	1 / 3	1.79e-04	0.022	0.765
Termination of translesion DNA synthesis	2 / 45	0.003	0.045	0.765
Threonine catabolism	1 / 7	4.17e-04	0.051	0.765
Transport of nucleosides and free purine and pyrimidine bases across the plasma membrane	1 / 8	4.76e-04	0.058	0.765
Sodium-coupled sulphate, di- and tri-carboxylate transporters	2 / 58	0.003	0.071	0.765
Interleukin-10 signaling	3 / 129	0.008	0.074	0.765
Condensation of Prometaphase Chromosomes	1 / 11	6.55e-04	0.079	0.765
Urea cycle	1 / 11	6.55e-04	0.079	0.765
Pyrimidine catabolism	1 / 12	7.14e-04	0.086	0.765
Lysine catabolism	1 / 14	8.34e-04	0.1	0.765
Depolymerisation of the Nuclear Lamina	1 / 16	9.53e-04	0.113	0.765
Elevation of cytosolic Ca ²⁺ levels	1 / 16	9.53e-04	0.113	0.765
Binding and entry of HIV virion	1 / 17	0.001	0.12	0.765
Crosslinking of collagen fibrils	1 / 18	0.001	0.126	0.765
Chemokine receptors bind chemokines	2 / 90	0.005	0.147	0.765
Transport of vitamins, nucleosides, and related molecules	2 / 92	0.005	0.152	0.765
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	2 / 98	0.006	0.168	0.765
Synthesis of Prostaglandins (PG) and Thromboxanes (TX)	1 / 25	0.001	0.171	0.765
Defective SLC35A1 causes congenital disorder of glycosylation 2F (CDG2F)	1 / 27	0.002	0.183	0.765
Defective SLC35A1 causes congenital disorder of glycosylation 2F (CDG2F)	1 / 27	0.002	0.183	0.765
RUNX1 regulates transcription of genes involved in differentiation of keratinocytes	1 / 28	0.002	0.19	0.765
Import of palmitoyl-CoA into the mitochondrial matrix	1 / 28	0.002	0.19	0.765
Effects of PIP2 hydrolysis	1 / 28	0.002	0.19	0.765
Ion channel transport	3 / 210	0.013	0.21	0.765

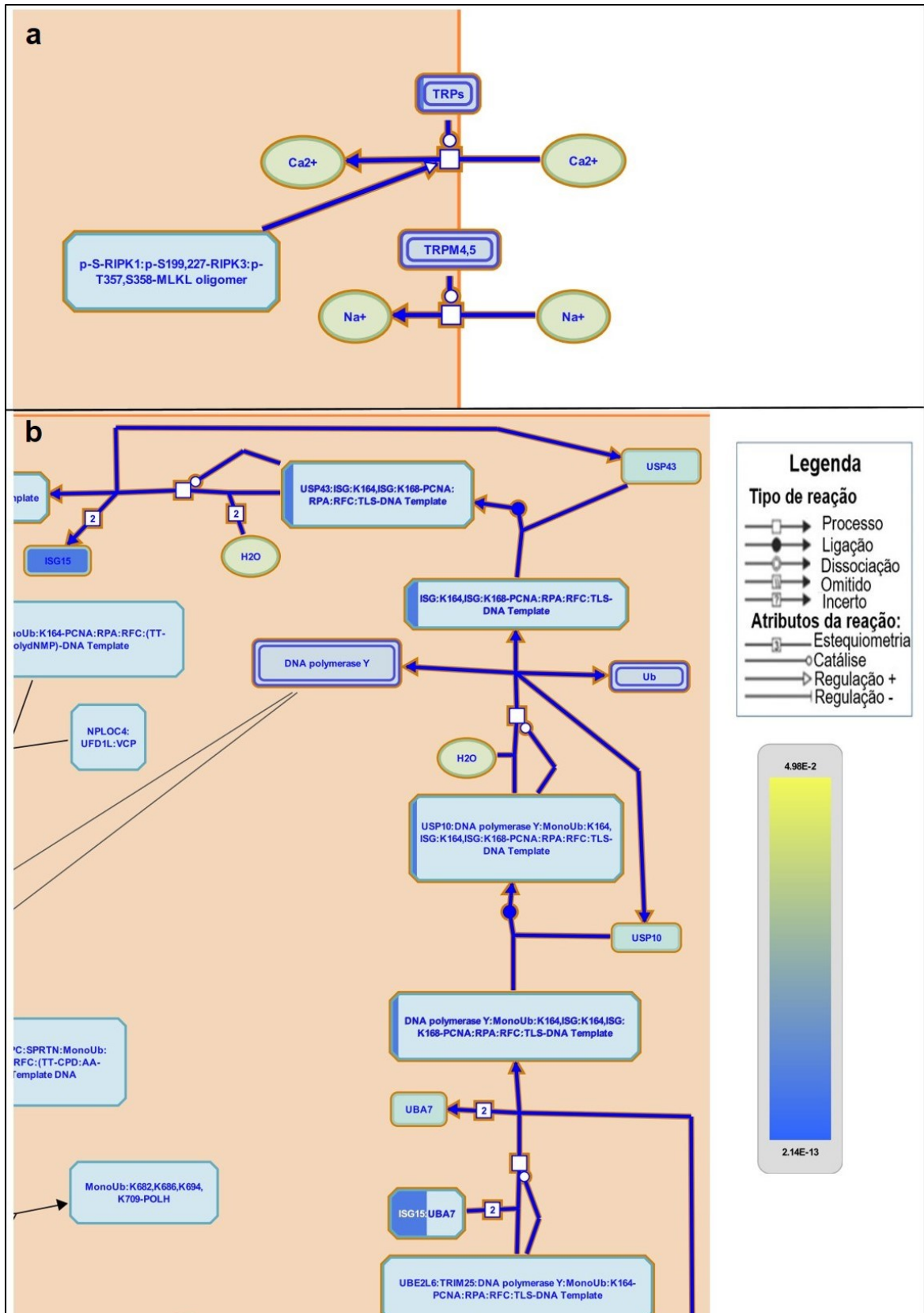


Figura 18. Vias metabólicas contendo DEGs entre macrófagos de animais taurinos (HPB, n = 4) e zebuínos (Gir, n = 4) tratados com saliva de carrapato *R. microplus*, diluída 1.000x. Em (a) é representada a via de TRP (do inglês, *Transient Receptor Potential*), contendo os DEGs *TRPC6* e *TRPM2*, e em (b) a via e terminação da síntese de DNA translesão, da qual participa o gene *ISG15*. As formas parcialmente coloridas indicam onde estão representados os genes inseridos na análise e sua representatividade no conjunto de moléculas dentro da reação. A cor indicada nos quadros destacados reflete a significância estatística de FDR, atribuída ao enriquecimento, conforme escala de cores.

5.4 INDICAÇÃO DE GENES ALVO PARA PROGRAMAS MELHORAMENTO

Análises de ontologia gênica e de vias metabólicas, realizadas para os DEGs entre os macrófagos diferenciados, *in vitro*, de animais taurinos (n = 4) e zebuínos (n = 4) não estimulados, ativados com LPS e/ou saliva de *R. microplus* diluída 1.000x, indicaram inúmeros genes candidatos à modulação de expressão gênica, conforme apresentado anteriormente. Comparando-se os perfis de expressão gênica entre as raças, 12 DEGs foram compartilhados por todos os três tratamentos avaliados (Figura 19 e Tabela 6). Isso indica uma participação ativa desses genes no desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória associada à infestação por carrapatos em macrófagos M1 de animais taurinos e zebuínos e, conseqüentemente, candidatos para avaliação de polimorfismos que podem constituir marcadores de resistência ao carrapato bovino. Além disso, existem DEGs compartilhados entre os tratamentos, aos pares (Figura 19), sendo 13 entre o controle negativo e o LPS (Apêndice E), 33 entre controle negativo e saliva (Apêndice F) e 10 entre saliva e LPS (Apêndice G). Todos esses genes constituirão alvos potenciais para programas de melhoramento genético que serão melhor avaliados por metanálise de dados de GWAS para animais previamente fenotipados para a resistência ao carrapato *R. microplus*.

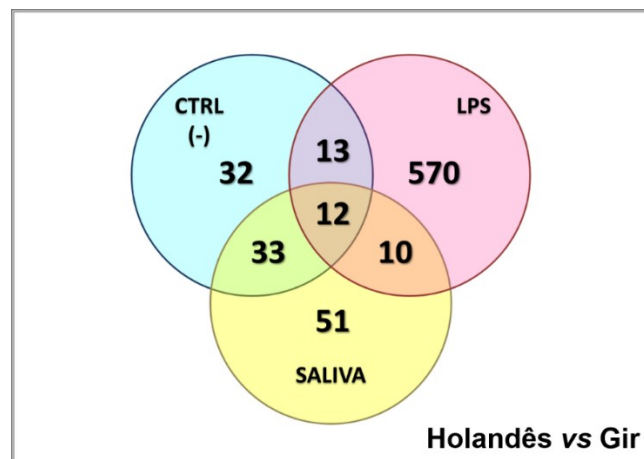


Figura 19. Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de DEGs pelos macrófagos bovinos de animais taurinos versus zebuínos em resposta aos três diferentes estímulos. Estão representadas as quantidades de DEGs, obtidos por análise bioinformática de expressão gênica dos resultados de RNA-Seq, compartilhados entre os macrófagos submetidos aos três tratamentos *in vitro*: CTRL(-) - Controle negativo (sem estimulação, apenas com meio de cultura); LPS - lipopolissacarídeo 100µg/ml; Saliva - saliva do carrapato *R. microplus* diluída 1.000x em meio de cultura.

Tabela 6. Lista dos 12 DEGs em comum nos macrófagos bovinos estimulados *in vitro*. Dados de expressão gênica obtidos por análises de bioinformática do transcriptoma de macrófagos bovinos em cultura com LPS, saliva de *R. microplus* diluída 1.000x e sem estimulação (controle negativo, apenas com meio de cultura) no contraste taurinos *versus* zebuínos. *Down*: *downregulated*; *Up*: *Upregulated*.

ID do Gene	Descrição do gene	Expressão no taurino		
		Controle negativo	LPS	Saliva
<i>IL1RN</i>	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>DNAJC6</i>	<i>DnaJ heat shock protein family member C6</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>TRPC6</i>	<i>transient receptor potential cation channel subfamily C member 6</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>FCAR</i>	<i>Fc fragment of IgA receptor</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>RSAD2</i>	<i>radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>TRMT44</i>	<i>tRNA methyltransferase 44 homolog</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>SDS</i>	<i>serine dehydratase</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>TMEM150A</i>	<i>transmembrane protein 150A</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>SLC13A3</i>	<i>solute carrier family 13 member 3</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>NMRAL1</i>	<i>NmrA like redox sensor 1</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>EGLN3</i>	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>HIRIP3</i>	<i>HIRA interacting protein 3</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>

5.5 RT-qPCR PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DE SEQUENCIAMENTO DE RNA E CARACTERIZAÇÃO DE POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os resultados de expressão gênica obtidos a partir do RNA-Seq dos macrófagos bovinos estimulados, *in vitro*, foram validados através de análise por RT-qPCR. Para isso, foram escolhidos, aleatoriamente, 7 genes apontados pela ontologia gênica, relacionados a processos biológicos voltados à resposta imune nos três tratamentos avaliados nos contrastes entre as raças taurina e zebuína. Os genes escolhidos para essa análise foram os codificadores das proteínas EGLN3 (do inglês, *egl-9 family hypoxia inducible factor 3*), GATA3 (do inglês, *GATA binding protein 3*) e C3 (do inglês, *Complement 3*), do receptor BMPR1A (do inglês, *bone morphogenetic protein receptor type 1A*), da enzima IRAK2 (do inglês, *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2*), do fator de transcrição NFκB2 (do inglês, *nuclear factor kappa B subunit 2*) e do regulador negativo de espécies de oxigênio NRROS (do inglês, *negative regulator of reactive oxygen species*).

A caracterização do perfil de resposta dos macrófagos M1 bovinos ativados na presença de saliva do carrapato *R. microplus* também foi realizada por ensaio de RT-qPCR. Para tal, foi avaliada a expressão dos genes codificadores da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2), do fator de transcrição NFκB subunidade 2 (NFκB2), da interleucina 10 (IL10), do regulador negativo de espécies de oxigênio (NRROS) e da enzima ornitina aminotransferase (OAT).

Previamente à análise dos genes utilizados na validação de expressão gênica e de polarização dos macrófagos bovinos sob os diferentes tratamentos, foram estabelecidas as melhores condições de reação para eficiência de amplificação (entre 90-110%) dos *primers* sintetizados, conforme descrito no item 4.5.2. Para tal, foram testadas diferentes concentrações dos pares de *primers* e de quantidade de cDNA para de cada gene e, os valores de Ct obtidos, foram transportados para o software REST (PFAFFL et al., 2002), que realizou, por regressão linear simples, o cálculo da eficiência da reação (Tabela 7).

A estabilidade dos pares de *primers* de controle endógeno foi calculada pela ferramenta GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), onde os menores valores

de *M* foram obtidos para os genes RPLP0 (do inglês, *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*) e Ubiquitina (dados não mostrados) e, portanto, foram os mais estáveis.

Tabela 7. Condições estabelecidas para reações de RT-qPCR com base na eficiência dos primers para os alvos de amplificação gênica. Valores de eficiência dos pares de primers selecionados para os experimentos de validação dos resultados de expressão gênica obtidos através de RNA-Seq e modulação da polarização de macrófagos M1 pela saliva do carrapato *R. microplus* calculados pelo software REST (PFAFFL et al., 2002), bem como concentração dos primers (em nM), e quantidade de amostra selecionados. A coluna "Ct" indica o número de ciclo no qual o sinal de fluorescência alcança o limiar da curva de amplificação.

Primer	REST	Concentração de Primer (nM)	Quantidade de cDNA (ng)	Ct
OAT (<i>ornithine aminotransferase</i>)	109%	100	12,5	29,02
IL-10 (<i>Interleukin 10</i>)	96,5%	200	25	30,93
NOS2 (<i>nitric oxide synthase 2</i>)	109%	300	12,5	31,75
TLR4 (<i>toll like receptor 4</i>)	99,5%	100	12,5	27,20
NRROS (<i>negative regulator of reactive oxygen species</i>)	90%	300	25	30,51
NFKB2 (<i>nuclear factor kappa B subunit 2</i>)	105%	200	25	29,40
C3 (<i>Complement 3</i>)	91%	200	12,5	28,42
BMPR1A (<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>)	94,5%	200	25	31,61
GATA3 (<i>GATA binding protein 3</i>)	110%	900	12,5	34,21
EGLN3 (<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i>)	97%	200	25	27,93
IRAK2 (<i>Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2</i>)	101%	300	25	29,90
RPLP0 (<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>)	101%	75	6,25	24,69
Ubiquitina	107%	300	6,25	24,72

Os níveis de expressão dos genes provenientes de macrófagos de bovinos taurinos e zebuínos tratados com LPS, saliva de *R. microplus* diluída 1.000x e sem estimulação (apenas com meio de cultura), medidos por RT-qPCR, foram comparados àqueles adquiridos pelo método de RNA-Seq (Figura 20). Todos os transcritos dos genes selecionados apresentaram padrão similar quando quantificados por ambas as metodologias, validando os resultados obtidos pelo sequenciamento.

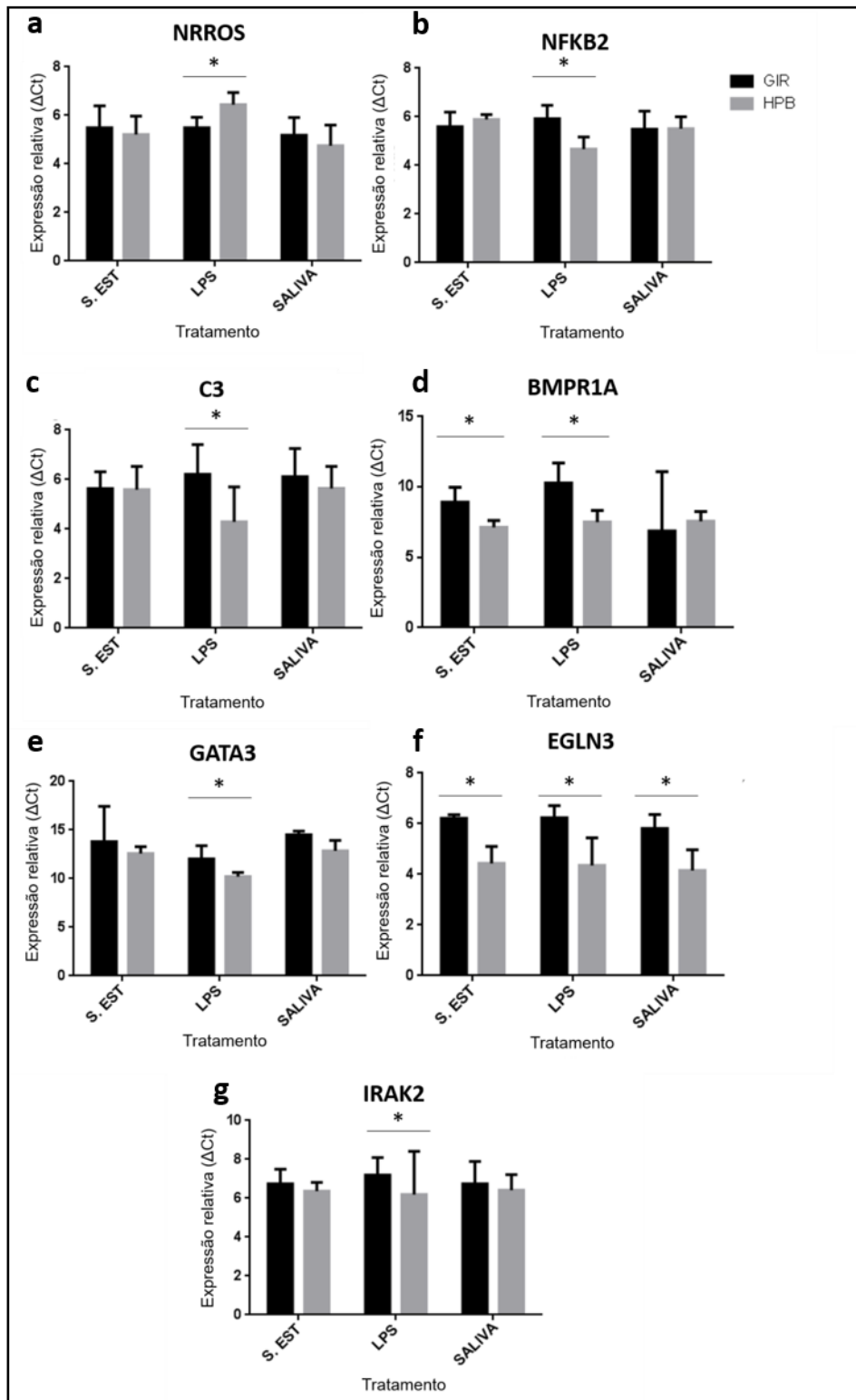


Figura 20. Confirmação dos resultados obtidos no RNA-Seq por RT-qPCR. Expressão dos genes *NRROS* (do inglês, *Negative Regulator of Reactive Oxygen Species*), *NFKB2* (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*), *C3* (do inglês, *Complement 3*), *BMPR1A* (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A*), *GATA3* (do inglês, *GATA Binding Protein 3*), *EGLN3* (do inglês, *Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3*) e *IRAK2* (do inglês, *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 2*) através de RT-qPCR relativo entre macrófagos taurinos (HPB; n = 4) e zebuínos (Gir; n = 4) para os três tratamentos (sem estimulação, LPS e saliva de carrapato diluída 1.000x). (*) representam diferenças estatísticas significativas (Teste T, p < 0,01) entre os tratamentos indicados corroborando os resultados obtidos pelo RNA-seq.

Alguns dos genes utilizados para a validação do RNA-Seq também foram utilizados como indicadores de modulação da resposta de macrófagos M1 pela saliva do *R. microplus*, são eles: fatores ligados à geração de espécies reativas de oxigênio *NOS2* e *NRROS* e o fator de transcrição *NFkB2*. Também foram avaliadas a expressão dos genes *IL-10* e *OAT*, como indicadores do perfil M2 (MARTINEZ et al., 2008; RATH et al., 2014). Para a caracterização da modulação do perfil de macrófagos, foram utilizadas amostras provenientes de animais taurinos (n = 4) e zebuínos (n = 4) tratadas, *in vitro*, apenas com meio de cultura ou com LPS (10ng/ml) ou com saliva de carrapato diluída 1.000x ou a combinação de saliva diluída 1.000x com LPS (10ng/ml). Os resultados apontaram para uma modulação negativa da expressão do gene *NOS2* em macrófagos de animais taurinos na presença da saliva do carrapato quando comparados à ativação com LPS sozinho (Figura 21 a). Essa modulação da saliva parece interferir também na expressão gênica de *NFkB2* uma vez que existem diferenças significativas entre animais taurinos e zebuínos estimulados com LPS sozinho, que desaparecem quando é adicionada a saliva, sugerindo que animais resistentes tem aumento mais significativo da expressão dessa molécula frente a estimulação com a saliva, corroborando os resultados de análise de rota metabólica que indicam uma maior ativação de NFkB via MYD88 (Figuras 16 e 21 b).

A expressão de genes com perfil anti-inflamatório associados ao fenótipo M2 de resposta de macrófagos, como o *IL-10*, *NRROS* e *OAT*, também foi avaliada. A expressão gênica de *IL-10* apresentou-se maior em macrófagos de animais taurinos estimulados com LPS (Figura 21 c), sendo aumentada significativamente em macrófagos zebuínos co-estimulados com LPS + saliva (Figura 21 c). Isso sugere uma participação ativa de mecanismos regulatórios da inflamação via *IL-10*, pela saliva do carrapato, especialmente em hospedeiros zebuínos. Vale ressaltar que uma maior expressão do gene ligado à expressão de *IL-10* em animais taurinos (Figura 21 c) pode estar associada com o desenvolvimento de um fenótipo M1 de macrófagos menos eficiente em produzir espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias para amplificação de uma resposta Th1 efetiva no controle do carrapato. Ademais, o gene do regulador negativo de espécies reativas de oxigênio (*NRROS*) apresentou maior expressão nos macrófagos taurinos tratados com LPS e combinando-se saliva + LPS, em relação aos zebuínos (Figura 21 d). Isso corrobora

ainda mais os achados de literatura e das análises de rotas metabólicas, que sugerem, de modo geral, uma inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em hospedeiros taurinos com reflexo direto na deficiência de controle de infestações com *R. microplus*. O gene *OAT*, marcador de macrófagos M2, não apresentou qualquer alteração de expressão entre as raças e entre os tratamentos em uma mesma raça (Figura 21 e).

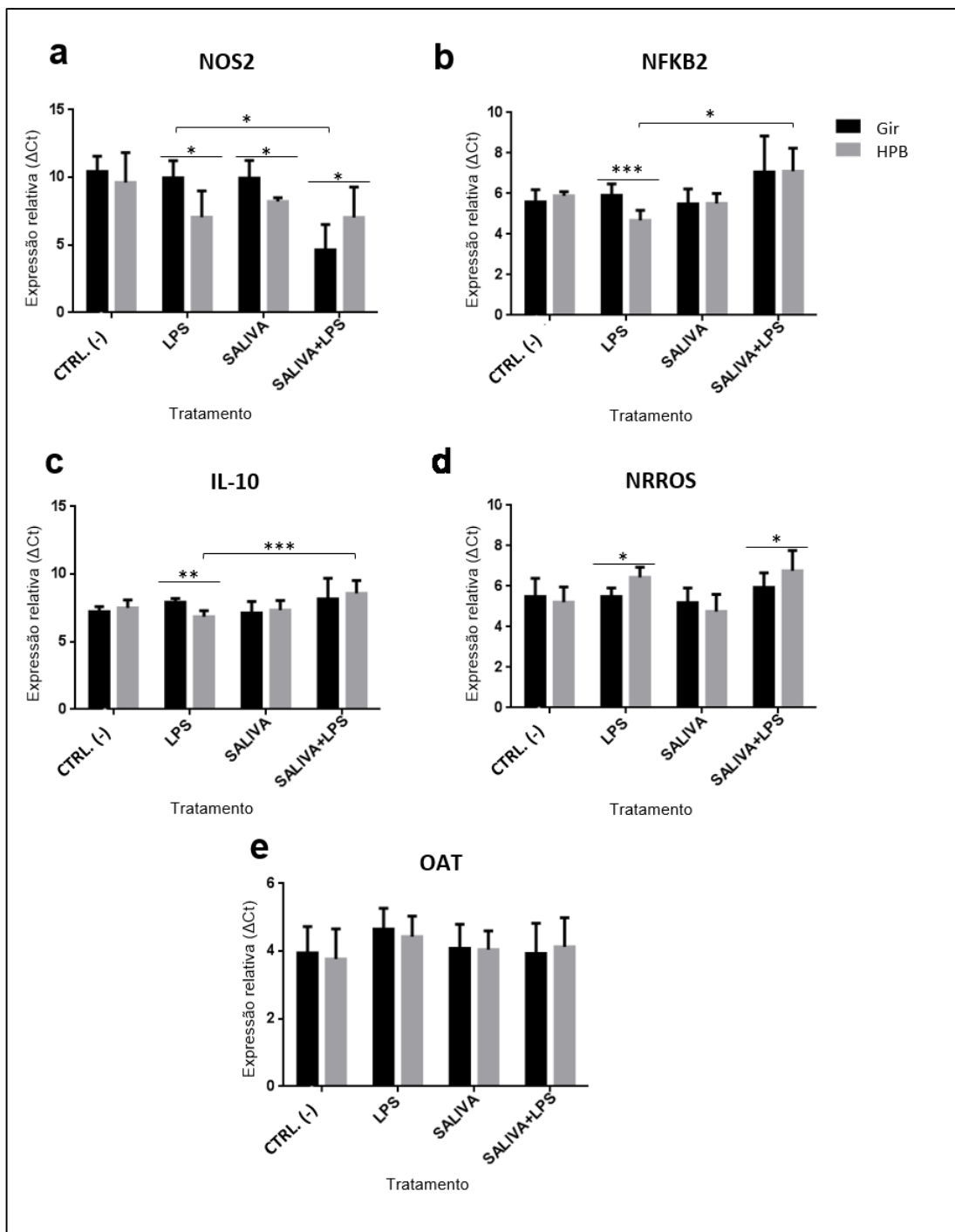


Figura 21. Modulação da expressão de genes relacionados aos fenótipos M1 e M2 de macrófagos de animais taurinos e zebuínos, *in vitro*, pela saliva do carrapato *R. microplus*. Comparativos da expressão dos genes pro-inflamatórios *NFKB2* (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*) e *NOS2* (do inglês, *Nitric Oxide Synthase 2*) e anti-inflamatórios, *IL-10* (do inglês, *Interleukin 10*), *NRROS* (do inglês, *Negative Regulator of Reactive Oxygen Species*) e *OAT* (do inglês, *Ornithine Aminotransferase*), em relação aos macrófagos de animais taurinos (n = 4, barras cinzas) e zebuínos (n = 4, barras pretas) que foram submetidos, *in vitro*, aos tratamentos com meio de cultura sem estímulo (CTRL -), LPS (10ng/ml), saliva de carrapato diluída 1.000x e a combinação de saliva diluída 1.000x + LPS (10ng/ml). A expressão relativa dos genes (a) *NOS2*, (b) *NFKB2*, (c) *IL-10*, (d) *NRROS* e (e) *OAT* foi analisada pelo método de Delta Ct e comparadas pelos teste T entre as raças e por ANOVA de uma via entre tratamentos dentro de uma mesma raça. As diferenças estatísticas significativas estão apontadas por barras entre os níveis analisados, com asteriscos indicando as significâncias encontradas com os teste utilizados. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

6 DISCUSSÃO

Os macrófagos utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir da diferenciação de monócitos do sangue periférico de bovinos das raças gir (zebuínos, n = 4) e holandesa (taurinos, n = 4), resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. microplus*, respectivamente. A obtenção desses foi baseada no protocolo descrito por Saldarriaga et al. (2003), utilizando-se gradiente de centrifugação para obtenção e cultura de PBMCs, a partir das quais apenas os monócitos/macrófagos permaneceram aderidos às placas, posteriormente a sucessivas trocas de meio. Os autores confirmaram a pureza das células obtidas após 12 dias de cultura por citometria de fluxo, com marcação de CD14 expresso na membrana celular. No presente trabalho essa constatação foi confirmada, verificando-se ainda a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Aos 11 dias de cultura dos monócitos isolados das PBMCs, foi observada uma mudança do aspecto morfológico das células, de um formato arredondado e pequeno com 24h para um aspecto maior e com projeções de membrana, analisada por microscopia de luz (Figura 7 a, b). A diferenciação em macrófagos foi confirmada por citometria de fluxo, avaliando-se a expressão dos marcadores de superfície celular, CD14 e CD11b, presentes tanto em monócitos quanto em macrófagos, porém com diferentes níveis de expressão em cada um deles.

Conforme já descrito principalmente para humanos e murinos (ZIEGLER-HEITBROCK E ULEVITCH, 1993; ZHANG et al., 2008; AN et al., 2017), os monócitos possuem pouca expressão de CD14, que é aumentada em macrófagos diferenciados, corroborando os resultados significativos encontrados para as células bovinas (Figura 7 c, e). São descritos também, diferentes níveis de expressão do marcador CD11b, positiva para monócitos e diminuta em macrófagos (CROCKER E GORDON, 1985; SEU et al., 2017). Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa nas análises realizadas. Isso pode ter ocorrido, devido a grandes valores de desvio padrão observados entre as amostras, embora no gráfico da Figura 7c os valores médios ainda indiquem a corroboração com a literatura. Apesar desse último resultado, é possível afirmar que ocorre uma alteração da expressão de marcadores na superfície dessas células, o que indica a sua diferenciação. Uma análise futura, mais

aprofundada para fenotipagem dos subtipos celulares, se faz interessante, utilizando-se um painel mais apurado de marcadores, específicos para os estágios celulares diferentes e também para caracterização dos perfis de resposta de macrófagos.

Para verificar se existem diferenças no desenvolvimento da resposta imune inata de bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. microplus*, o RNA de macrófagos, submetidos a diferentes tratamentos (controle negativo - apenas com meio de cultura, LPS, saliva de carrapato diluída 1.000x e combinando-se a saliva, nessa mesma diluição, com LPS), foi extraído e comparou-se as respostas entre eles por metodologias de RNA-Seq e por RT-qPCR. A técnica de sequenciamento de nova geração foi utilizada para avaliar a expressão gênica dos macrófagos não estimulados (controle negativo), tratados com LPS e tratados com a saliva do carrapato. Já o PCR em tempo real foi utilizado para avaliar também a resposta das células tratadas com um estímulo combinado da saliva de carrapato com LPS.

Na literatura, o LPS é descrito como componente da parede celular de bactérias gram negativas, capaz de iniciar uma resposta inflamatória tanto *in vitro*, como *in vivo* (SEELEY E GHOSH, 2017). Consiste em um estímulo pro-inflamatório, cuja cascata de resposta culmina na produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α (TRACEY et al., 1986; ROTHE et al., 1993), IL-1 β (LI et al., 1995) e IL-6 (CHAI et al., 1996) por macrófagos, através do seu reconhecimento por TLR4 na superfície de células de mamíferos (BHATT E GHOSH, 2014). São duas as vias de sinalização que intermediam esse reconhecimento e resposta (WEST et al., 2006; BHATT E GHOSH, 2014). Uma contendo TRIF que leva a ativação de IRF3. E outra, contendo MyD88, IRAK e TRAF que ativam MAPKs e o complexo IKK que culmina na ativação citoplasmática do fator de transcrição NF κ B, que é translocado para o núcleo se ligando a sequências genômicas específicas e modulando sua transcrição (SEELEY E GHOSH, 2017). Por ser um estímulo cujas vias de sinalização e perfil de resposta são tão bem descritos para diversas espécies (KAGAN et al., 2008; TANIMURA et al., 2008; ZANONI et al., 2011; MOLTENI et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2017), o LPS foi utilizado como controle positivo de ativação para os macrófagos de animais taurinos e zebuínos e para comparação do perfil de expressão gênica das duas raças.

Inicialmente, foi interessante realizar uma comparação entre os controles experimentais (negativo - apenas meio de cultura; e positivo - LPS) para cada raça, com a finalidade de verificar se os tratamentos geraram expressão gênica diferencial

entre si, validando a eficácia dos estímulos. Para isso, foi avaliado principalmente se existiam DEGs entre eles e as quantidades para cada raça, comparando-se os resultados de contagem de *reads* obtidos para os macrófagos do controle negativo aos dos estimulados com LPS. Ambas as raças apresentaram grupos de DEGs, indicando a funcionalidade do ensaio e das análises de bioinformática. Dentre esses genes (Apêndice A), encontram-se alguns em comum para ambas as raças (dados não indicados), como aqueles ligados à sinalização por interleucinas e relacionados ao perfil M1 de ativação de macrófagos, o que corrobora com o descrito na literatura relacionado ao perfil de resposta ao LPS, como a expressão de *IL-1 β* e *IL-1 α* (TRACEY et al., 1986; ROTHE et al., 1993; LI et al., 1995) e *CXCL2* (DE FILIPPO et al., 2013). Além disso, foi observado que animais zebuínos apresentaram quantidades de DEGs muito superior aos taurinos. Carvalho et al. (2014) observaram resultados semelhantes *in vivo*, a partir de biópsias de pele de bovinos resistentes e susceptíveis infestados por carrapatos, após 48h. Esses resultados já podem indicar que o tipo de resposta de cada raça é distinto, o que pode ser determinante para a resolução de um processo inflamatório gerado por infecções e infestações por ecto e endoparasitos. Para tal, é importante detectar os principais agentes responsáveis por essas diferenças e identificar genes ou processos candidatos à intervenção imunológica nos animais susceptíveis. Sendo assim, os resultados de expressão gênica, obtidos pelas metodologias utilizadas, foram comparados entre taurinos e zebuínos para cada tratamento. Investigou-se como os macrófagos dos animais resistentes e susceptíveis se comportam, ao nível de transcrição gênica, e o que os diferem, na ausência de contato com qualquer antígeno estranho ou injúria física, quando são estimulados por um agente conhecidamente pro-inflamatório (LPS) e quando são estimulados com a saliva do carrapato, cuja resposta é pouco conhecida.

Na comparação entre macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com o controle negativo, foram apontadas como diferenças no comportamento dos macrófagos inerentes às raças de bovinos, 116 DEGs. Animais taurinos apresentaram maior regulação positiva do fator de transcrição NF κ B, apontados pela maior expressão dos genes *CARD11*, *CARD14* e *CAPN3*, e de genes ligados ao processo de apresentação de antígenos via MHC de classe II (*POLE*, *CDCA5* e *CDKN3*). Esses resultados indicam uma tendência natural dos macrófagos dos animais susceptíveis ao carrapato *R. microplus* em gerar uma resposta imune inflamatória exacerbada de

perfil Th1, mediada por linfócitos T CD4+, via apresentação de antígenos (UNANUE, 1998; BUATOIS et al., 2003; TSAI et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2014; BURRELL et al., 2017; TUNCEL et al., 2017) e maior ativação e recrutamento de leucócitos (DEN HAAN et al., 2014). A ativação da expressão de NFκB, pode também estar contribuindo para a apresentação de antígenos (POLLOCK et al., 2017), já que o fator de transcrição tem correlação positiva sobre a expressão de MHC de classe II (YOSHIMURA et al., 2001).

Vale destacar ainda, o processo biológico de resposta imune, também apontado pela ontologia gênica, no qual cinco dos seis DEGs foram *upregulated* nos zebuínos. Entre eles, genes *BoLA* (*BoLA-DQA2*, *BoLA-DQA5* e *BoLA-DQB*), componentes do complexo de histocompatibilidade principal de classe II de bovinos, com importante papel na apresentação de antígenos para linfócitos T CD4+ (NORIMINE E BROWN, 2005) e também o gene *CCR5* e o gene *BMPR1A*. Já foi demonstrado que o MHC tem contribuição na variação de resistência, contudo não existe um gene único, que esteja associado com alta ou baixa resistência ao carrapato, entre raças ou sistemas de produção (TABOR et al., 2017). O receptor da quimiocina CCL5 (*CCR5*) é expresso na superfície de leucócitos, recrutando essas células para o local da inflamação (MURPHY, 2002; SORIA E BEN-BARUCH, 2003; PROUDFOOT et al., 2008). Carvalho-Costa et al. (2015), demonstraram que quanto mais *CCR5* na superfície de células dendríticas, mais recrutamento de leucócitos via *CCL5*. Portanto, macrófagos de zebuínos podem ser mais facilmente recrutados para um ambiente inflamatório do que os dos taurinos, indicando uma resposta mais rápida dos primeiros. O gene *BMPR1A* codifica o receptor tipo 1 A de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP, do inglês, *bone morphogenetic proteins*), membro da super família de proteínas TGFβ, cujo papel já foi relacionado ao metabolismo energético (TSENG et al., 2008; ZAMANI E BROWN, 2011; WHITTLE et al., 2012; SCHULZ et al., 2013; KUO et al., 2014; XUE et al., 2014). Esses resultados indicam que os macrófagos de ambos os animais apresentaram um perfil pro-inflamatório na ausência de estimulação, mas com ativação de genes pertencentes a vias diferentes em cada raça.

O gene *PTGS2*, apontado no contexto de metabolismo de lipídeos, *upregulated* nos zebuínos, codifica a proteína cicloxigenase 2 (*COX2*). A expressão desse gene é intimamente ligada à produção de prostaglandinas (CHULADA et al.,

2000). Essas moléculas, são hormônios parácrinos que medeiam vários processos celulares e fisiológicos, cuja síntese ocorre a partir do ácido aracdônico, em células inflamatórias como macrófagos e células endoteliais (FLOWER et al., 1972; RYSECK et al., 1992; HSI et al., 1994; MORHAM et al., 1995; WU E WU, 2006). Carvalho et al. (2014) também reportaram a importância do metabolismo de lipídeos na ativação celular através de vias pro-inflamatórias na resposta imune contra infestação por carrapatos em bovinos infestados. Esses resultados corroboram com o relatado pelo grupo, onde animais susceptíveis apresentam comprometimento nessa ativação. Pode-se especular então, que animais resistentes já possuem uma predisposição ao impulsionamento mais eficiente da via de ativação celular pelo metabolismo de lipídeos, sendo esses genes fortes candidatos à intervenção imunomodulatória.

Portanto, em homeostase, taurinos e zebuínos, apresentam perfis de expressão gênica distintos relacionados à resposta imune, o que pode influenciar os tipos de polarização em resposta a antígenos ou injúrias. Podendo inclusive, essa diferença estar relacionada ao perfil de polarização de macrófagos, onde macrófagos M1 classicamente ativados implicam na iniciação e manutenção da inflamação e macrófagos M2 estão associados com a resolução da inflamação crônica (GORDON E MARTINES, 2010).

Diferenças inerentes da raça bovina frente à ativação de cascatas inflamatórias comprometidas com o fenótipo M1 de macrófagos foram apontadas comparando-se a resposta de taurinos *versus* zebuínos estimulados com LPS. Dos 20 DEGs encontrados para resposta inflamatória na análise de ontologia gênica, 16 são *downregulated* nos taurinos, ou seja, esses animais expressam os genes, mas em menor quantidade que os zebuínos. Entre eles, *NOS2*, *C3*, *IL36 β* , *IRAK2*, *TLR4*, *CCL24*, *NF κ B2*. Esse resultado pode indicar que, embora animais holandeses apresentem maior ativação de moléculas relacionadas à ativação de NF κ B na ausência de estímulos, essa via de ativação não é tão significativa na presença de um estímulo pro-inflamatório. Assim, animais da raça gir foram capazes de gerar uma resposta pro-inflamatória ao LPS, de perfil M1, mais acentuada que os holandeses, podendo envolver a ativação de NF κ B2 via TLR4, e ainda a quinase IRAK2 que também participa dessa via (FLEETWOOD et al., 2009; MOTSHWENE et al., 2009; LIN et al., 2010; KRAUSGRUBER et al., 2011).

A ligação do LPS com TLR4 e seu correceptor CD14 (do inglês, *cluster differentiation*), inicia a transdução de sinal celular pelo recrutamento de moléculas adaptadoras (MOTSHWENE et al., 2009; LIN et al., 2010; PLÓCIENNIKOWSKA et al., 2015), e também aumentando a expressão do receptor de C3 (KAGAN E MEDZHITOV, 2007), culminando no recrutamento de MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response 88*) pelo complexo TLR4-CD14 ativado e consequente ativação de NFκB. O CD14 é um marcador fortemente expresso na superfície de macrófagos bovinos com alta afinidade por LPS (SOPP et al., 1996). A interação do LPS com alvos humorais e celulares do hospedeiro, em macrófagos e células dendríticas, levam à biossíntese de diversos mediadores de inflamação, como TNFα e IL-6 e ativa a produção de moléculas co-estimulatórias na ativação da resposta adaptativa (KAWAI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2003; TANIMURA et al., 2008). Duas moléculas adaptadoras medeiam a cascata de sinalização de TLR4: MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response protein 88*) e TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*; FLEETWOOD et al., 2009; KRAUSGRUBER et al., 2011; WANG et al., 2014). A via dependente de MyD88 ativa NFκB e a produção de citocinas pro-inflamatórias, envolvendo o recrutamento e ativação de IRAKs (IRAK1, IRAK2 e IRAK4), enquanto que para a via independente dessa molécula, via TRIF, leva à indução de IFNs do tipo 1 (BARTON E MEDZHITOV, 2003; KAGAN et al., 2008; TANIMURA et al., 2008; ZANONI et al., 2011). Os genes *TLR4*, *NFκB2*, *IRAK2* e *C3* estiveram *upregulated* nos zebuínos, o que pode indicar que a via dependente de MyD88 é a preferencial para os animais resistentes. O fator de transcrição NFκB também pode ser ativado via receptores NOD, independente de TLR (SHAW et al., 2008). O gene *NOD2* foi *upregulated* nos animais gir, indicando mais uma via pela qual animais resistentes podem ativar mais acentuadamente o gene *NFκB2*.

A enzima IRAK2 tem implicação nas vias de sinalização de TLR e do receptor de IL-1 (IL1R), podendo se associar com MyD88 e Mal (MUZIO et al., 1997). A família de citocinas IL-1 é a principal mediadora de respostas imunes inatas, controlando reações pro-inflamatórias a patógenos e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês, *damage-associated molecular patterns*) (WEBER et al., 2010; BAINES et al., 2017). A secreção de IL-1β ativa requer ativação da sinalização pela via de TLR e a clivagem por inflamassomas associados a receptores do tipo NOD

e agindo pela ligação a seu receptor IL1R1 associado a quinases IRAK1, IRAK2 e IRAK4 e ativando NFκB. O gene *IL1RN*, *upregulated* em animais gir, codifica uma proteína antagonista do receptor de IL-1, que se liga ao receptor 1 de IL-1 (IL1R1), mas sem gerar qualquer resposta, apenas competindo com IL-1 e inibindo a formação de suas formas IL-1α e IL-1β (SECKINGER et al., 1987; WEBER et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2002). Portanto, animais resistentes mostraram maior expressão de genes participantes de vias capazes de ativar a cascata de sinalização que culmina na ativação de NFκB, mas também genes relacionados à diminuição dessa resposta. Os mecanismos da resposta imune agem inicialmente aumentando a resposta contra antígenos, mas essa deve ser controlada e posteriormente reduzida para impedir danos maiores ao próprio organismo do hospedeiro, seguida pelo reparo tecidual (NATHAN, 2002). Esse tipo de resposta e controle podem estar ocorrendo nos animais resistentes de maneira mais eficiente que nos susceptíveis.

Dentre os processos biológicos apontados para os macrófagos bovinos tratados com saliva de carrapato, o único associado à resposta imune apontou poucos genes (*PTGDS*, *RSAD2* e *ISG15*), todos *upregulated* nos zebuínos. Animais taurinos apresentaram maior expressão de genes relacionados à citocinese montagem do fuso mitótico e divisão celular. Os resultados indicam que esses animais susceptíveis podem estar sendo menos responsivos no ataque ao carrapato, o que pode ocorrer devido à capacidade imunomodulatória da saliva (RIBEIRO, 1995; BOWMAN et al., 1997; WIKEL E BERGMAN, 1997; OLIVEIRA et al., 2011; GARCIA et al., 2017). Além disso, as células expressaram genes que indicam a maior ocorrência de proliferação celular nos taurinos do que nos zebuínos. Tal fato, alinhado à ausência de um perfil pro-inflamatório, indicam que essas células podem estar favorecendo uma polarização para M2, corroborado ainda pela menor expressão de *NOS2* nos taurinos. A produção de NO é diretamente relacionada à progressão da inflamação e inibição da proliferação de células (MILLS, 2000; MILLS, 2001). Futuramente, será interessante a realização de análises relacionando diferentes diluições de saliva, utilizando-se maiores concentrações, e o perfil de expressão gênica dos macrófagos entre as raças.

Os DEGs *TRPC6* e *TRPM2* foram apontados na análise de enriquecimento do programa Reactome, no contraste entre macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com saliva do carrapato, com expressão aumentada nos bovinos susceptíveis (taurinos). Esses genes participam da via dos canais TRP (do inglês,

Transient Receptor Potential), que formam canais catiônicos sensíveis a estímulos como o estresse oxidativo, transduzindo-o através de sinal elétrico ou químico, de acordo com o canal (WU et al. 2010). Esses canais são potenciais alvos de para drogas, já que a modulação da sua atividade tem importante impacto em funções celulares, regulando a excitabilidade de membrana e níveis de cálcio intracelular (MORAN, 2018).

Outra via enriquecida no contraste de macrófagos tratados com saliva, foi a via de terminação da síntese de DNA translesão. O gene *ISG15*, downregulated em taurinos, participa dessa via. Após ocorrer um dano à molécula de DNA, polimerases tolerantes a erros são recrutadas com intuito de impedir a parada da maquinaria de replicação da célula, sem que haja, no entanto, a eliminação da lesão ocorrida (KANNOUCHE et al., 2004; BIENKO et al., 2005; SALE et al., 2012). Contudo, existe um potencial mutagênico por trás dessa tolerância (MATSUDA et al., 2000; LOEB E MONNAT, 2008; SALE et al., 2012). Agentes danosos ao DNA induzem a expressão de genes codificantes de proteínas mitóticas e oncogênicas, como o *ISG15*, suprimindo sua capacidade de promover apoptose (YANG et al., 1998; JEON et al., 2012). Esse gene tem, portanto, importante papel na limitação de mutagênese (PARK et al., 2014) e, sua menor expressão nos animais susceptíveis, indica mais uma vez a tendência de estimulação da proliferação celular e designação de um perfil M2 dos macrófagos taurinos, influenciado pela saliva do carrapato.

Devido à importância dos genes selecionados para a validação do RNA-Seq em processos biológicos relacionados com a resposta imune, é interessante observar as diferenças no acúmulo de seus transcritos nos macrófagos bovinos de holandeses susceptíveis e dos gir resistentes (Figuras 20 e 21).

A expressão da enzima NOS2 tem papel ativo na produção de espécies reativas de oxigênio, participando da via de síntese do óxido nítrico, induzida por LPS (NUSSLER et al., 1994). A análise por RT-qPCR, utilizada para avaliar a expressão gênica dos macrófagos tratados com controle negativo, LPS, saliva diluída 1.000x e saliva, na mesma diluição, com LPS, corroborou com os achados nas análises provenientes do sequenciamento de RNA, com maior expressão de NOS2 nos macrófagos de zebuínos tratados com LPS e também para os tratados com saliva do carrapato (Figura 21 a). Porém, quando a saliva foi adicionada juntamente com o LPS, houve inversão desse quadro, onde taurinos expressaram mais NOS2, em relação

aos zebuínos. A expressão do gene *NFkB2* (Figura 21 b), codificador da subunidade 2 do fator de transcrição NFkB, cuja atividade culmina na expressão de genes pró-inflamatórios (MANNING et al. 1995; KARIN, 1999), também foi maior nos macrófagos zebuínos estimulados com LPS. Tais resultados reforçam o favorecimento de um perfil M1 mais acentuado nos zebuínos do que nos taurinos.

A regulação negativa de espécies reativas de oxigênio (representada por *NRROS*) esteve aumentada nos taurinos estimulados com LPS (Figura 21 d), o que mostra mais uma vez que os holandeses respondem menos acentuadamente a um estímulo capaz de ativar um perfil M1 de macrófagos. Neste caso, a expressão de *NRROS* também foi diferenciada entre as raças, no tratamento com LPS combinado à saliva, com menor regulação da produção de espécies reativas de oxigênio no zebuínos. Portanto, animais resistentes podem apresentar maior produção de óxido nítrico sob estimulação via TLR4 ou saliva, com um perfil pró-inflamatório, mas essa produção ser invertida em um ambiente de infecção bacteriana concomitante à infestação por carrapatos. Enquanto que, nesse mesmo ambiente, a regulação negativa das espécies reativas de oxigênio é menor, podendo indicar que a menor produção de NO não se deve à essa regulação, atuando por outra via.

A expressão do gene *IL-10* foi diferenciada entre as raças apenas no tratamento das células com LPS. Contudo, nos taurinos houve um aumento significativo da expressão desse gene quando a saliva de carrapato foi conjugada ao LPS. O papel da *IL-10* na supressão da apresentação de antígenos (MITTAL E ROCHE, 2015) pode contribuir para uma mudança no perfil de resposta observado para esse gene.

Portanto, os resultados do RT-qPCR confirmaram a expressão diferencial de genes apontados entre as raças, no tratamento com saliva. E ainda indicaram a aparente atividade modulatória da saliva de *R. microplus* sobre o perfil de resposta inflamatória gerado pelo LPS na expressão dos genes *NOS2*, *NFkB2* e *IL-10*, em pelo menos uma das raças de bovinos.

Dos DEGs encontrados entre animais resistentes e susceptíveis ao carrapato *R. microplus*, 12 foram encontrados nos três tratamentos avaliados (controle negativo, LPS e saliva), a maioria (8 genes) *upregulated* nos animais gir resistentes. Esses genes são candidatos interessantes para o melhoramento genético, pois podem ser especificamente relacionados às raças, sendo expressos

independentemente da pressão seletiva a que os macrófagos são submetidos. Contudo, deve-se considerar que esses genes fazem parte de diversas vias metabólicas, que contém muitos outros genes envolvidos. A modulação desses, deve ser minuciosamente analisada, pois é interessante que sua ação não esteja ligada a atividades metabólicas essenciais ao organismo ou à produção animal, para não comprometer tais atividades celulares. Demais DEGs já relatados anteriormente para os estímulos também representam possíveis alvos de intervenção.

Os mecanismos imunes de bovinos, envolvidos na resposta imune e resistência a carrapatos são complexos e mediados por vários processos que afetam vias inatas, adaptativas, celulares, humorais, imunorregulatórias e efetoras, incluindo recrutamentos de vários subtipos celulares, imunoglobulinas específicas, histamina e perfis de transcrição gênica (KEMP E BOURNE, 1980; DE CASTRO E NEWSON, 1993; WIKEL E BERGMAN, 1997; KASHINO et al., 2005; VERÍSSIMO et al., 2008; KONGSUWAN et al., 2010; PIPER et al., 2010; ENGRACIA FILHO et al., 2017). Bovinos de raças europeias *Bos taurus*, quando infestados por carrapatos, ficam debilitados, podendo até mesmo vir a morte, enquanto que animais *Bos indicus* permanecem relativamente inafetados (FRANCIS, 1996).

Uma limitação do presente trabalho foi o pequeno número de animais e estímulos utilizados para cada fenótipo. Uma maior quantidade de animais sequenciados poderia garantir resultados ainda mais representativos das raças. Análises de expressão gênica para macrófagos submetidos a estímulos M2, para caracterização comparativa da resposta à saliva, também consistem em propostas de análises interessantes no enriquecimento do presente trabalho. Os resultados de sequenciamento obtidos dos macrófagos de bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato ainda podem ser explorados por outras ferramentas de bioinformática para extração de dados informativos em outros campos, como o mapeamento de SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) no éxons e busca por microRNAs (miRNAs) para identificação de outras moléculas ou regiões genômicas passíveis de modulação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Macrófagos obtidos a partir de monócitos isolados das PBMCs de bovinos resistentes (gir) e susceptíveis (holandeses) ao carrapato *R. microplus* apresentaram diferentes perfis de expressão gênica sob o tratamento *in vitro* com distintos estímulos.

Processos biológicos relacionados à resposta imune, inflamação e a vias específicas de respostas a antígenos, assim como a mecanismos de manutenção e divisão celular, foram identificados entre as raças de bovinos resistente e susceptível ao carrapato *R. microplus*, em macrófagos tratados com LPS, saliva do carrapato ou apenas com meio de cultura, por 48h, *in vitro*.

Moléculas chave na progressão e no controle da resposta inflamatória tiveram expressão diferenciada entre macrófagos de bovinos resistentes e susceptíveis, ao nível gênico, o que pode influenciar os tipos de polarização em resposta a antígenos ou injúrias.

A saliva pode favorecer a indução de um perfil de expressão gênica M1 nos macrófagos de animais zebuínos e M2 nos taurinos, para *NOS2* e *NFκB*. E também apresentou aparente atividade moduladora, sobre o padrão inflamatório, para os genes *NOS2*, *NFκB2* e *IL-10*, em resposta ao LPS.

Genes diferencialmente expressos, entre bovinos resistentes e susceptíveis ao carrapato, comuns a todos os três tratamentos avaliados por RNA-Seq são alvos candidatos para intervenção imunológica. Genes ligados ao metabolismo de lipídios, à cascata de sinalização do fator de transcrição *NFκB*, fator do complemento 3 e à via de sinalização de *IL-10* também podem representar possíveis alvos de intervenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABREU, M. R.; PEREIRA, M. C.; SIMIONI, P. U.; NODARI, E. F.; PAIATTO, L. N.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 207, p. 36-45, 2019.
- ACKERMAN, S.; CLARE, F. B.; MCGILL, T. W.; SONENSHINE, D. E. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Parasitology*, v. 67, n. 5, p. 737-40, 1981.
- ACTOR, J. K. A Functional Overview of the Immune System and Immune Components. In: _____. (Org.) *Introductory Immunology: Basic Concepts for Interdisciplinary Applications*. Londres: Academic Press, 2014. cap. 1, p. 1-15.
- AKTER, S. H.; HAUSSLER, S.; GERMEROOTH, D.; VON SOOSTEN, D.; DANICKE, S.; SUDEKUM, K. H.; SAUERWEIN, H. Immunohistochemical characterization of phagocytic immune cell infiltration into different adipose tissue depots of dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3032–3044, 2012.
- ALFANO, F.; PELETTI, S.; LUCIBELLI, M. G.; BORRIELLO, G.; URCIUOLO, G.; MANIACI, M. G.; DESIATO, R.; TARANTINO, M.; BARONE, A.; PASQUALI, P.; ACUTIS, P. L.; GALIERO, G. Identification of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor candidate genes associated with tuberculosis infection in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *BMC Genetics*, v. 15, p. 139, 2014.
- ALMEIDA, J. P.; KOWALSKI, L. P. Pilocarpina no tratamento de xerostomia em pacientes submetidos à iodoterapia: estudo piloto. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 5, p. 659–662, 2010.
- ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V. H.; CORDOVES, C. O.; GUGLIELMONE, A. A.; KESSLER, R. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Revue Scientifique et Technique*, v. 11, n. 3, p. 713–733, 1992.
- ALVAREZ-CALDERON, F.; GREGORY, M. A.; DEGREGORI, J. Using functional genomics to overcome therapeutic resistance in hematological malignancies. *Immunologic Research*, v. 55, n. 0, p. 100–115, 2013.
- AN, D.; HAO, F.; ZHANG, F.; KONG, W.; CHUN, J.; XU, X.; CUI, M. CD14 is a key mediator of both lysophosphatidic acid and lipopolysaccharide induction of foam cell formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 35, p. 14391–14400, 2017.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 2, p. 166–169, 2015.
- ANDRADE, B. B.; TEIXEIRA, C. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: A tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 77, n. 4, p. 665-693, 2005.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; REIS, F. A.; RODRIGUES, V. S.; BARROS, J. C. Proposta de controle de carrapatos para o Brasil Central em sistemas de produção de bovinos associados ao manejo nutricional no campo. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2016. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X; 214).
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A. Situação Atual e Perspectivas no Controle do

Carrapato em Bovinos por Meio de Vacina. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 80).

AOKI, H.; UEHA, S.; SHICHINO, S.; OGIWARA, H.; HASHIMOTO, SI.; KAKIMI, K.; ITO, S.; MATSUSHIMA, K. TCR Repertoire Analysis Reveals Mobilization of Novel CD8+ T Cell Clones Into the Cancer-Immunity Cycle Following Anti-CD4 Antibody Administration. *Frontiers in Immunology*. v. 9, p. 3185, 2019.

APPLIED BIOSYSTEMS. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR. Foster City: [s.n.], 2004. Disponível em: <http://www.gu.se/digitalAssets/1125/1125331_ABI_-_Guide_Relative_Quantification_using_realttime_PCR.pdf>. Acesso em: 04 fevereiro 2019.

ASHRAF, A.; IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, v. 50, n. 6, p. 1193-1202, 2018.

AYLLÓN, N.; VILLAR, M.; GALINDO, R. C.; KOCAN, K. M. ŠÍMA, R.; LÓPEZ, J. A.; VÁZQUEZ, J.; ALBERDI, P.; CABEZAS-CRUZ, A.; KOPÁČEK, P.; DE LA FUENTE, J. Systems Biology of Tissue-Specific Response to *Anaplasma phagocytophilum* Reveals Differentiated Apoptosis in the Tick Vector *Ixodes scapularis*. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 3, p. e1005120, 2015.

BAINES, K. J.; FU, J. J.; MCDONALD, V. M.; GIBSON, P. G. Airway gene expression of IL-1 pathway mediators predicts exacerbation risk in obstructive airway disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, v. 12, p. 541-550, 2017.

BAQUERO, M. M.; PLATTNER, B. L. Bovine peripheral blood WC1⁺ and WC1^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes modulate monocyte-derived macrophage effector functions during in vitro *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Cellular Immunology*, v. 315, p. 34-44, 2017.

BARENDSE, W. Assessing Tick Resistance in a Bovine Animal for Selecting Cattle for Tick Resistance by Providing a Nucleic Acid from the Bovine Animal and Assaying for the Occurrence of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP), 2007.

BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, v. 300, n. 5625, p. 1524–1525, 2003.

BECHARA, G. H.; MORELLI JR., J.; SZABÓ, M. P. J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 570-575, 2000.

BELLEGARD, M. I.; MOOLHUIJZEN, P. M.; GUERRERO, F. D.; SCHIBECI, D.; RODRIGUEZ-VALLE, M.; PETERSON, D. G.; DOWD, S. E.; BARRERO, R.; HUNTER, A.; MILLER, R. J.; LEW-TABOR, A. E. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 2, p. 161–169, 2012.

BENETTI, F.; GUSTINCICH, S.; LEGNAME, G. Gene expression profiling and therapeutic interventions in neurodegenerative diseases: a comprehensive study on potentiality and limits. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 7, n. 3, p. 245–259, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, v. 57, p. 289–300, 1995.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, v. 181, p. 3733–3739, 2008.

BHATT, D.; GHOSH, S. Regulation of the NF- κ B-mediated transcription of inflammatory genes. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 71, 2014.

- BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; DA SILVA, S. S.; DOS SANTOS, T. R B; DIONELLO, N. J L; GULIAS-GOMES, C. C.; CARDOSO, F. F. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 208, p. 231–237, 2015.
- BIENKO, M.; GREEN, C.M.; CROSETTO, N.; RUDOLF, F.; ZAPART, G.; COULL, B.; KANNOUCHE, P.; WIDER, G.; PETER, M.; LEHMANN, A.R.; Hofmann, K.; Dikic, I. Ubiquitinbinding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, v. 310, p. 1821–1824, 2005.
- BOLAÑOS, C. A. D.; PAULA, C. L.; GUERRA, S. T.; FRANCO, M. M. J.; RIBEIRO, M. G. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 59, p. e40, 2017.
- BOWEN, C. J.; JAWORSKI, D. C.; WASALA, N. B.; COONS, L. B. Macrophage migration inhibitory factor expression and protein localization in *Amblyomma americanum* (Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v. 50, n. 4, p. 343-52, 2010.
- BOWMAN A. S., COONS L. B., NEEDHAM G. R., SAUER J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and Veterinary Entomology*. v. 11, p. 277–85, 1997.
- BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*, v. 129, 2004.
- BOWMAN, A.; NUTTALL, P. (EDS.). *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- BRADLEY, D. G.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; MACHUGH, D. E. Genetics and domestic cattle origins. *Evolutionary Anthropology*, v. 6, n. 3, p. 79–86, 1998.
- BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 38, 2012.
- BRAKE, D. K.; WIKEL, S. K.; TIDWELL, J. P.; LEÓN, A. A. P. *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages. *Parasites & Vectors*, v.3, n. 103, 2010.
- BRANCO, V. G.; IQBAL, A.; ALVAREZ-FLORES, M. P.; SCIANI, J. M.; DE ANDRADE, S. A.; IWAI, L. K.; SERRANO, S. M.T.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1864, p. 1428–1435, 2016.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, n. 3, p. 270–276, 1997.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. Tick immunobiology. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S161–S176, 2004.
- BROUARD JS, BOYLE B, IBEAGHA-AWEMU EM, BISSONNETTE N. Low-depth genotyping-by-sequencing (GBS) in a bovine population: strategies to maximize the selection of high quality genotypes and the accuracy of imputation. *BMC Genetics*, v. 18, n. 1, p. 32, 2017.
- BROWN, A. F. Anaphylactic shock: mechanisms and treatment. *Journal of accident & emergency medicine*, v. 12, n. 2, p. 89-100, 1995.
- BRUNELLE, B. W.; GREENLEE, J. J.; SEABURY, C. M.; BROWN, C.E.; NICHOLSON, E. M. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. *BMC Veterinary Research*, v. 4, p.36, 2008.

BRUNO, D. R.; ROSSITTO, P. V.; BRUNO, R. G.; BLANCHARD, M. T.; SITT, T.; YEARGAN, B. V.; SMITH, W. L.; CULLOR, J. S.; STOTT, J. L. Differential levels of mRNA transcripts encoding immunologic mediators in mammary gland secretions from dairy cows with subclinical environmental Streptococci infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 138, n. 1-2, p. 15-24, 2010.

BUATOIS, V.; BAILLET, M.; BÉCART, S.; MOONEY, N.; LESERMAN, L.; MACHY, P. MHC class II-peptide complexes in dendritic cell lipid microdomains initiate the CD4 Th1 phenotype. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 11, p. 5812-9, 2003.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Adaptive Immune Responses to Infection In: _____. (Org.). Fenner and White's Medical Virology. 5. ed. Londres: Elsevier, 2017. cap. 6, p. 65-76.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 169-93, 2000.

CANALES, M.; ENRIQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCÓN, V.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine*, v. 15, p. 414-422, 1997.

CARDOSO, F. F.; GOMES, C. C. G.; SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, M. M.; ROSO, V. M.; PICCOLI, M. L.; HIGA RH.; YOKOO, M. J.; CAETANO, A. R.; AGUILAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. *Journal of Animal Science*, v. 93, p. 2693-2705, 2015.

CARVALHO, W. A.; DOMINGUES, R.; PRATA, M. C. A.; SILVA, M. V.G.B.; OLIVEIRA, G. C.; GUIMARÃES, S. E. F.; MACHADO, M. A. Microarray analysis of tick-infested skin in resistant and susceptible cattle confirms the role of inflammatory pathways in immune activation and larval rejection. *Veterinary Parasitology*, v. 205, p. 307-317, 2014.

CARVALHO, W. A.; IANELLA, P.; ARNOLDI, F. G.; CAETANO, A. R.; MARUYAMA, S. R.; FERREIRA, B. R.; CONTI, L. H.; DA SILVA, M. R.; PAULA, J. O.; MAIA, A. A.; SANTOS, I. K. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. *Immunogenetics*, v. 63, n. 5, p. 319-24, 2011.

CARVALHO-COSTA, T. M.; MENDES, M. T.; DA SILVA, M. V.; DA COSTA, T. A.; TIBURCIO, M. G. S.; ANHÊ, A. C. B. M.; RODRÍGUES, V.; OLIVEIRA, C. J. F. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 22, 2015.

CASSADO, A. A. Heterogeneidade dos macrófagos peritoniais. 2011. 158f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASTILLO-VELÁZQUEZ, U.; GOMEZ-FLORES, R.; TAMEZ-GUERRA, R.; TAMEZ-GUERRA, P.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C. Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to *Mycobacterium bovis* after classical and alternative activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 154, p. 8-16, 2013.

CATTO, J. B.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 123).

CAVALCANTI, M. A. F. H.; CARVALHO, L. M. DE. Nota Técnica III - Indicador Ipea de PIB Agropecuário MENSAL. 2017.

CAVASSANI, K. A.; ALIBERTI, J. C.; DIAS, A. R. V.; SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine

bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, v. 114, p. 235–245, 2005.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Mercado de trabalho do agronegócio. Disponível em <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/mercado-de-trabalho-do-agronegocio.aspx>>. Acesso em: 14 janeiro 2019.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; BARTFAI, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, v.183, n. 1, p. 311-6, 1996.

CHAIPAN, C.; PRYSZLAK, A.; DEAN, H.; POIGNARD, P.; BENES, V.; GRIFFITHS, A. D.; MERTEN, C. A. Single-Virus Droplet Microfluidics for High-Throughput Screening of Neutralizing Epitopes on HIV Particles. *Cell Chemical Biology*, v. 24, n. 6, p. 751-757, 2017.

CHEN, G.; SEVERO, M. S.; SOHAIL, M.; SAKHON, O. S.; WIKEL, S. K.; KOTSYFAKIS, M.; PEDRA, J. H. F. *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 229, 2012.

CHIEN, C. C.; SHEN, S. C.; YANG, L. Y.; CHEN, Y. C. Prostaglandins as negative regulators against lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, and peptidoglycan-induced inducible nitric oxide synthase/nitric oxide production through reactive oxygen species-dependent heme oxygenase 1 expression in macrophages. *Shock*, v. 38, n. 5, p. 549-58, 2012.

CHULADA, P. C.; THOMPSON, M. B.; MAHLER, J. F.; DOYLE, C. M.; GAUL, B. W.; LEE, C.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; SMITHIES, O.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of *Ptgs-1*, as well as *Ptgs-2*, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Research*, v. 60, n. 17, p. 4705-8, 2000.

CHUMAKOVA, A. P.; HITOMI, M.; SULMAN, E. P.; LATHIA, J. D. High-throughput automated single-cell imaging analysis reveals dynamics of glioblastoma stem cell population during state transition. *Cytometry A*, 2019.

CITELLI, M.; LARA, F. A.; DA SILVA VAZ, I. JR.; OLIVEIRA, PL. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 151, n. 1, p. 81-8, 2007

CLARK, R. A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 130, p. 362–370, 2010.

CONTRERAS, G. A.; KABARA, E.; BRESTER, J.; NEUDER, L.; KIUPEL, M. Macrophage infiltration in the omental and subcutaneous adipose tissues of dairy cows with displaced abomasum. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 6176–6187, 2015.

CONTRERAS, G. A., THELEN, K., SCHMIDT, S. E., STRIEDER-BARBOZA, C., PRESEAU, C.L., RAPHAEL, W., KIUPEL, M., CARON, J., LOCK, A.L. Adipose tissue remodeling in late-lactation dairy cows during feed-restriction-induced negative energy balance. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p.10009–10021, 2016.

CORBEIL, L. B. *Histophilus somni* host–parasite relationships. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, n. 2, p.151–160, 2007.

COSSÍO-BAYÚGAR, R.; MARTÍNEZ-IBAÑEZ, F.; AGUILAR-DÍAZ, H.; MIRANDA-MIRANDA, E. Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *BioMed Research International*, p. 8292465, 2018.

COTTÉ, V.; SABATIER, L.; SCHNELL, G.; CARMILEROY, A.; ROUSSELLE, J. C.; ARSÈNE-PLOETZE, F.; MALANDRIN, L.; SERTOUR, N.; NAMANE, A.; FERQUEL, E.; CHOUMET, V. Differential expression of *Ixodes ricinus*

salivary gland proteins in the presence of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. *Journal of Proteomics*, v. 96, p. 29–43, jan. 2014.

CROCKER, P. R.; GORDON, S. Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 162, n. 3, p. 993–1014, 1985.

CSORDAS, B. G.; CUNHA, R. C.; GARCIA, M. V.; DA SILVA, S. S.; LEITE, F. L.; ANDREOTTI, R. Molecular characterization of the recombinant protein RmLTI-BmCG-LTB: Protective immunity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *PloS one*, v. 13, n. 2, p. e0191596, 2018.

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

DAI, J.; WANG, P.; ADUSUMILLI, S.; BOOTH, C. J.; NARASIMHAN, S.; ANGUITA, J.; FIKRIG, E. Antibodies against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host & Microbe*, v. 6, p. 482–492, 2009.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, p. 986–995, 2013.

DE CASTRO, J. J.; NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*, v. 9, p. 13–17, 1993.

DE FILIPPO, K.; DUDECK, A.; HASENBERG, M.; NYE, E.; VAN ROOIJEN, N.; HARTMANN, K.; GUNZER, M.; ROERS, A.; HOGG, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, v. 121, n.24, p. 4930-7, 2013.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, n. 1, p. 23-8, 2007.

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

DE MIRANDA-SANTOS, I. K.; CAMPOS-NETO, A. J. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 154, n. 6, p. 1732-42, 1981.

DEN HAAN, J. M. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, v. 162, n. 2, p. 103–112, 2014.

DEY, A.; ALLEN, J.; HANKEY-GIBLIN, P. A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: Blood monocytes versus tissue macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1–15, 2015.

DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; DRENKOW, J.; ZALESKI, C.; JHA, S.; BATUT, P.; CHAISSON, M.; GINGERAS, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.

DOEBEL, T.; VOISIN, B.; NAGAO, K. Langerhans cells – the macrophage in dendritic cell clothing. *Trends in Immunology*, v. 38, n. 11, p. 817–828, 2017.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O.H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, vol.66, no. 1, pp. 130–133, 1973

DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 27, n.6, p. 665-72, 2015.

EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal Reproduction Science*, v. 114, n. 1-3, p. 54-61, 2009.

ENGRACIA FILHO, J. R.; ARAÚJO, C. D.; PINTO, G. N.; MENDES, Y. H.; BECHARA, G. H. Cellular response in the tick feeding site in crossbred cattle artificially infested by *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, v. 72, p. 171–178, 2017.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, JL.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, v. 38, p. 219-235, 2006.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, p. 175–185, 1998.

FABREGAT, A.; JUPE, S.; MATTHEWS, L.; SIDIROPOULOS, K.; GILLESPIE, M.; GARAPATI, P.; HAW, R.; JASSAL, B.; KORNINGER, F.; MAY, B.; MILACIC, M.; ROCA, C. D.; ROTHFELS, K.; SEVILLA, C.; SHAMOVSKY, V.; SHORSER, S.; VARUSAI, T.; VITERI, G.; WEISER, J.; WU, G.; STEIN, L.; HERMIAKOB, H.; D'EUSTACHIO, P. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic acids research*, v. 46, n. D1, p. D649-D655, 2018.

FEITO, M. J.; DIEZ-OREJAS, R.; CICUÉNDEZ, M.; CASARRUBIOS, L.; ROJO, J. M.; PORTOLÉS M. T. Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v. 176, p. 96-105, 2019.

FERNÁNDEZ, M.; BENAVIDES, J.; CASTAÑO, P.; ELGUEZABAL, N.; FUERTES, M.; MUÑOZ, M.; ROYO, M.; FERRERAS, M. C.; PÉREZ, V. Macrophage Subsets Within Granulomatous Intestinal Lesions in Bovine Paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, v. 54, n. 1, p. 82-93, 2017.

FERNANDEZ, P. B.; LUCIBELLO, F. C.; GEHLING, U. M.; LINDERMANN, K.; WEIDNER, N.; ZUAZARTE, M. L.; ADAMKIEWICZ, J.; ELASSER, H. P.; MULLER, R.; HAVEMANN, K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*, v. 65, n. 287-300, 2000.

FERREIRA, B. R.; SZABÓ, M. J. P.; CAVASSANI, K. A.; BECHARA, G. H.; SILVA, J. S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FLEETWOOD, A. J.; DINH, H.; COOK, A. D.; HERTZOG, P. J.; HAMILTON, J. A. GM-CSF- and MCSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 86, n. 2, p.411–21, 2009.

FLOWER, R.J.; GRYGLEWSKI, R.; HERBACZYNSKA-CEDRO, K.; VANE, J.R. Effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis. *Nature*, v. 238, p. 104-106, 1972.

FONSECA, P. A. S.; ID-LAHOUCINE, S.; REVERTER, A.; MEDRANO, J. F.; FORTES, M. S.; CASELLAS, J.; MIGLIOR, F.; BRITO, L.; CARVALHO, M. R. S.; SCHENKEL, F. S.; NGUYEN, L. T.; PORTO-NETO, L. R.; THOMAS, M. G.; CÁNOVAS, A. Combining multi-OMICs information to identify key-regulator genes for pleiotropic effect on fertility and production traits in beef cattle. *PLoS One*. v. 13, n. 10, p. e0205295, 2018.

FRANCIS, J. Resistance of Zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. *British Veterinary Journal*, v. 122, p. 301–307, 1966.

FRANCISCHETTI, I. M. B. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*, v. 56, n. 7, p. 1130–1144, 2010.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; N. MATHER, T.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 94, n. 1, p. 167–174, 2005.

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

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

FRISCH, J. E.; O'NEILL. Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. 2. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. *Animal Science*, v. 67, p. 39–48, 1998.

FUKUMOTO, S.; SAKAGUCHI, T.; YOU, M.; XUAN, X.; FUJISAKI, K.. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvascular Research*, v. 71, p. 218–221, 2006.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 331–341, 2007.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG*, v. 8, p. 49–61, 1993.

FURLONG, J.; PRATA, M. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Ed.). *Carrapato : problemas e soluções*. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p. 65.

GAO, Y.; JIANG, J.; YANG, S.; CAO, J.; HAN, B.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; YU, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Q.; FANG, L.; CANTRELL, B.; SUN, D. Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics*, v. 19, n. 1, p. 972, 2018.

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

GARCIA, M.; ANDREOTTI, R.; REIS, F.; AGUIRRE, A.; BARROS, J.; MATIAS, J.; KOLLER, W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 515, 2014.

GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRÍGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZÁLEZ, I. L.; VALDÉS, M.; MÉNDEZ, L.; DE LA FUENTE, J. Control of tick resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 8, p. 2275–2287, 2000.

GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L. L.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; MACHADO MA, SILVA MV, SONSTEGARD TS, REGITANO LC. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics*, v. 38, p. 453–459. 2007

GAUTIER, E. L.; SHAY, T.; MILLER, J.; GRETER, M.; JAKUBZICK, C.; IVANOV, S.; HELFT, J.; CHOW, A.; ELPEK, K. G.; GORDONOV, S.; MAZLOOM, A. R.; MA'AYAN, A.; CHUA, W. J.; HANSEN, T. H.; TURLEY, S. J.; MERAD, M.; RANDOLPH, G. J. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, v. 13, p. 1118–1128, 2012.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; AND LITTMAN, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, v. 19, n. 71–82, 2003.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GERDTZEN, Z. P. Modeling Metabolic Networks for Mammalian Cell Systems: General Considerations, Modeling Strategies, and Available Tools. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, v. 127, p. 71–108, 2012.

GOMEZ PERDIGUERO, E. ; KLAPPROTH, KAY; SCHULZ, C.; BUSCH, K.; AZZONI, E.; CROZET, L.; GARNER, H.; TROUILLET, C.; DE BRUIJN, M. F.; GEISSMANN, F.; RODEWALD, H. R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, v. 0, p. 547–551, 2014.

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

GONZALES, J. C. O controle dos carrapatos dos bovinos. Porto Alegre: Sulina, 1975.

GORDON, S; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

GOSZCZYNSKI, D.; MOLINA, A.; TERÁN, E.; MORALES-DURAND, H.; ROSS, P.; CHENG, H.; GIOVAMBATTISTA, G.; DEMYDA-PEYRÁS, S. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: Descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. *PLoS One*. v. 13, n. 7, p. e0200069, 2018.

GREGSON, J. D. Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. *Parasitology*, v. 57, p. 1–8, 1967.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GTEX. Genotype-Tissue Expression. Disponível em: <http://www.gtexportal.org/home/>. Acesso em: 22 fevereiro 2019

GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology*, v. 42, p. 421–427, 2012.

GUNDRÁ, U. M.; GIRGIS, N. M.; RUCKERL, D.; JENKINS, S.; WARD, L. N.; KURTZ, Z. D.; WIENS, K. E.; TANG, M. S.; BASU-ROY, U.; MANSUKHANI, A.; ALLEN, J. E.; LOKE, P. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*, v. 123, n. 20, p. e110–e122, 2014.

GUO, X.; BOOTH, C. J.; PALEY, M. A.; WANG, X.; DEPONTE, K.; FIKRIG, E.; NARASIMHAN, S.; MONTGOMERY, R. R. Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infection and immunity*, v. 77, n. 6, p. 2320–2329, 2009.

GURAO, A.; KASHYAP, S. K.; SINGH, R. β -defensins: An innate defense for bovine mastitis. *Veterinary World*, v. 10, n. 8, p. 990–998, 2017.

HAJNICKÁ, V.; VANCOVA, I.; KOČÁKOVÁ, P.; SLOVAK, M.; GASPERIK, J.; SLAVIKOVA, M.; HAILS, R. S.; LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology*, v. 130, p.333-342, 2005.

HAJNICKÁ, V.; VANČOVÁ-ŠTIBRÁNIOVÁ, I.; SLOVÁK, M.; KOČÁKOVÁ, P.; NUTTALL, P. A. Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *International Journal for Parasitology*, v. 41, n. 2, p. 213–223, 2011.

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 burgdorferi* transmission. *Immunology*, v. 113, n. 3, p. 401-8, 2004.

HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J.M.; BOWMAN, A.S. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunology*, v. 25, n. 1, p. 27-37, 2003.

HASHIMOTO, R.; KAKIGI, R.; NAKAMURA, K.; ITOH, S.; DAIDA, H.; OKADA, T.; KATOH, Y. LPS enhances expression of CD204 through the MAPK/ERK pathway in murine bone marrow macrophages. *Atherosclerosis*, v. 266, p. 167-175, 2017.

HAY, E. H. A.; UTSUNOMIYA, Y. T.; XU, L.; ZHOU, Y.; NEVES, H. H. R.; CARVALHEIRO, R.; BICKHART, D. M.; MA, L.; GARCIA, J. F.; LIU, G. E. Genomic predictions combining SNP markers and copy number variations in Nelore cattle. *BMC Genomics*, v. 19, n. 1, p. 441, 2018.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, p. 978–985, 2013.

HIDANO, A.; KONNAI, S.; YAMADA, S.; GITHAKA, N.; ISEZAKI, M.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H.; ITO, T.; TAKANO, A.; ANDO, S.; KAWABATA, H.; MURATA, S.; OHAHSI, K. Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 466–474, 2014.

HOOGSTRAAL, H.; WASSEF, H. Y. *Dermacentor (Indocentor) Atrosignatus* (Acari, Ixodoidea, Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo, and Southern Philippines. *Journal of Medical Entomology*, v. 22, n. 6, p. 644–647, 1985.

HORNAB, F.; SANTOS, P. C. DOS; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva.

Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 384, n. 1, p. 68–73, 2000.

HOURCADE, D. E.; AKK, A. M.; MITCHELL, L. M.; ZHOU, H. .; HAUHART, R.; PHAM, C. T. N. Anti-complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Molecular Immunology*, v. 69, p. 62–69, 2016.

HOWELL, J. M.; UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 10, p. 3155–3159, 2007.

HSI, L. C.; HOGANSON, C. W.; BABCOCK, G. T.; SMITH, W. L. Characterization of a tyrosyl radical in prostaglandin endoperoxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 202, p. 1592-1598, 1994.

HSU, D. C.; O'CONNELL, R J. Progress in HIV vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 13, n. 5, p.1018-1030, 2017.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T., LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*,v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.

HUSSEN, J.; DÜ VEL, A.; SANDRA, O.; SMITH, D.; SHELDON, I. M.; ZIEGER, P.; SCHUBERTH, H. J.; RENUKARADHYA, G. J. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e71502, 2013.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015. Disponível em <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>.

Acesso em: 10 fevereiro 2019.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro. p. 37, 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/6d3123bbf5f78aa3492c41003c7a38f6.pdf>. Acesso em: 13 janeiro 2019.

Illumina. Disponível em: <<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/2-channel-sbs.html>>. Acesso em: 23 fevereiro 2019

ISHIKAWA, R.; KAJIKAWA. M.; ISHIDO S. Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cells. *International Immunology*, v. 26, n. 5, p. 283-9, 2014.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 1–22, 2014.

JABLONKA, W.; KOTSYFAKIS, M.; MIZURINI, D. M.; MONTEIRO, R. Q.; LUKSZO, J.; DRAKE, S. K.; RIBEIRO, J. M.C.; ANDERSEN, J. F. Identification and mechanistic analysis of a novel tick-derived inhibitor of thrombin. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0133991, 2015.

JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. *Experimental Parasitology*, v. 96, n. 4, p. 213-21, 2000.

JAWORSKI, D. C.; JASINSKAS, A.; METZ, C. N.; BUCALA, R.; BARBOUR, A. G. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Molecular Biology*, v. 10, n. 4, p. 323–331, 2001.

JEON, Y.J.; JO, M.G.; YOO, H.M.; HONG, S.H.; PARK, J.M.; KA, S.H.; OH, K.H.; SEOL, J.H.; JUNG, Y.K.; CHUNG, C.H. Chemosensitivity is controlled by p63

modification with ubiquitin-like protein ISG15. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, p. 2622–2636, 2012.

JI, J.; UPADHYAY, S.; XIONG, X.; MALMLÖF, M.; SANDSTRÖM, T.; GERDE, P.; PALMBERG, L. Multi-cellular human bronchial models exposed to diesel exhaust particles: assessment of inflammation, oxidative stress and macrophage polarization. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 15, n. 1, p. 19, 2018.

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

JOSHI-TOPE, G.; GILLESPIE, M.; VASTRIK, I.; D'EUSTACHIO, P.; SCHMIDT, E.; DE BONO, B.; JASSAL, B.; GOPINATH, G.; R.; WU, G.; R.; MATTHEWS, L.; LEWIS, S.; BIRNEY, E.; Stein, L. Reactome: a knowledgebase of biological pathways, *Nucleic Acids Research*, v. 33, p. D428–D432, 2005.

KAGAN, J. C.; MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, v. 125, n. 5, p. 943–55, 2007.

KAGAN, J. C.; SU, T.; HORNG, T.; CHOW, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature Immunology*, v. 9, n. 4, p. 361–8, 2008.

KANNOUCHE, P.L.; WING, J.; LEHMANN, A.R. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular Cell*, v. 14, p. 491–500, 2004.

KARIN, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, v. 18, n.49, p. 6867–74, 1999.

KASHINO, S. S.; RESENDE, J.; SACCO, A. M. S.; ROCHA, C.; PROENCA, L.; CARVALHO, W. A.; FIRMINO, A. A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J.; DE MIRANDA SANTOS, IK. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, v.110, p.12–21, 2005.

KAUFMAN, W. R. Actions of some transmitters and their antagonists on salivary secretion in a tick. *The American Journal of Physiology*, v. 235, n. 1, p. R76–81, 1978.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitology today (Personal ed.)*, v. 5, n. 2, p. 47–56, 1989.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, v. 11, p.115–122, 1999.

KEMP, D. H.; BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae—studies in vivo and in vitro. *Parasitology*, v. 80, p. 487–496, 1980.

KITANO, H. Systems biology: a brief overview. *Science*, v. 295, n. 5560, p. 1662–1664, 2002.

KNOLHOFF, L. M.; ONSTAD D. W. Resistance by Ectoparasites. In: ONSTAD D. W. (Org.). *Insect Resistance Management*. 2. ed. Massachusetts: Academic Press, 2014. Cap. 6, p. 185–231.

KNUBBEN-SCHWEIZER, G.; PFISTER, K. Anthelmintic resistance in ruminants: development, diagnostics, and procedures. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. v. 45, n. 4, p. 244–251, 2017.

KOBAYASHI, K.; HERNANDEZ, LD.; GALAN, JE.; JANEWAY, C. A JR.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 191–202, 2002

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*. *International Journal for Parasitology*, v. 40, p. 499–507, 2010.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVA, C. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 4, p. 169–74, 1998.

KOTÁL, J.; LANGHANSOVÁ, H.; LIESKOVSKÁ, J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.B.; CHAVAKIS, T.; KOPECKÝ, J.; PEDRA, J. H.F.; KOTSYFAKIS, M.; CHMELAR, J. Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, v. 128, p. 58–68, 2015.

KRAMER, C. D.; POOLE, N. M.; COONS, L. B.; COLE, J. A. Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Experimental Parasitology*, v. 127, p. 665–671, 2011.

KRAMER, C.; NAHMIAS, Z.; NORMAN, D. D.; MULVIHILL, T. A.; COONS, L. B.; COLE, J. A. *Dermacentor variabilis*: Regulation of fibroblast migration by tick salivary gland extract and saliva. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 3, p. 391–397, 2008.

KRAUSGRUBER, T.; BLAZEK, K.; SMALLIE, T.; ALZABIN, S.; LOCKSTONE, H.; SAHGAL, N.; HUSSELL, T.; FELDMANN, M.; UDALOVA, I. A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature Immunology*, v. 12, n. 3, p. 231–8, 2011.

KUBES, M.; FUCHSBERGER, N.; LABUDA, M.; ZUFFOVÁ, E.; NUTTALL, P. A. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology*, v. 82, p. 113–116, 1994.

KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, p. 951–969, 2015.

KUMARA, B.; MANJUNATHACHAR, H.V.; NAGAR, G.; RAVIKUMAR, G.; DE LA FUENTE, J.; SARAVANAN, B.C.; GHOSH S. Functional characterization of candidate antigens of *Hyalomma anatolicum* and evaluation of its cross-protective efficacy against *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*, V. 35, n. 42, p. 5682–5692, 2017.

KUO, M. M.; KIM, S.; TSENG, C. Y.; JEON, Y. H.; CHOE, S.; LEE, D. K. BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials*, v. 35, p. 3172–3179, 2014.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*. v. 4, p. 211–222, 2004.

KUTHEJLOVÁ, M.; Kopecký, J.; Štěpáková, G.; Macela, A. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

KYCKOVA, K.; KOPECKY, J. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J Med Entomol*, v. 43, n. 6, p. 1208–1214, 2006.

LAARMAN, A. H.; RUIZ-SANCHEZ, A.L.; SUGINO, T.; GUAN, L.L.; OBA, M. Effects of feeding a calf starter on molecular adaptations in the ruminal epithelium and liver of Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 5, p. 2585–2594, 2012.

- LEE, B. Resistant cattle for tick control. Rural Research, 1979.
- LEE, D. G.; AHSAN, N.; LEE, S. H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D.; LEE, I. J. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *PROTEOMICS*, v. 7, n. 18, p. 3369–3383, 2007.
- LÉVESQUE, A.; GAGNON-CARIGNAN, S.; LACHANCE, S. From low- to high-throughput analysis. *Bioanalysis*, v.8, n. 2, p. 135-41, 2016.
- LEVY, S.; SUTTON, G.; NG, P. C.; FEUK, L.; HALPERN, A. L.; WALENZ, B. P.; AXELROD, N.; HUANG, JR; KIRKNESS, E. F.; DENISOV, G.; LIN, Y.; MACDONALD, R.; PANG, A. W.; SHAGO, M.; STOCKWELL, T. B.; TSIAMOURI, A.; BAFNA, V.; BANSAL, V.; KRAVITZ, S. A.; BUSAM, D. A.; BEESON, K. Y.; MCINTOSH, T. C.; REMINGTON, K. A.; ABRIL, J. F.; GILL, J.; BORMAN, J.; ROGERS, Y. H.; FRAZIER, M. E.; SCHERER, S. W.; STRAUSBERG, R. L.; VENTER, J. C. The diploid genome sequence of an individual human. *PLOS Biology*, v. 5, n. 10, p. e254, 2007.
- LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P. M.; VANCE, M.E.; KURSCHEID, S.; VALLE, M. R.; JARRETT, S.; MINCHIN, C. M.; JACKSON, L. A.; JONSSON, N. N.; BELLGARD, M. I.; GUERRERO, F. D. Suppressive subtractive hybridization analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval and adult transcript expression during attachment and feeding. *V*. 167, p. 304-20, 2010.
- LI, P.; ALLEN, H.; BANERJEE, S.; FRANKLIN, S.; HERZOG, L.; JOHNSTON, C.; MCDOWELL, J.; PASKIND, M.; RODMAN, L.; SALFELD, J. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*, 1995.
- LIN, S. C.; LO, Y. C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, v. 465, p. 885–890, 2010.
- LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 2, p. 1–8, 2012.
- LIU, X. Y. DE LA FUENTE, J.; COTE, M.; GALINDO, R. C.; MOUTAILLER, S.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BONNET, S. I.; VINETZ, J. M. IrSPI, a Tick serine protease inhibitor involved in tick feeding and *Bartonella henselae* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 7, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. Embrapa Caprinos e Ovinos Documentos (INFOTECA-E), Sobral, 2014.
- LOEB, L. A.; MONNAT, R. J. JR. DNA polymerases and human disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, p. 594–604, 2008.
- LU, X.; YANG, J.; WU, H.; YANG, Z.; JIN, C.; WANG, J.; CHENG, L.; PENG, X.; LIU, F.; PENG, X.; JI, S.; OU, H.; XIE, T.; YAO, H.; WU, N. High-throughput sequencing identifies HIV-1-replication- and latency-related miRNAs in CD4+ T cell lines. *Archives of Virology*. v. 162, n. 7, p.1933-1942, 2017.
- MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 2334, 2003.
- MACEDO, A. A.; COSTA, E. A.; SILVA, A. P.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R L. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle

(*Bos taurus taurus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 151, n. 3-4, p. 294-302, 2013.

MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G.; DE FREITAS, C.; PRATA, M. C.; FURLONG, J.; DA SILVA, M. V.; GUIMARÃES, S. E.; REGITANO, L. C.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*BOS TAURUS X BOS INDICUS*). *BMC GENOMICS*, v. 11, n. 280, 2010.

MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, v. 146, n. 3, p. 1071–1086, 1997.

MACKINNON, M. J.; MEYER, K.; HETZEL, D. J. S. Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. *Livestock Production Science*, v. 27, p. 105-122, 1991.

MANJUNATHACHAR, H. V.; SARAVANAN, B. C.; KESAVAN, M.; KARTHIK, K.; RATHOD, P.; GOPI, M.; TAMILMAHAN, P.; BALARAJU, B. L. Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 4, n. Suppl 2, p. S770–S779, 2014.

MANNING, A. M.; BELL, F. P.; ROSENBLOOM, C. L.; CHOSAY, J. G.; SIMMONS, C. A.; NORTHRUP, J. L.; SHEBUSKI, R. J.; DUNN, C. J.; ANDERSON, D. C. NF-kappa B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *Journal of Inflammation*, v. 45, n. 4, p. 283–96, 1995.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. VALOR BRUTO DA PRODUÇÃO - LAVOURAS E PECUÁRIA - BRASIL (agosto/2017), 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>> Acesso em: 11 agosto 2017.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Projeções do Agronegócio : Brasil 2017/18 a 2027/28. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília : MAPA/ACE, 2018. 112 p.

MAPHOLI, N. O.; MAIWASHE, A.; MATIKA, O.; RIGGIO, V.; BISHOP, S. C.; MACNEIL, M. D.; BANGA C, TAYLOR JF, DZAMA K. Genome-wide association study of tick resistance in South African Nguni cattle. *Ticks Tick Borne Disease*, v. 7, p. 487–497, 2016.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*, v. 13, p. 453–461, 2008.

MARTINON, F., MAYOR, A., TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 229–265, 2009.

MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; TEIXEIRA, F. R.; BRANDÃO, L. G.; ANDERSON, J. M.; RIBEIRO, J. M. C.; VALENZUELA, J. G.; HORACKOVA, J.; VERÍSSIMO, C. J.; KATIKI, L. M.; BANIN, T. M.; ZANGIROLAMO, A. F.; GARDINASSI, L. G.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasit Vectors*, v. 10, n. 1, p. 206, 2017.

MASOODI, M.; KUDA, O.; ROSSMEISL, M.; FLACHS, P.; KOPECKY, J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1851, n. 4, p. 503-18, 2015.

MATSUDA, T.; BEBENEK, K.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; KUNKEL, T.A. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- ϵ . *Nature*, v. 404, p. 1011–1013, 2000.

MATTHEWSON, M. D.; WILSON, R. G.; HAMMANT, C. A. The development of resistance to certain organophosphorus and carbamate ixodicides by the blue tick, *Boophilus decoloratus* (Koch) (Acarina, Ixodidae), in Rhodesia. *Bulletin of Entomological Research*, v. 66, n. 4, p. 553, 1976.

MATTIOLI, R. C.; PANDEY, V. S.; MURRAY, M.; FITZPATRICK, J. L. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. *Acta Tropica*, v. 75, n.3, p.263-77, 2000.

MEHAN, M. R.; OSTROFF, R.; WILCOX, S. K.; STEELE, F.; SCHNEIDER, D.; JARVIS, T. C.; BAIRD, G. S.; GOLD, L.; JANJIC, N. Highly multiplexed proteomic platform for biomarker discovery, diagnostics, and therapeutics. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 735, p. 283–300, 2013.

MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4+T to induce Th2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. *International Immunology*, v. 19, n. 4, p. 535–543, 2007.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*. v. 8, p. 935–947, 2008.

MILLER, R. J.; ALMAZÁN, C.; ORTÍZ-ESTRADA, M.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; PERÉZ DE LEÓN, A. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*, v. 191, p. 97–101, 2013.

MILLS, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Critical Reviews in Immunology*, v. 21, n. 5, p. 28, 2001.

MILLS, C. D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. 212, p. 1–12, 2015.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.

MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators of Inflammation*. v. 2016 p. 6978936, 2016.

MORAN, M. M. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, .v. 58, p. 309–30, 2018.

MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C. D.; TIANO, H. F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J. C.; MAHLER, J. F.; KLUCKMAN, K. D.; LEDFORD, A.; LEE, C. A.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, v. 83, n. 3, p. 473-82, 1995.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Genetics*, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOTA, R. R.; SILVA, F.F.; LOPES, P.S.; TEMPELMAN, R.J.; SOLLERO, B.P.; AGUILAR, I.; CARDOSO, F.F. Analyses of reaction norms reveal new chromosome regions associated with tick resistance in cattle. *Animal*, p. 1–10, 2017.

MOTSHWENE, P. G.; MONCRIEFFE, M. C.; GROSSMANN, J. G.; KAO, C.; AYALURU, M.; SANDERCOCK, A. M.; CAROL, V.; ROBINSON, C.; LATZ, E.; GAY, N. J. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal

transducers MyD88 and IRAK-4. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 25404–25411, 2009.

MURPHY, P. M. International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacological Reviews*, v. 54, p. 227-9, 2002.

MURRAY, P. J. e WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, v. 56, p. 169–172, 2003.

MUZIO, M.; NI, J.; FENG, P.; DIXIT, VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, v. 278, n. 5343, p. 1612-5, 1997.

NARI, A.; HANSEN, J. W. Resistance Of Ecto- and Endoparasites: Current and Future Solutions. 67th General Session. International Committee. Anais...Paris: OIE, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*. v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NESTLE, F. O., DI MEGLIO, P., QIN, J.-Z., NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. v. 9, p. 679–691, 2009.

NEWMAN, A. W.; MILLER, A.; YEPES, F. A. L.; BITSKO, E.; NYDAM, D.; MANN, S. The effect of the transition period and postpartum body weight loss on macrophage infiltrates in bovine subcutaneous adipose tissue. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 2, p. 1-9, 2019.

NIKPAY, A.; NABIAN, S. Immunization of cattle with tick salivary gland extracts. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, v. 10, n. 3, p. 282–291, 2016.

NORIMINE, J.; BROWN, W. C. Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4(+) T-lymphocyte responses. *Immunogenetics*, v. 57, n. 10, p. 750-62, 2005.

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

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R.; LIU, Z. Z.; MORRIS, S. M. JR. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 2, p.1257-61, 1994.

O'KELLY, J. C.; SPIERS, W. G. Resistance in to *Boophilus microplus* (canestrini) in genetically different types of calves in early life. *The Journal of Parasitology*, v. 62, n. 2, p. 312–317, 1976.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2019. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>> acesso em: 09 fevereiro 2019.

OLIVEIRA, C. J. F.; CAVASSANI, K. A.; MORÉ, D. D.; GARLET, G. P.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *International Journal for Parasitology*, v. 38, p. 705–716, 2008.

OLIVEIRA, C. J.; SÁ-NUNES, A.; FRANCISCHETTI, I. M.; CARREGARO, V.; ANATRIELLO, E.; SILVA, J. S.; SANTOS, I. K.; RIBEIRO, J. M.; FERREIRA, B. R. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *The Journal of biological chemistry*, v. 286, n.13, p. 10960-9, 2011.

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

OLIVEIRA, G. P. DE; ALENCAR, M. M. Resistência de Bovinos de Seis Graus de Sangue Holandês-Guzerá ao Carrapato (*Boophilus microplus*) e ao Berne (*Dermatobia hominis*). *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 42, n. 2, p. 127–35, 1990.

OLIVEIRA, L. J.; MCCLELLAN, S.; HANSEN, P. J. Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow. *PLoS ONE*, v. 5, n. 10, p. e13213, 2010.

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

OLTVAI, Z. N.; BARABASI, A. L. Systems biology. Life's complexity pyramid. *Science*, v. 298, n. 5594, p763–764, 2002.

ORR, J. S.; PUGLISI, M. J.; ELLACOTT, K. L.; LUMENG, C. N.; WASSERMAN, D. H.; HASTY, A. H. Tolllike receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes*, v. 61, p. 2718–27, 2012.

OTTO, P. I.; GUIMARÃES, S. E. F.; VERARDO, L. L.; AZEVEDO, A. L. S.; VANDENPLAS, J.; SOARES, A. C. C.; SEVILLANO, C. A.; VERONEZE, R.; PIRES, M. F. A.; FREITAS, C.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; VERNEQUE, R. S.; MARTINS, M. F.; PANETTO, J. C. C.; CARVALHO, W. A.; GOBO, D. O. R.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A. Genome-wide association studies for tick resistance in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle: A deeper look into this intricate mechanism. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 12, p. 11020-11032, 2018.

PÁLENÍKOVÁ, J.; LIESKOVSKÁ, J.; LANGHANSOVÁ, H.; KOTSYFAKIS, M.; CHMELAŘ, J.; KOPECKÝ, J. *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway. *Infection and Immunity*, v. 83, p. 1949–1956, 2015.

PALFRAMAN, R.T.; JUNG, S.; CHENG, G.; WENINGER, W.; LUO, Y.; DORF, M.; LITTMAN, D.R.; ROLLINS, B.J.; ZWEERINK, H.; ROT, A.; AND VON ANDRIAN, U.H. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 194, p. 1361–1373, 2001.

PARK, J. M.; YANG, S. W.; YU, K. R.; KA, S. H.; LEE, S.W.; SEOL, J. H.; JEON, Y. J.; CHUNG, C. H. Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis. *Molecular Cell*, v. 54, p. 626-38, 2014.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, p. 289–301, 2014.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. In: Editora Med Vet, Sao Paulo, Brasil, 2008.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression

programa tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 9, 2002.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; JONSSON, N. N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology*, v. 40, p. 865–875, 2010.

PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M. E.; JACKSON, L. A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n. 7, p. 1074–1086, 2009.

PLÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZECKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Science*, v. 72, p. 557–581, 2015.

POLLOCK, N.; TAYLOR, G.; JOBE, F.; GUZMAN, E. Modulation of the transcription factor NF- κ B in antigenpresenting cells by bovine respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of General Virology*, v. 98, p. 1587–1599, 2017.

PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARENDSE, W. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. *Animal Genetics*, v. 42, p. 50–55, 2011a.

PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; PRAYAGA, K. C.; BARENDSE, W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. *BMC Genetics*, v. 11, p. 55, 2010.

PORTO NETO, L. R.; JONSSON, N. N.; D'OCCHIO, M. J.; BARENDSE, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 180, p.165–17, 2011b.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control. *Queensland Agricultural Journal*, v. 12, n. 6, p. 279–300, 1982.

PRAYAGA, K. C.; CORBET, N. J.; JOHNSTON, D. J.; WOLCOTT, M. L.; FORDYCE, G.; AND BURROW, H. M. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. *Animal Production Science*, v. 49, p. 413–425, 2009.

PROUDFOOT, A. E.; HANDEL, T. M.; JOHNSON, Z.; LAU, E. K.; LIWANG, P.; CLARK-LEWIS, I.; BORLAT, F.; WELLS, T. N.; KOSCO-VILBOIS, M. H. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *PNAS*, v. 100, p. 1885-90, 2003.

RAJPUT, Z. I.; HU, S.; CHEN, W.; ARIJO, A. G.; XIAO, C. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v. 7, n. 11, p. 912–921, 2006.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of Medical Entomology*, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E.; DELLAGOSTIN, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian Journal of Biology*, v. 75, n. 4, p. 830-7, 2015.

RATH, M.; MÜLLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 532, 2014.

REED, J. L.; FAMILI, I.; THIELE, I.; PALSSON, B. O. Towards multidimensional genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 2, p. 130–141, 2006.

REGITANO, L. C. A.; IBELLI, A. M. G.; GASPARIN, G.; MIYATA, M.; AZEVEDO, A. L. S.; COUTINHO, L. L.; TEODORO, R. L.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V.; NAKATA, L. C.; ZAROS, L. G.; SONSTEGARD, T. S.; SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; OLIVEIRA, M. C. On the search for markers of tick resistance in bovines. *Developmental Biology*, v. 132, p. 225–230, 2008.

RIBEIRO, J. C.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology*, v. 70, n. 4, p. 382–388, 1990.

RIBEIRO, J. M. C. How ticks make a living. *Parasitology Today*. v. 11, p. 91–93, 1995.

RICHARDS, S. A.; STUTZER, C.; BOSMAN, A. M.; MARITZ-OLIVIER, C. Transmembrane proteins - Mining the cattle tick transcriptome. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n. 6, p. 695–710, 2015.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, v. 26, p. 139-140, 2010.

ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do carrapato *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887), 1999.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on dairy farm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.

RODRÍGUEZ, P. B. R.; ROSARIO, CRUZ R.; DOMÍNGUEZ, GARCÍA, D. I.; HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, R.; LAGUNES QUINTANILLA, R. E.; ORTUÑO SAHAGÚN, D.; GONZÁLEZ CASTILLO, C.; GUTIÉRREZ ORTEGA, A.; HERRERA RODRÍGUEZ, S. E.; VALLEJO CARDONA, A.; MARTÍNEZ VELÁZQUEZ, M. Identification of immunogenic proteins from ovarian tissue and recognized in larval extracts of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, through an immunoproteomic approach. *Experimental Parasitology*, v. 170, p. 227-235, 2016.

RODRIGUEZ-VALLE, M.; XU, T.; KURSCHEID, S.; LEW-TABOR, A. E. *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 7, 2015.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; LI, A. Y.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; MILLER, R. J.; PÉREZ DE LEÓN, A.A. In vitro and in vivo evaluation of cypermethrin, amitraz, and piperonyl butoxide mixture s for the control of resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n.1–2, p. 288–296, 2013.

ROTHER, J.; LESSLAUER, W.; LÖTSCHER, H.; LANG, Y.; KOEBEL, P.; KÖNTGEN, F.; ALTHAGE, A.; ZINKERNAGEL, R.; STEINMETZ, M.; BLUETHMANN, H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, v. 364, n. 6440, p. 798-802, 1993.

RYAN, K. A.; SMITH, M. F. JR.; SANDERS, M. K.; ERNST, P. B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, p. 2123-30, 2004.

RYSECK, R.P.; RAYNOSCHECK, C.; MACDONALD-BRAVO, H.; DORFMAN, K.; MATTEI, M.G.; AND BRAVO, R. Identification of an immediate early

gene, pgbs-B, whose protein product has prostaglandin synthase cyclooxygenase activity. *Cell Growth & Differentiation*, v. 3, p. 443-450, 1992.

SAEED, R. W.; VARMA, S.; PENG-NEMEROFF, T.; SHERRY, B.; BALAKHANEH, D.; HUSTON, J.; TRACEY, K. J.; AL-ABED, Y.; METZ, C. N. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, p. 1113–1123, 2005.

SALDARRIAGA, O. A.; VELÁSQUEZ, J. I.; OSSA, J.E E.; RUGELES, M. T. Standardization of bovine macrophage monolayers and isolation and culture of trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 2, p. 269–271, 2003.

SALE, J. E.; LEHMANN, A. R.; WOODGATE, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 141–152, 2012.

SAUER, J. R. Acarine salivary glands -Physiological relationships. *Journal of Medical Entomology*, v.14, p.1–9, 1977.

SCHATZ, V.; STRÜSSMANN, Y.; MAHNKE, A.; SCHLEY, G.; WALDNER, M.; RITTER, U.; WILD, J.; WILLAM, C.; DEHNE, N.; BRÜNE, B.; MCNIFF, J.M.; COLEGIO, O.R.; BOGDAN, C.; JANTSCH, J. Myeloid cell-derived HIF-1 α promotes control of *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*. v. 197, p. 4034–4041, 2016.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, v.31, 2006.

SCHROEDER, H.; SKELLY, P. J.; ZIPFEL, P. F.; LOSSON, B.; VANDERPLASSCHEN, A. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 33, n. 1, p. 5–13, 2009.

SCHULZ, T. J.; HUANG, P.; HUANG, T. L.; XUE, R.; MCDOUGALL, L. E.; TOWNSEND, K. L.; CYPESS, A. M.; MISHINA, Y.; GUSSONI, E.; TSENG, Y. H. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, v. 495, p. 379–383, 2013.

SEAPA. SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Valor bruto da produção (vbp) agropecuário. 2019. Disponível em < [http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/vbp_01_2019\[1\].pdf](http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/vbp_01_2019[1].pdf)> Acesso em: 19 janeiro 2019

SECKINGER, P.; LOWENTHAL, J.W.; WILLIAMSON, K.; DAYER, J.M.; MACDONALD, H.R. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *The Journal of Immunology*, v. 139, p. 1546–1549, 1987.

SEDIC, M.; PAVELIC, S. K.; HOCK, K. Using Functional Genomics to Identify Drug Targets: A Dupuytren's Disease Example. *Methods in Molecular Biology*, v. 910, p. 15–31, 2012.

SEELEY, J. J.; GHOSH, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 101, n. 1, p. 107-119, 2017.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, v. 23, p.197–223, 2005.

SEU, K. G.; PAPOIN, J.; FESSLER, R.; HOM, J.; HUANG, G.; MOHANDAS, N.; BLANC, L.; KALFA, T. A. Unraveling Macrophage Heterogeneity in Erythroblastic Islands. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1140, 2017.

SHAW, M. H.; REIMER, T.; KIM, Y. G.; NUNEZ, G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Current Opinion in Immunology*, v. 20, n. 4, p. 377–82, 2008.

SILVA, N. C. S.; VALE, V. F.; FRANCO, P. F.; GONTIJO, N. F.;

VALENZUELA, J. G.; PEREIRA, M. H.; SANT'ANNA, M. R. V.; RODRIGUES, D. S.; LIMA, W. S.; FUX, B.; ARAUJO, R. N. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 445, 2016.

ŠIMO, L.; KAZIMIROVA, M.; RICHARDSON, J.; BONNET, S. I. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 281, 2017.

SKALLOVÁ, A.; IEZZI, G.; AMPENBERGER, F.; KOPF, M.; KOPECKY, J. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *Journal of immunology*, v. 180, p. 6186–6192, 2008.

SLOVÁK, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I.; HAJNICKÁ, V.; NUTTALL, P. A. Antiplatelet-derived growth factor (PDGF) activity in the saliva of ixodid ticks is linked with their long mouthparts. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 1, p. 32–42, 2014.

SOLLERO, B. P.; JUNQUEIRA, V. S.; GOMES, C. C. G.; CAETANO, A. R.; CARDOSO, F. F. Tag SNP selection for prediction of tick resistance in Braford and Hereford cattle breeds using Bayesian methods. *Genetics Selection Evolution*, v. 49, p. 49, 2017.

SOPP, P.; KWONG, L. S.; HOWARD, C. J. Identification of bovine CD14. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 52, n. 4, p. 323-8, 1996.

SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*, v. 267, n. 2, p. 271–285, 2008.

STROBER W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, v. 111, p. A3.B.1-3, 2015.

SUFFREDINI, A.F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J.J.; O'GRADY, N.P. New insights into the biology of the acute phase response. *Journal Clinical of Immunology*, v. 19, p. 203–214, 1999.

SULLIVAN, G. P.; HENRY, C. M.; CLANCY, D. M.; MAMETNABIEV, T.; BELOTCKEROVSKAYA, E.; DAVIDOVICH, P.; SURATRUEBA, S.; GARABADZHIU, A. V.; MARTIN, S. J. Suppressing IL-36-driven inflammation using peptide pseudosubstrates for neutrophil proteases. *Cell Death & Disease*, v.9, n. 3, p. 378, 2018.

SUN, T.; WANG, F.; PAN, W.; WU, Q.; WANG, J.; DAI, J. An Immunosuppressive Tick Salivary Gland Protein DsCystatin Interferes With Toll-Like Receptor Signaling by Downregulating TRAF6. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1245, 2018.

SUNDERKÖTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M.J.; VAN ROOIJEN, N.; STEHLING, M.; DREVETS, D.A.; AND LEENEN, P.J.M. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *The Journal of Immunology*, v. 172, p. 4410–4417, 2004.

SUTHERST, R. W.; BOURNE, A. S. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, v. 36, n. 2, p. 193–200, 2006.

TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 506, 2017.

TAN, R. Z.; LIU, J.; ZHANG, Y. Y.; WANG, H. L.; LI, J. C.; LIU, Y. H.; ZHONG, X.; ZHANG, Y. W.; YAN, Y.; LAN, H. Y.; WANG, L. Curcumin relieved cisplatin-induced kidney inflammation throughinhibiting Mincle-maintained M1 macrophage phenotype. *Phytomedicine*. v. 52, p. 284-294, 2019.

TANIMURA, N.; SAITOH, S.; MATSUMOTO, F.; AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 368, p. 94–99, 2008.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v. 23, p. 901–944, 2005.

TEMEYER, K. B.; TUCKOW, A. P. Tick Salivary Cholinesterase: A Probable Immunomodulator of Host–parasite Interactions. *Journal of Medical Entomology*, v. 53, n. 3, p.500–504, 2016.

THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM; ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; et al. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science*, v. 324, n. 5926, p. 522–528, 2009.

THISTLETHWAITE, F. R.; RATCLIFFE, B.; KLÁPŠTĚ, J.; PORTH, I.; CHEN, C.; STOEHR, M. U.; EL-KASSABY, Y. A. Genomic selection of juvenile height across a single-generational gap in Douglas-fir. *Heredity (Edinb)*, 2019.

TIAN, Y.; CHEN, W.; MO, G.; CHEN, R.; FANG, M.; YEDID, G.; YAN, X. An immunosuppressant peptide from the hard tick *Amblyomma variegatum*. *Toxins*, v. 8, p. 133, 2016.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001.

TIRLONI, L.; KIM, T. K.; COUTINHO, M. L.; ALI, A.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C.; MULENGA, A.; DA SILVA VAZ, I. J. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 71, p. 12-28, 2016.

TODENHÖFER, T.; MIERNIK, A.; SEILER, R. High-throughput molecular analysis of urothelial carcinoma: potential clinical applications. *Aktuelle Urologie*, v. 50, n. 1, p.84-93, 2019.

TOKARZ, P.; PŁOSZAJ, T.; REGDON, Z.; VIRÁG, L.; ROBASZKIEWICZ, A. PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human proinflammatory macrophages from death under an oxidative condition. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 131, p. 218-224, 2019.

TORPIER, G.; CAPRON, A.; OUAISSI, M. A. Receptor for IgG(Fc) and human beta2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. *Nature*, v. 278, n. 5703, p. 447-9, 1979.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, I. W.; HARIRI, R. J.; FAHEY, T. J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J. D. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, v. 234, n. 4775, p. 470-4, 1986.

TRAGER, W. Further Observations on Acquired Immunity to the Tick *Dermacentor variabilis* Say. *The Journal of Parasitology*, v. 25, n. 2, p. 137, 1939.

TSAI, Y. C.; CHANG, H. W.; CHANG, T. T.; LEE, M. S.; CHU, Y. T.; HUNG, C. H. Effects of all-trans retinoic acid on Th1- and Th2-related chemokines production in monocytes. *Inflammation*, v. 31, n. 6), p. 428-33, 2008.

TSENG, Y. H.; KOKKOTOU, E.; SCHULZ, T. J.; HUANG, T. L.; WINNAY, J. N.; TANIGUCHI, C. M.; TRAN, T. T.; SUZUKI, R.; ESPINOZA, D. O.; YAMAMOTO,

Y.; AHRENS, M. J.; DUDLEY, A. T.; NORRIS, A. W.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C. R. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, v. 454, p. 1000–1004, 2008.

TUGAL, D.; LIAO, X.; JAIN, M. K. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 33, n. 6, p. 1135–1144, 2013.

TUNCEL, J.; HAAG, S.; HOLMDAHL, R. MHC class II alleles associated with Th1 rather than Th17 type immunity drive the onset of early arthritis in a rat model of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, v. 47, n. 3), p. 563–574, 2017.

TURNER, L. B.; HARRISON, B. E.; BUNCH, R. J.; NETO, L. R. P.; LI, Y.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of tick burden and milk composition in cattle. *Animal Production Science*, v. 50, p. 235–245, 2010.

UMEMIYA, R.; HATTA, T.; LIAO, M.; TANAKA, M.; ZHOU, J.; INOUE, N.; FUJISAKI, K. *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. *Experimental Parasitology*, v. 115, p. 135–142, 2007.

UNANUE, E. R. Antigen Presentation Via MHC Class II Molecules. In: DELVES, P. J. (Org.). *Encyclopedia of Immunology*. 2. ed. Londres: Elsevier, 1998. v. 1, p. 194–198.

URIOSTE, B. S.; HALL, L. R.; TELFORD III, S. R.; TITUS, R. G. Saliva of the lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 180, p. 1077–1085, 1994.

USDA. U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and Poultry: World Markets and Trad. [s.l: s.n.]. 11-10-2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 13 janeiro 2019.

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

VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; PHAM, V. MY; GARFIELD, M. K.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 2843–2864, 2002.

VALLE, M. R.; GUERRERO F. D. Anti-tick vaccines in the omics era. *Frontiers Bioscience*. v. 10, p. 122–136, 2018.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n.7, p. RESEARCH0034, 2002.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, London, v. 44, n. 5, p. 619–626, 2008.

VARBANOV, H. P.; KUTTLER, F.; BANFI, D.; TURCATTI, G.; DYSON, P.J. Screening-based approach to discover effective platinum-based chemotherapies for cancers with poor prognosis. *PLoS One*, v. 14, n.1, p. e0211268, 2019.

VAZ JUNIOR, I. DA S.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. In: SILVA-NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Eds.). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. p. 1–27.

VAZ, I.D.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; DE LIMA, M.F.R.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L.; MASUDA, A.; Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 331–341, 1998.

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

VILELLA, A. J.; SEVERIN, J.; URETA-VIDAL, A.; HENG, L.; DURBIN, R.; BIRNEY, E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Research*, v. 19, n. 2, p. 327–35, 2009.

VILLAR, M.; LÓPEZ, V.; AYLLÓN, N.; CABEZAS-CRUZ, A.; LÓPEZ, J. A.; VÁZQUEZ, J.; ALBERDI, P.; DE LA FUENTE, J. The intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* selectively manipulates the levels of vertebrate host proteins in the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasites & Vectors*, v. 9, p. 467, 2016.

VUDRIKO, P.; OKWEE-ACAI, J.; TAYEBWA, D. S.; BYARUHANGA, J.; KAKOOZA, S.; WAMPANDE, E.; OMARA, R.; MUHINDO, J. B.; TWEYONGYERE, R.; OWINY, D. O.; HATTA, T.; TSUJI, N.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; XUAN, X.; KANAMEDA, M.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, H. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 4, 2016.

WALADDE, S. M.; KEMP, D.H.; RICE, M.J. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *International Journal for Parasitology*. v. 9, p. 89–95, 1979.

WALKER, A.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; LATIF, A.A.; PEGRAM, R.G.; PRESTON, P.M. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Houten: Bioscience Reports, 2014.

WALKER, A. R. The arthropods of humans and domestic animals : a guide to preliminary identification. London : Chapman & Hall, 1994.

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

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v. 109, n. Pt 4, p. 525–30, 1994. Erratum in: *Parasitology*, v. 110, n. Pt 3, 363, 1995.

WANG, H.; NUTTALL, P.A. Immunoglobulin binding proteins in ticks: New target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 286–295, 1999.

WANG, J.; MASUKO, T.; UENO, H.; HOJO, H.; HASHIMOTO, Y. Derivation and application of monoclonal antibodies recognizing several epitopes on bovine serum albumin. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 172, n. 4, p. 345–53, 1994.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*. v. 5, p. 614, 2014.

WANG, S.; BAI, Y.; WENG, Y.; FAN, X.; HUANG, H.; ZHENG, F.; XU, Y.; ZHANG, F. Cinobufacini ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice through inhibiting M1 macrophage polarization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 368, n. 3, p.391–400, 2019a.

WANG, W.; WANG, H.; TANG, H.; GAN, J.; SHI, C.; LU, Q.; FANG, D.; YI, J.; FU, M. Genetic structure of six cattle populations revealed by transcriptome-wide SNPs and gene expression. *Genes Genomics*, v. 40, n. 7, p. 715–724, 2018.

WANG, X.; LUND, M. S.; MA, P.; JANSS, L.; KADARMIDEEN, H. N.; SU, G. Improving genomic predictions by correction of genotypes from genotyping by sequencing in livestock populations. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. v. 24, n.10, p. 8, 2019b.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics *Zh. Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WARD, L. D.; KELLIS, M. Interpreting non-coding variation in complex disease genetics *Lucas. Nature Biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 1095–1106, 2012.

WASALA, N. B.; JAWORSKI, D. C. *Dermacentor variabilis*: Characterization and modeling of macrophage migration inhibitory factor with phylogenetic comparisons to other ticks, insects and parasitic nematodes. *Experimental Parasitology*, v. 130, p. 232–238, 2012.

WASSEF, N. M.; RICHARDS, R. L.; HAYRE, M. D.; ALVING, C. R. Prostaglandin and thromboxane in liposomes: suppression of the primary immune response to liposomal antigens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 160, n. 2, p. 565-72, 1989.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling*, v. 3, n.105, p. cm1, 2010.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 22, n. 1, p. 409–37, 2006.

WHITTLE, A. J.; CAROBIO, S.; MARTINS, L.; SLAWIK, M.; HONDARES, E.; VÁZQUEZ, M. J.; MORGAN, D.; CSIKASZ, R. I.; GALLEGRO, R.; RODRIGUEZ-CUENCA, S.; DALE, M.; VIRTUE, S.; VILLARROYA, F.; CANNON, B.; RAHMOUNI, K.; LÓPEZ, M.; VIDAL-PUIG, A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, v. 149, p. 871–885, 2012.

WIDDERS, P. R.; PERRY, R.; MUIR, W. I.; HUSBAND, A. J.; LONG, K. A. Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *British Poultry Science*, v. 37, n. 4, p. 765-78, 1996.

WIGGANS, G. R.; COLE, J. B.; HUBBARD, S. M.; SONSTEGARD, T. S. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 5, p. 309-327, 2017.

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology*, v. 41, p. 1-22, 1996.

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

WIKEL, S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: Host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1–10, 2013.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 110, p.S43–S50, 1995.

WILLADSEN, P.; REDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunological control of a parasitic arthropod identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology*, v. 143, p. 1346–1351, 1989.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, v. 39, n. 1, p. 75–85, 2005.

WU, J. T.; WU, L. L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clinica Chimica Acta*, v. 366, p. 74-80, 2006.

WU, J.; WANG, Y.; LIU, H.; YANG, H.; MA, D.; LI, J.; LI, D.; LAI, R.; YU, H. Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 22, p. 16606–16613, 2010.

WU, L. J.; SWEET, T. B.; CLAPHAM, D. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological Reviews*, v. 62, p. 381-404, 2010.

XU, T.; LEW-TABOR, A.; RODRIGUEZ-VALLE, M. Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 1, p. 180–187, 2016.

XU, X. L.; CHENG, T. Y.; YANG, H.; YAN, F.; YANG, Y. *De novo* sequencing, assembly and analysis of salivary gland transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of sialoprotein genes. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 32, p. 135–142, 2015.

XUE, R.; WAN, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Q.; YE, H.; LI, Y. Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 306, p. E363–E372, 2014.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, v. 301, p. 640–643, 2003.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLETT, E.; FLEMING, M.D.; DO' TSCH, V.; ANDREWS, N.C.; CAPUT, D.; MCKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular Cell*, v. 2, p. 305–316, 1998.

YANG, S.; GAO, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Q.; SUN, D. Identification of Genetic Associations and Functional Polymorphisms of SAA1 Gene Affecting Milk Production Traits in Dairy Cattle. *PLoS One*, v. 11, n. 9, p. e0162195, 2016.

YOSHIMURA, S.; BONDESON, J.; FOXWELL, B.M.; BRENNAN, F.M.; FELDMANN, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: Coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *International Immunology*, v. 13, p.675–683, 2001.

ZAMANI, N.; BROWN, C. W. Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocrine Reviews*, v. 32, p. 387–403, 2011.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; MAREK, L. R.; BARRESI, S.; BARBALAT, R.; BARTON, G. M.; GRANUCCI, F.; KAGAN, J. C. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, v. 147, n. 4, p. 868-80, 2011.

ZHANG, S.; WANG, L.; LI S.; ZHANG, W.; MA, X.; CHENG, G.; YANG, W.; ZAN, L. Identification of Potential Key Genes Associated with Adipogenesis through Integrated Analysis of Five Mouse Transcriptome Datasets. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, p. pii: E3557, 2018.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*, v. Chapter 14, n. 14, p. 11, 2008.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L.; ULEVITCH, R. J. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today*, v.14, n. 3, p. 121-125, 1993.

APÊNDICE A - Lista de DEGs do contraste controle negativo versus LPS

Taurinos (Holandeses)

Genes upregulated				Genes down-regulated			
Gene	logFC	p-value	FDR	Gene	logFC	p-value	FDR
RAMP3	4,45	4,1E-11	1,2E-07	ASPA	-3,80	1,6E-04	2,4E-02
CSF3	4,41	1,4E-09	1,9E-06	BOLA-DMA	-3,57	2,2E-05	6,6E-03
AVIL	4,40	1,9E-07	1,4E-04	VSIG4	-3,45	7,4E-06	2,7E-03
CHI3L2	4,30	2,2E-11	1,2E-07	CYP27A1	-3,35	3,1E-04	3,9E-02
SH2D4A	3,85	5,3E-11	1,2E-07	CHN1	-2,76	4,6E-05	1,1E-02
EDN1	3,75	1,4E-04	2,3E-02	CACNA1G	-2,73	3,6E-04	4,4E-02
GATA3	3,69	5,6E-08	4,9E-05	CSPG4	-2,71	3,0E-04	3,8E-02
NXPE4	3,44	1,5E-04	2,3E-02	SLC37A2	-2,57	1,5E-04	2,4E-02
SLC28A3	3,37	9,4E-09	1,1E-05	mrc2	-2,41	9,0E-07	5,1E-04
RETN	3,33	4,5E-10	7,4E-07	CTTNBP2	-2,38	6,6E-05	1,5E-02
SCNN1D	3,05	8,7E-13	1,0E-08	LRRC71	-2,37	2,2E-04	3,1E-02
MCEMP1	3,04	2,4E-10	4,5E-07	SORBS3	-2,37	1,7E-05	5,5E-03
CCL4	2,92	2,4E-06	1,0E-03	SAMD11	-2,35	1,7E-04	2,6E-02
IL1B	2,84	1,3E-04	2,2E-02	AXL	-2,27	3,1E-04	3,9E-02
EBI3	2,83	4,5E-11	1,2E-07	ENSBTAG00000046328	-2,26	8,6E-05	1,7E-02
EHF	2,76	1,6E-09	2,1E-06	PLEKHA4	-2,26	9,5E-05	1,8E-02
IL1A	2,75	9,6E-06	3,3E-03	MSR1	-2,20	1,1E-06	6,1E-04
GJB2	2,72	3,1E-08	3,2E-05	PLAC8	-2,18	1,2E-05	4,1E-03
SAA3	2,70	1,8E-07	1,4E-04	GSTM1	-2,04	1,4E-04	2,3E-02
LOC104968478	2,65	5,5E-06	2,2E-03	MGST1	-1,93	1,2E-04	2,1E-02
KCNJ15	2,63	1,2E-04	2,1E-02	EPB41L3	-1,92	8,3E-06	3,0E-03
CLDN1	2,61	1,0E-04	1,9E-02	PPARG	-1,91	2,8E-04	3,6E-02
IL23R	2,59	2,9E-07	2,0E-04	COL14A1	-1,86	7,5E-05	1,6E-02
LOC784768	2,55	2,2E-05	6,6E-03	ACSF2	-1,82	1,0E-04	1,9E-02
MARCO	2,54	5,6E-05	1,3E-02	UACA	-1,81	4,4E-05	1,1E-02
S100A9	2,52	4,4E-05	1,1E-02	FOS	-1,75	2,3E-06	1,0E-03
S100A8	2,49	4,5E-06	1,9E-03	TRIM47	-1,68	1,3E-04	2,2E-02
LPAR3	2,45	4,4E-08	4,2E-05	SLC9A9	-1,56	3,3E-04	4,1E-02
SOD2	2,44	6,5E-07	3,9E-04	AKR1B1	-1,55	3,6E-04	4,4E-02
CXCL2	2,37	2,6E-04	3,4E-02	ITGB5	-1,55	1,8E-04	2,7E-02
SERPINB2	2,35	3,4E-05	9,3E-03	SLC16A1	-1,53	6,2E-05	1,5E-02
ENSBTAG00000045808	2,35	1,2E-07	1,0E-04	VAT1	-1,52	3,0E-05	8,5E-03
NLRP12	2,28	1,6E-05	5,2E-03	BIN1	-1,51	2,0E-04	2,9E-02
B3GNT3	2,24	2,2E-04	3,1E-02	NRROS	-1,50	1,4E-04	2,3E-02
GPR84	2,22	1,6E-04	2,4E-02	CDC42EP3	-1,43	2,6E-04	3,4E-02
LOC504806	2,19	5,9E-06	2,3E-03	ITSN1	-1,37	2,3E-04	3,2E-02
SOCS1	2,18	1,4E-06	7,1E-04				
LOC100850808	2,16	3,3E-04	4,1E-02				
TGM1	2,13	2,5E-04	3,3E-02				
CXCL3	2,10	2,1E-06	1,0E-03				
CA12	2,03	3,5E-07	2,2E-04				
MT1E	2,03	4,1E-04	4,9E-02				
MT2A	1,97	1,2E-04	2,1E-02				
RUBCNL	1,96	6,6E-05	1,5E-02				
PDPN	1,88	8,3E-05	1,7E-02				
TNIP3	1,87	3,0E-05	8,5E-03				
CNTFR	1,86	7,4E-05	1,6E-02				
LOC504861	1,77	3,8E-05	1,0E-02				
ENSBTAG00000019123	1,70	5,3E-05	1,3E-02				

PIM3	1,69	1,9E-06	9,6E-04
BCL2A1	1,65	7,3E-06	2,7E-03
GRO1	1,60	8,4E-05	1,7E-02
A4GALT	1,57	2,4E-04	3,3E-02
CCL5	1,53	2,0E-04	2,9E-02
SLC13A5	1,51	3,4E-05	9,3E-03
VLDLR	1,44	8,8E-05	1,7E-02
ZC3H12A	1,44	8,9E-05	1,7E-02
ABCA3	1,37	1,1E-04	2,0E-02
ENSBTAG00000008556	1,36	1,6E-04	2,4E-02
GNG5	1,21	2,5E-04	3,4E-02

Zebuínos (Gir)

Genes upregulated				Genes down-regulated			
Gene	logFC	p-value	FDR	Gene	logFC	p-value	FDR
IL1R2	4,54	1,4E-10	1,8E-07	COL3A1	-8,08	2,3E-08	8,6E-06
SLC28A3	4,51	1,3E-12	2,3E-09	COL1A1	-7,50	5,4E-07	9,8E-05
MT1A	4,20	1,5E-11	2,3E-08	FBN1	-7,36	3,9E-06	4,8E-04
MMP1	3,71	1,7E-09	1,1E-06	FBLN2	-7,32	5,7E-07	1,0E-04
LOC107131204	3,55	1,9E-07	5,0E-05	COL1A2	-7,30	7,1E-07	1,2E-04
CSF3	3,40	3,3E-09	1,7E-06	TNC	-7,08	5,0E-06	5,7E-04
STC1	3,39	9,3E-06	9,3E-04	LOXL2	-7,07	9,2E-07	1,5E-04
NLRP12	3,12	2,5E-13	7,0E-10	COL5A2	-7,03	8,3E-06	8,5E-04
AVIL	3,11	2,1E-07	5,2E-05	SPARC	-6,83	3,2E-07	7,0E-05
TCN1	3,04	2,1E-09	1,3E-06	COL6A2	-6,73	1,5E-05	1,3E-03
SLAMF1	3,03	4,6E-10	4,6E-07	COL6A1	-6,69	1,4E-05	1,3E-03
EDN1	3,00	2,6E-05	2,3E-03	CTGF	-6,33	2,1E-07	5,2E-05
FLT1	2,97	1,3E-16	1,4E-12	TAGLN	-6,17	7,6E-06	8,0E-04
CXCL2	2,86	6,2E-10	4,8E-07	MMP2	-6,07	2,4E-05	2,2E-03
LVRN	2,76	2,5E-07	5,9E-05	SERPINH1	-6,05	6,5E-08	2,0E-05
ABCG1	2,72	6,8E-08	2,1E-05	COL12A1	-6,03	4,0E-05	3,3E-03
SERPINB2	2,52	7,9E-08	2,3E-05	TIMP3	-5,92	8,4E-08	2,4E-05
CCL8	2,52	3,7E-05	3,1E-03	CYR61	-5,71	3,5E-07	7,2E-05
IL1B	2,50	5,9E-13	1,3E-09	FLNC	-5,67	8,2E-06	8,4E-04
LOC100847724	2,50	2,7E-04	1,4E-02	LAMB2	-5,35	7,2E-09	3,2E-06
IL6	2,45	5,8E-10	4,8E-07	CDH11	-5,15	2,7E-05	2,4E-03
LOC100848100	2,41	4,2E-04	2,0E-02	FSTL1	-5,14	1,0E-06	1,7E-04
CCL4	2,40	6,8E-07	1,2E-04	NES	-5,11	2,2E-07	5,3E-05
IL1A	2,39	1,0E-09	6,9E-07	PTRF	-4,95	5,2E-07	9,5E-05
GJB2	2,38	1,0E-04	6,7E-03	FN1	-4,85	2,4E-07	5,9E-05
CLDN1	2,31	4,7E-05	3,7E-03	AXL	-4,79	1,1E-08	4,7E-06
F3	2,26	1,5E-13	5,3E-10	TIMP1	-4,73	4,3E-07	8,1E-05
MT1E	2,23	1,3E-04	8,1E-03	SERPINE1	-4,57	5,8E-06	6,5E-04
GLT1D1	2,20	8,9E-06	9,0E-04	TPM2	-4,31	3,9E-07	7,8E-05
MT2A	2,13	2,9E-09	1,6E-06	PRSS23	-4,10	5,4E-06	6,2E-04
GATA3	2,12	1,5E-03	5,0E-02	ANKRD1	-4,10	6,1E-04	2,7E-02
CCL3	2,10	3,1E-07	7,0E-05	ACTG2	-4,07	1,6E-06	2,4E-04
KCNJ15	2,09	4,1E-04	2,0E-02	OLFML3	-3,94	2,3E-06	3,1E-04
SLC44A3	2,07	5,0E-07	9,4E-05	DDAH2	-3,86	2,0E-06	2,9E-04
THBD	2,05	1,2E-04	7,5E-03	MYH10	-3,82	3,5E-05	2,9E-03
DCSTAMP	2,03	1,3E-04	8,2E-03	timd4	-3,77	9,8E-11	1,4E-07
SOD2	2,02	6,0E-09	2,9E-06	PTPRF	-3,75	1,3E-06	2,1E-04
EHF	1,99	1,5E-06	2,3E-04	POSTN	-3,62	9,8E-05	6,6E-03

SCNN1D	1,97	1,2E-08	4,8E-06	ALDH1L2	-3,58	2,1E-06	2,9E-04
slc39a8	1,94	3,6E-08	1,3E-05	CRISPLD2	-3,58	1,1E-05	1,1E-03
PTGS2	1,87	5,5E-04	2,5E-02	PID1	-3,52	2,0E-04	1,1E-02
TNIP3	1,87	1,4E-08	5,5E-06	CERCAM	-3,43	8,1E-07	1,4E-04
CYP27B1	1,86	2,1E-04	1,2E-02	CSF1	-3,33	1,7E-04	9,7E-03
RETN	1,86	6,4E-06	6,9E-04	FKBP10	-3,25	1,6E-04	9,4E-03
RASD2	1,85	3,5E-07	7,2E-05	TINAGL1	-3,22	1,1E-03	4,2E-02
IL33	1,85	9,6E-06	9,4E-04	JAML	-3,05	7,1E-16	3,9E-12
CYP1B1	1,82	3,7E-04	1,8E-02	SDC2	-3,02	4,0E-06	4,9E-04
TRPC6	1,81	1,1E-04	7,2E-03	ASNS	-2,97	2,6E-06	3,4E-04
CCL24	1,81	1,7E-04	9,8E-03	LOC100139670	-2,94	5,2E-08	1,7E-05
LPAR3	1,78	4,1E-06	5,0E-04	RCN3	-2,93	1,0E-04	6,7E-03
FAM8A1	1,77	5,4E-05	4,1E-03	ASPA	-2,92	3,3E-06	4,2E-04
M-SAA3.2	1,77	4,0E-09	2,0E-06	RAB13	-2,91	2,0E-05	1,8E-03
AREG	1,74	1,0E-04	6,6E-03	FSCN1	-2,84	7,4E-06	7,8E-04
CCBE1	1,73	1,8E-06	2,7E-04	PALLD	-2,80	1,2E-04	7,7E-03
QPCT	1,73	1,3E-08	5,1E-06	BOLA-DMB	-2,78	6,2E-08	2,0E-05
TGM3	1,71	1,3E-04	7,9E-03	IFIT3	-2,77	6,5E-09	3,0E-06
SAA3	1,70	6,1E-06	6,7E-04	KANK2	-2,77	4,1E-08	1,4E-05
defb3	1,65	6,9E-05	5,0E-03	qsox1	-2,77	6,3E-06	6,8E-04
VLDLR	1,63	5,9E-10	4,8E-07	ROR2	-2,70	1,1E-05	1,0E-03
RUBCNL	1,62	7,8E-08	2,3E-05	ciita	-2,63	9,7E-04	3,7E-02
CCL2	1,61	9,7E-05	6,6E-03	ITGA3	-2,61	8,3E-05	5,8E-03
CXCL8	1,61	2,3E-05	2,0E-03	FZD1	-2,57	2,8E-04	1,5E-02
OCSTAMP	1,59	1,1E-05	1,1E-03	COL6A3	-2,55	2,5E-06	3,3E-04
MT1E	1,59	1,0E-03	3,8E-02	HSPB6	-2,54	9,9E-05	6,6E-03
A4GALT	1,58	1,1E-03	4,1E-02	CYP27A1	-2,52	3,4E-07	7,2E-05
LOC504861	1,56	1,8E-04	1,0E-02	SELENOM	-2,49	4,1E-04	2,0E-02
CISH	1,53	6,3E-04	2,7E-02	GNPMB	-2,43	2,6E-07	6,0E-05
MST1R	1,53	4,9E-04	2,3E-02	ARHGEF10	-2,41	3,9E-05	3,2E-03
EREG	1,52	5,6E-04	2,5E-02	SHF	-2,41	5,4E-04	2,5E-02
HCST	1,49	7,8E-04	3,2E-02	ERRFI1	-2,38	1,6E-04	9,6E-03
LOC104968478	1,49	1,3E-03	4,6E-02	AKAP12	-2,38	3,2E-04	1,6E-02
SAA2	1,47	2,9E-04	1,5E-02	EHD1	-2,33	1,3E-03	4,5E-02
ADGRF1	1,45	9,7E-04	3,7E-02	CBS	-2,33	2,4E-04	1,3E-02
LAT	1,43	1,8E-04	1,0E-02	mrc2	-2,29	6,8E-10	5,0E-07
SPRY4	1,42	7,0E-04	2,9E-02	BOLA-DMA	-2,29	4,6E-04	2,2E-02
SERPINB2	1,42	5,3E-05	4,0E-03	IRX3	-2,23	8,1E-04	3,2E-02
cyp3a4	1,41	1,3E-04	8,1E-03	LTBP4	-2,20	1,3E-03	4,6E-02
CXCL3	1,38	9,7E-08	2,7E-05	NXN	-2,17	4,8E-05	3,7E-03
SLC16A6	1,37	6,0E-05	4,5E-03	NREP	-2,16	1,1E-04	7,2E-03
BACE2	1,34	6,7E-04	2,8E-02	KLF4	-2,16	1,3E-03	4,5E-02
S100A8	1,34	8,8E-05	6,1E-03	BOLA-DRA	-2,12	2,7E-04	1,4E-02
LOC530348	1,32	1,0E-03	3,8E-02	PYCR1	-2,11	2,6E-04	1,4E-02
SLC16A7	1,27	1,4E-03	4,8E-02	LRRC71	-2,10	2,6E-04	1,4E-02
UPP1	1,27	4,9E-05	3,7E-03	MFGE8	-2,10	1,7E-04	9,9E-03
CXCL5	1,26	3,2E-04	1,6E-02	CXXC5	-2,07	4,7E-06	5,5E-04
CA12	1,26	8,7E-04	3,4E-02	FLNB	-2,06	2,6E-04	1,4E-02
HBEGF	1,25	1,6E-04	9,4E-03	PALD1	-2,05	1,4E-05	1,3E-03
IL1RAP	1,23	1,3E-03	4,6E-02	MAOA	-2,05	3,0E-10	3,3E-07
SAMSN1	1,22	7,2E-05	5,2E-03	ALOX5	-2,03	1,1E-04	7,0E-03
ITGB3	1,20	2,1E-04	1,2E-02	EVC	-2,01	9,5E-04	3,7E-02
CCDC50	1,17	3,1E-05	2,7E-03	CYSLTR2	-1,99	1,3E-04	8,0E-03
CCL5	1,17	8,5E-04	3,4E-02	BLNK	-1,95	7,0E-05	5,1E-03

ARID5B	1,16	1,4E-03	4,7E-02	PLEKHA5	-1,94	1,0E-03	3,9E-02
RAPH1	1,15	1,2E-03	4,4E-02	STARD13	-1,90	5,5E-04	2,5E-02
GRO1	1,14	1,8E-06	2,7E-04	DSEL	-1,90	9,5E-04	3,7E-02
AIM1	1,11	4,0E-04	2,0E-02	C3AR1	-1,89	3,2E-04	1,6E-02
SLC2A3	1,11	4,4E-04	2,1E-02	ISG15	-1,88	4,7E-04	2,2E-02
S100A9	1,08	1,0E-03	3,8E-02	PSAT1	-1,87	1,5E-06	2,3E-04
TES	1,07	1,2E-03	4,4E-02	FCER2	-1,85	1,3E-04	7,9E-03
RGS16	1,05	1,2E-03	4,4E-02	ERBB2	-1,84	7,0E-04	2,9E-02
BCL2A1	1,01	1,3E-03	4,5E-02	ANG	-1,81	1,8E-04	1,0E-02
PPP1R3C	1,00	5,1E-04	2,3E-02	GPR183	-1,80	1,1E-06	1,7E-04
BATF3	0,99	7,7E-04	3,2E-02	ABI3	-1,79	4,7E-06	5,5E-04
PIM3	0,98	1,3E-03	4,5E-02	BCAS4	-1,74	1,6E-04	9,6E-03
PTEN	0,98	5,8E-04	2,6E-02	ALDH1A1	-1,73	9,9E-06	9,6E-04
MAFF	0,95	1,3E-03	4,5E-02	TREML1	-1,71	9,2E-05	6,4E-03
LIMD2	0,95	1,2E-04	7,6E-03	TH	-1,70	7,6E-04	3,2E-02
MXD1	0,91	8,1E-04	3,2E-02	CLEC7A	-1,68	5,7E-06	6,4E-04
BMP1	0,91	2,7E-04	1,4E-02	Ccdc152	-1,68	7,7E-04	3,2E-02
LYN	0,89	1,3E-03	4,6E-02	PFN2	-1,68	2,6E-04	1,4E-02
XBP1	0,87	6,6E-04	2,8E-02	RND2	-1,67	8,9E-04	3,5E-02
GNG5	0,86	2,2E-04	1,2E-02	PCOLCE	-1,66	1,1E-03	4,2E-02
MARCKS	0,85	1,0E-03	3,9E-02	UACA	-1,63	1,9E-04	1,1E-02
ADGRE5	0,84	6,6E-04	2,8E-02	C1QB	-1,61	4,0E-04	1,9E-02
				PECR	-1,60	9,9E-04	3,8E-02
				CDON	-1,58	1,1E-03	4,0E-02
				DAB2	-1,56	7,9E-05	5,6E-03
				CDC42EP3	-1,55	2,9E-06	3,7E-04
				PIK3IP1	-1,55	4,1E-05	3,3E-03
				CBR1	-1,55	6,8E-05	5,0E-03
				CXCR4	-1,52	3,7E-07	7,4E-05
				RNASE4	-1,52	1,1E-03	4,2E-02
				Ang2	-1,51	1,3E-03	4,5E-02
				GAS6	-1,51	8,0E-05	5,6E-03
				ACSF2	-1,51	2,2E-06	3,1E-04
				SLAMF7	-1,50	3,0E-04	1,5E-02
				ID3	-1,48	1,6E-04	9,4E-03
				AKR1B1	-1,48	8,1E-06	8,4E-04
				GPR132	-1,48	9,6E-05	6,5E-03
				EPHB3	-1,47	4,4E-05	3,4E-03
				SLC15A3	-1,47	3,7E-06	4,7E-04
				ITGB5	-1,47	1,4E-07	3,7E-05
				FSTL3	-1,44	7,9E-04	3,2E-02
				SLC46A3	-1,39	3,3E-06	4,2E-04
				NDRG2	-1,38	3,3E-07	7,1E-05
				PDE7B	-1,35	4,1E-04	2,0E-02
				GPT2	-1,35	2,8E-04	1,5E-02
				VSIG4	-1,33	4,2E-06	5,0E-04
				MYL9	-1,32	6,5E-04	2,8E-02
				PLCXD1	-1,32	1,1E-03	4,1E-02
				VDR	-1,27	3,8E-04	1,9E-02
				VEGFA	-1,26	7,3E-05	5,3E-03
				NQO1	-1,26	6,2E-05	4,6E-03
				C1QA	-1,26	5,0E-06	5,7E-04
				GABARAPL1	-1,25	2,0E-06	2,9E-04
				PRCP	-1,25	9,5E-05	6,5E-03

SPATA20	-1,24	6,9E-04	2,9E-02
PEF1	-1,21	3,2E-06	4,1E-04
CYP4V2	-1,21	6,1E-04	2,7E-02
TYRO3	-1,21	4,0E-05	3,3E-03
RGS1	-1,19	4,3E-05	3,4E-03
NAAA	-1,16	1,2E-03	4,3E-02
PCK2	-1,16	1,4E-04	8,3E-03
CD81	-1,15	6,2E-06	6,7E-04
TMEM140	-1,15	3,7E-04	1,8E-02
SLC37A2	-1,15	1,3E-04	8,0E-03
C1QC	-1,15	9,3E-05	6,4E-03
SLC9A9	-1,14	1,3E-06	2,1E-04
VAT1	-1,11	4,2E-05	3,4E-03
FOXO4	-1,11	7,9E-04	3,2E-02
FAM13A	-1,09	6,3E-04	2,7E-02
PC	-1,08	2,8E-05	2,4E-03
TGFBI	-1,07	5,0E-05	3,8E-03
SLC8B1	-1,07	4,0E-05	3,3E-03
BGN	-1,07	7,0E-04	2,9E-02
PLCD1	-1,06	6,7E-04	2,8E-02
PLAC8	-1,06	3,1E-04	1,6E-02
ABCB6	-1,06	3,4E-05	2,9E-03
OSGIN1	-1,05	4,7E-04	2,2E-02
NKG7	-1,00	2,5E-04	1,4E-02
LMO2	-0,98	1,4E-03	4,9E-02
ADAP2	-0,97	7,8E-04	3,2E-02
MXD4	-0,97	1,4E-03	4,8E-02
DCPS	-0,96	1,3E-03	4,5E-02
CTSF	-0,94	1,4E-04	8,3E-03
PLOD2	-0,93	1,5E-03	5,0E-02
ADAM15	-0,93	4,4E-04	2,1E-02
HMOX1	-0,92	3,5E-04	1,8E-02
PLXDC1	-0,91	3,2E-04	1,6E-02
SELENOW	-0,90	1,2E-03	4,4E-02
CTNS	-0,90	8,6E-04	3,4E-02
kcnt1	-0,90	2,4E-04	1,3E-02
CREG1	-0,88	7,6E-04	3,1E-02
f2rl2	-0,87	6,7E-04	2,8E-02
zfyve21	-0,87	1,2E-03	4,4E-02
DEPDC7	-0,86	8,2E-04	3,3E-02
ARL4C	-0,86	5,1E-04	2,4E-02
LAPTM4B	-0,86	1,5E-03	5,0E-02
SLC29A3	-0,84	7,9E-04	3,2E-02
ASRGL1	-0,84	3,0E-04	1,6E-02
DENND1C	-0,81	1,1E-03	4,2E-02
SLC25A6	-0,81	6,0E-04	2,6E-02
SCPEP1	-0,81	3,6E-04	1,8E-02
GLTSCR2	-0,80	9,3E-04	3,6E-02
FADS6	-0,78	8,4E-04	3,3E-02

APÊNDICE B - Lista de DEGs do contraste taurinos *versus* zebuínos sem
estimulação

<i>Genes upregulated</i>				<i>Genes down-regulated</i>			
Gene	logFC	<i>p-value</i>	FDR	Gene	logFC	<i>p-value</i>	FDR
AOX1	8,21	9,0E-39	1,0E-34	PTGDS	-7,30	5,6E-08	2,4E-05
CREB3L3	6,51	3,9E-10	3,0E-07	BOLA-DQA2	-6,97	1,5E-10	1,3E-07
LOC539009	5,14	3,9E-15	9,1E-12	SAA2	-6,37	2,1E-06	5,1E-04
LOC526163	5,06	1,0E-11	1,3E-08	BOLA-DQA5	-6,17	7,8E-08	3,0E-05
fam101a	4,98	9,7E-10	6,6E-07	LPL	-5,55	2,5E-05	4,3E-03
LOC515676	4,07	1,4E-09	9,1E-07	CA4	-4,79	1,8E-04	2,0E-02
CRYM	4,02	1,8E-07	6,5E-05	CD38	-4,75	2,1E-11	2,4E-08
MARCO	3,63	4,2E-10	3,0E-07	SCIN	-4,52	6,0E-04	4,8E-02
FCER2	3,43	6,6E-08	2,7E-05	BOLA-DQB	-4,25	6,8E-05	1,0E-02
TRPC6	3,30	3,0E-07	1,0E-04	ABCB1	-4,13	3,7E-13	6,0E-10
LOC614531	3,21	7,7E-08	3,0E-05	SLC28A3	-4,07	1,1E-08	5,5E-06
SYT4	3,16	4,3E-05	7,0E-03	IFITM2	-3,95	4,1E-08	1,8E-05
LOC101906221	3,08	6,6E-07	1,9E-04	brb	-3,53	1,3E-05	2,6E-03
TGM3	2,99	1,4E-04	1,7E-02	TREML2	-3,19	8,0E-12	1,2E-08
CALY	2,86	1,9E-05	3,4E-03	RSAD2	-3,19	1,2E-04	1,6E-02
MCF2L2	2,85	3,1E-07	1,0E-04	PTGR1	-3,14	2,3E-14	4,5E-11
LOC100196897	2,75	2,0E-04	2,2E-02	MMP25	-2,91	1,2E-08	5,8E-06
LOC101902787	2,70	1,6E-06	4,1E-04	CDH23	-2,80	7,9E-05	1,2E-02
E2F8	2,68	2,8E-04	2,8E-02	PLD4	-2,63	1,0E-04	1,4E-02
CARD11	2,67	4,2E-05	6,8E-03	OCSTAMP	-2,62	1,0E-04	1,4E-02
MXD3	2,53	7,5E-05	1,1E-02	PTGS2	-2,56	2,5E-04	2,6E-02
TCF19	2,49	2,0E-05	3,7E-03	CLU	-2,52	1,0E-07	3,8E-05
TAGAP	2,45	7,3E-09	3,8E-06	IL1RN	-2,51	5,8E-05	9,0E-03
CLEC3B	2,28	9,0E-06	1,9E-03	TSPAN13	-2,51	7,4E-07	2,1E-04
LOC529196	2,27	1,3E-08	6,0E-06	NDUFA4L2	-2,48	4,8E-07	1,4E-04
CDKN3	2,26	3,9E-04	3,6E-02	SLC13A3	-2,46	2,1E-04	2,2E-02
CDCA5	2,24	2,2E-05	3,9E-03	CD180	-2,35	5,4E-04	4,5E-02
GPR19	2,20	6,2E-04	4,9E-02	TNK1	-2,35	3,5E-05	5,8E-03
HACD4	2,20	1,2E-06	3,2E-04	FABP3	-2,30	1,1E-04	1,5E-02
POLE	2,15	1,3E-04	1,6E-02	LOC100139670	-2,27	1,1E-04	1,5E-02
ASF1B	2,13	8,0E-06	1,7E-03	ACSL4	-2,13	2,6E-04	2,6E-02
KIF15	2,12	5,3E-04	4,5E-02	LRRRC31	-2,11	1,4E-05	2,7E-03
PTER	2,08	1,6E-09	9,8E-07	BMPR1A	-2,06	1,8E-04	2,0E-02
HSF2BP	2,05	3,0E-04	2,9E-02	EGLN3	-1,98	2,7E-06	6,5E-04
p2ry11	2,05	4,2E-04	3,8E-02	JAML	-1,97	1,1E-04	1,5E-02
BFSP2	1,99	2,2E-04	2,3E-02	SDS	-1,96	6,3E-06	1,4E-03
PADI4	1,97	9,7E-05	1,3E-02	DNAJC6	-1,93	5,7E-04	4,7E-02
THEM6	1,97	3,9E-04	3,6E-02	CCR5	-1,91	4,6E-04	4,1E-02
CAPN3	1,95	5,8E-06	1,3E-03	bolA	-1,79	2,5E-05	4,4E-03
CARD14	1,93	4,5E-04	4,0E-02	SEC23A	-1,67	8,2E-05	1,2E-02
CLSPN	1,92	1,9E-04	2,1E-02	BOLA-NC1	-1,67	7,2E-05	1,1E-02
RECQL4	1,84	3,0E-04	2,9E-02	MICU3	-1,65	5,6E-04	4,6E-02
E2F1	1,78	7,2E-05	1,1E-02	ATP8B1	-1,60	5,0E-04	4,3E-02
LMNB1	1,73	4,7E-04	4,1E-02	TMEM150A	-1,57	1,5E-04	1,8E-02
SMC2	1,72	1,6E-04	1,8E-02	SLC13A5	-1,57	1,3E-04	1,6E-02
KIF14	1,72	4,9E-04	4,2E-02	LOC530348	-1,55	4,3E-04	3,9E-02
GOLGA7B	1,70	6,0E-04	4,8E-02	ECE1	-1,48	2,1E-04	2,2E-02
CCHCR1	1,69	2,7E-05	4,6E-03	CTSK	-1,44	6,2E-04	4,9E-02
PCNA	1,68	1,4E-05	2,7E-03	TRMT44	-1,38	4,1E-04	3,7E-02

slc35a1	1,66	2,9E-07	9,8E-05
ARHGEF39	1,65	3,5E-04	3,3E-02
GGCT	1,63	1,2E-05	2,4E-03
RBL1	1,60	2,5E-04	2,6E-02
LIG1	1,54	1,5E-04	1,8E-02
FCAR	1,53	6,8E-06	1,5E-03
PLK4	1,47	2,5E-04	2,6E-02
RARRES1	1,46	4,7E-04	4,1E-02
cdc25b	1,43	9,4E-05	1,3E-02
ZNF385A	1,39	9,1E-06	1,9E-03
whsc1	1,36	5,1E-04	4,3E-02
hirip3	1,35	1,5E-04	1,8E-02
WDR62	1,35	3,1E-04	3,0E-02
PHF19	1,34	1,3E-04	1,6E-02
TUBB2B	1,32	1,9E-04	2,1E-02
EZH2	1,24	2,6E-04	2,6E-02
NMRAL1	1,22	4,1E-04	3,7E-02
SUV39H1	1,20	2,1E-04	2,2E-02

APÊNDICE C - Lista de DEGs do contraste taurinos *versus* zebuínos tratados com
LPS

Gene	Genes upregulated			Gene	Genes down-regulated		
	logFC	p-value	FDR		logFC	p-value	FDR
ctsl	4,71	2,93E-05	5,42E-04	COL12A1	-5,47	4,54E-06	1,00E-04
LOC781146	3,16	5,24E-05	9,01E-04	POSTN	-3,88	2,40E-05	4,51E-04
TGM3	3,11	4,58E-06	1,01E-04	SCIN	-3,76	3,99E-03	3,99E-02
RMI2	2,98	1,18E-05	2,40E-04	LOC510382	-3,67	4,93E-03	4,74E-02
slc2a5	2,97	1,55E-03	1,82E-02	IFITM2	-3,45	7,31E-06	1,55E-04
ADGRF5	2,92	1,01E-03	1,28E-02	RSAD2	-3,40	1,41E-04	2,27E-03
LOC107131287	2,89	2,54E-03	2,72E-02	FAT1	-3,20	1,75E-05	3,39E-04
CH25H	2,75	8,03E-06	1,69E-04	GBP4	-3,19	4,85E-04	6,73E-03
KCNE3	2,59	5,13E-06	1,12E-04	IL1RN	-3,17	1,49E-04	2,37E-03
TRPC6	2,54	4,75E-06	1,04E-04	TINAGL1	-3,10	1,77E-04	2,79E-03
PAK6	2,53	2,05E-05	3,92E-04	OLR1	-2,99	5,78E-05	9,84E-04
TP73	2,36	2,98E-05	5,51E-04	GPRC5A	-2,97	2,18E-03	2,41E-02
PDGFB	2,30	1,94E-04	3,01E-03	LIPM	-2,95	7,20E-06	1,54E-04
BARD1	2,29	1,22E-05	2,45E-04	Ccdc152	-2,94	4,68E-03	4,56E-02
PPP1R9A	2,25	5,87E-06	1,27E-04	NOS2	-2,85	4,25E-05	7,55E-04
GJC1	2,20	5,12E-04	7,06E-03	LOC107131205	-2,77	1,35E-04	2,17E-03
EXO1	2,19	1,82E-05	3,49E-04	LOC520336	-2,66	1,04E-05	2,13E-04
MAP4K1	2,18	9,10E-06	1,90E-04	PECAM1	-2,60	2,07E-05	3,95E-04
CDH26	2,18	2,71E-03	2,88E-02	TMEM215	-2,51	1,16E-04	1,89E-03
GPR34	2,17	9,25E-04	1,19E-02	GSTM1	-2,49	2,48E-05	4,65E-04
Ang2	2,14	1,55E-04	2,46E-03	RUNX2	-2,45	1,44E-05	2,87E-04
TREML1	2,12	1,19E-03	1,46E-02	SLAMF9	-2,43	3,54E-03	3,63E-02
MND1	2,11	3,85E-05	6,88E-04	DDAH2	-2,42	1,02E-05	2,10E-04
RNASE4	2,10	1,84E-04	2,88E-03	CHST2	-2,41	1,30E-05	2,60E-04
NMNAT2	2,03	1,63E-04	2,58E-03	FEZ1	-2,37	1,17E-04	1,91E-03
SORL1	2,02	1,15E-03	1,41E-02	ASCL2	-2,35	1,60E-05	3,14E-04
SH2D3C	2,02	3,07E-05	5,62E-04	CD72	-2,34	1,60E-05	3,14E-04
TST	1,99	6,17E-06	1,33E-04	ANKS6	-2,33	1,74E-05	3,38E-04
DNHD1	1,99	1,41E-03	1,68E-02	TCN1	-2,32	3,96E-03	3,96E-02
PARVB	1,97	1,13E-04	1,85E-03	LRRN2	-2,32	9,38E-06	1,95E-04
LOC531747	1,97	3,82E-05	6,84E-04	ELMO3	-2,32	2,63E-03	2,81E-02
C24H18orf54	1,93	2,96E-04	4,33E-03	GDNF	-2,29	1,15E-04	1,87E-03
APOLD1	1,93	2,99E-05	5,51E-04	TFPI2	-2,28	6,62E-06	1,42E-04
NEMP1	1,89	4,27E-05	7,58E-04	SHF	-2,27	1,78E-05	3,44E-04
S100A5	1,89	7,16E-04	9,52E-03	sdc1	-2,27	2,94E-04	4,31E-03
arhgap15	1,88	2,47E-04	3,73E-03	EHD1	-2,26	7,91E-06	1,67E-04
DUT	1,88	1,25E-05	2,51E-04	ITGA1	-2,24	1,34E-03	1,61E-02
RDM1	1,88	1,58E-04	2,50E-03	KIF7	-2,22	3,82E-05	6,84E-04
MEF2C	1,88	5,07E-06	1,11E-04	CTNNAL1	-2,21	3,09E-05	5,66E-04
HSF2BP	1,88	4,41E-04	6,18E-03	BOLA-DRA	-2,21	3,13E-03	3,26E-02
NDC1	1,84	1,38E-05	2,76E-04	NES	-2,20	2,65E-03	2,82E-02
NLRX1	1,84	3,32E-04	4,79E-03	NUMBL	-2,20	4,97E-06	1,09E-04
CDCA7	1,84	6,88E-06	1,47E-04	SYTL2	-2,18	9,25E-04	1,19E-02
LOC533821	1,84	7,18E-05	1,20E-03	ciita	-2,17	4,03E-03	4,01E-02
CDKN2D	1,82	7,92E-06	1,67E-04	LOC507055	-2,17	2,91E-05	5,39E-04
PROCR	1,82	1,44E-04	2,31E-03	TM4SF19	-2,17	2,37E-04	3,58E-03
p2ry11	1,80	2,01E-04	3,12E-03	prrg2	-2,16	4,06E-04	5,74E-03
OAF	1,79	1,77E-03	2,02E-02	NMB	-2,16	1,87E-05	3,58E-04
ARHGAP19	1,79	2,03E-03	2,27E-02	ANKRD22	-2,15	4,09E-04	5,78E-03

KCNC4	1,77	3,32E-05	6,03E-04	AFAP1	-2,14	6,11E-05	1,04E-03
DYSF	1,77	5,02E-05	8,70E-04	CACNA1A	-2,12	4,91E-05	8,54E-04
MYO10	1,77	4,63E-05	8,12E-04	MYOF	-2,11	1,09E-05	2,24E-04
MYH15	1,77	2,27E-04	3,46E-03	FAS	-2,11	1,29E-05	2,60E-04
LOC100298356	1,73	2,55E-03	2,72E-02	PROS1	-2,11	4,44E-04	6,20E-03
FXVD6	1,73	2,31E-05	4,36E-04	adgra3	-2,11	5,12E-04	7,06E-03
GNG11	1,72	1,37E-03	1,64E-02	GNB3	-2,10	2,60E-04	3,88E-03
RGS2	1,71	1,74E-03	2,00E-02	LOC788634	-2,09	1,64E-05	3,21E-04
FAM107B	1,71	2,75E-03	2,90E-02	HIST1H2BD	-2,08	5,43E-05	9,29E-04
RGS1	1,69	3,12E-05	5,71E-04	TSHZ3	-2,05	2,11E-04	3,24E-03
MMP13	1,68	4,43E-04	6,19E-03	MCOLN3	-2,05	5,28E-04	7,27E-03
LRR1	1,67	4,30E-05	7,61E-04	CDCP1	-2,04	1,94E-04	3,01E-03
C1QC	1,66	1,29E-03	1,56E-02	PTGS2	-2,03	1,97E-03	2,22E-02
C16H1orf112	1,66	1,17E-05	2,39E-04	PECR	-2,02	3,92E-05	6,99E-04
RCC1	1,65	2,36E-04	3,58E-03	TNFRSF12A	-2,01	1,66E-05	3,23E-04
NSL1	1,65	8,71E-06	1,82E-04	qsox1	-2,01	1,55E-05	3,05E-04
FOLH1B	1,65	9,45E-04	1,21E-02	KANK2	-2,00	4,78E-05	8,33E-04
GDA	1,65	6,25E-04	8,46E-03	PLBD1	-2,00	1,61E-04	2,55E-03
cyp3a5	1,65	3,03E-04	4,42E-03	LTBP1	-1,99	2,54E-03	2,72E-02
SEPT10	1,63	1,41E-04	2,27E-03	S1PR3	-1,99	3,01E-03	3,16E-02
KIF20B	1,63	4,91E-06	1,08E-04	ADCY3	-1,97	2,26E-05	4,26E-04
MARCO	1,60	2,65E-04	3,94E-03	CBS	-1,97	1,47E-04	2,35E-03
arhgap18	1,58	2,07E-04	3,17E-03	PLXDC1	-1,97	9,79E-06	2,02E-04
CCNE1	1,58	1,22E-05	2,45E-04	MT1E	-1,95	4,89E-05	8,52E-04
ANG	1,55	7,46E-06	1,58E-04	IPCEF1	-1,95	9,92E-06	2,05E-04
ARMCX6	1,55	8,36E-04	1,09E-02	TTC21B	-1,94	4,20E-05	7,48E-04
DDX11	1,53	3,67E-04	5,23E-03	ADARB1	-1,93	2,57E-04	3,85E-03
LMO2	1,53	2,78E-03	2,93E-02	TNFRSF4	-1,93	1,25E-04	2,03E-03
SNAP25	1,52	1,32E-03	1,59E-02	TMEM150A	-1,92	1,68E-05	3,27E-04
KLHL6	1,52	1,19E-03	1,45E-02	MCOLN2	-1,92	1,81E-05	3,47E-04
DBF4	1,51	1,11E-05	2,26E-04	CMPK2	-1,91	5,25E-03	4,99E-02
ATP2A3	1,51	9,42E-04	1,21E-02	MET	-1,90	1,95E-03	2,21E-02
BFSP2	1,51	3,27E-04	4,74E-03	CRIM1	-1,89	9,51E-04	1,22E-02
AREG	1,50	1,07E-04	1,77E-03	CTH	-1,89	4,50E-04	6,27E-03
CEP152	1,50	2,93E-05	5,42E-04	RPP38	-1,89	1,50E-05	2,97E-04
CDR2	1,48	1,53E-03	1,79E-02	HSPB6	-1,88	3,25E-05	5,91E-04
SLAIN1	1,48	2,07E-03	2,32E-02	PDE5A	-1,87	2,74E-04	4,07E-03
DCK	1,48	4,54E-05	7,97E-04	DNAJC6	-1,87	5,20E-05	8,98E-04
PDE10A	1,47	9,04E-04	1,17E-02	TLN2	-1,87	1,48E-05	2,94E-04
C19H17orf53	1,47	3,86E-04	5,49E-03	BEST1	-1,84	5,40E-06	1,18E-04
LBR	1,46	5,71E-04	7,81E-03	CNTNAP1	-1,84	4,25E-04	5,96E-03
CHEK1	1,46	4,76E-05	8,33E-04	PDE7B	-1,83	6,49E-04	8,75E-03
FKBP5	1,46	1,34E-04	2,17E-03	SLC46A3	-1,82	2,25E-03	2,46E-02
ATP10A	1,46	4,44E-03	4,35E-02	SLC13A3	-1,81	3,53E-04	5,07E-03
MFNG	1,45	2,35E-04	3,58E-03	CBLB	-1,80	1,63E-03	1,89E-02
LOC504861	1,45	5,23E-05	9,01E-04	GATA3	-1,79	2,63E-05	4,90E-04
WNK2	1,44	2,32E-03	2,52E-02	SLC25A45	-1,78	3,78E-04	5,38E-03
AGAP2	1,43	3,36E-03	3,48E-02	JSP.1	-1,78	4,77E-05	8,33E-04
RASAL3	1,43	6,61E-04	8,88E-03	ADSSL1	-1,78	1,21E-05	2,45E-04
FCER2	1,43	4,89E-03	4,71E-02	CLMN	-1,78	6,05E-04	8,21E-03
PARD6G	1,42	1,10E-03	1,38E-02	CA9	-1,77	1,57E-03	1,83E-02
BRI3BP	1,41	2,41E-03	2,60E-02	BMPR1A	-1,74	6,25E-04	8,46E-03
LPXN	1,40	1,83E-04	2,87E-03	ANKRD2	-1,72	2,77E-04	4,10E-03
CDC25A	1,40	2,90E-04	4,27E-03	RIMBP2	-1,72	3,20E-03	3,33E-02

NRM	1,39	3,35E-05	6,07E-04	ID3	-1,72	1,81E-05	3,47E-04
RAD18	1,38	7,27E-06	1,55E-04	nfe2i3	-1,72	7,57E-04	1,00E-02
TUBB2B	1,38	1,61E-05	3,16E-04	GJB2	-1,71	1,13E-03	1,39E-02
CENPQ	1,38	4,87E-04	6,74E-03	AGMAT	-1,71	1,92E-04	2,99E-03
MTHFD1	1,38	2,35E-05	4,42E-04	ECE1	-1,71	1,50E-05	2,96E-04
WDR76	1,37	1,20E-05	2,44E-04	MTMR7	-1,71	6,60E-05	1,11E-03
ALOX5AP	1,37	1,52E-03	1,79E-02	IL27RA	-1,71	1,65E-05	3,22E-04
POLA1	1,37	1,25E-05	2,52E-04	GPR183	-1,70	5,58E-05	9,53E-04
LOC101902937	1,37	9,48E-04	1,21E-02	CLEC4E	-1,70	3,04E-04	4,43E-03
CARD14	1,37	3,45E-03	3,56E-02	DSEL	-1,67	2,68E-04	3,99E-03
ZWINT	1,36	8,00E-05	1,33E-03	BATF2	-1,67	3,58E-05	6,46E-04
hirip3	1,36	5,62E-06	1,22E-04	EFHB	-1,65	1,08E-03	1,35E-02
CENPI	1,36	3,69E-05	6,63E-04	GGT5	-1,64	8,12E-06	1,70E-04
WDHD1	1,36	6,20E-06	1,33E-04	APLP1	-1,63	2,43E-05	4,56E-04
HYLS1	1,35	2,44E-05	4,56E-04	TIAM2	-1,63	6,51E-05	1,10E-03
DTYMK	1,35	1,77E-05	3,42E-04	TOM1L1	-1,60	6,77E-04	9,08E-03
RGS16	1,31	2,82E-03	2,97E-02	NEDD4L	-1,60	1,37E-04	2,21E-03
CBX5	1,31	3,60E-04	5,15E-03	RASGRP1	-1,59	1,69E-03	1,95E-02
POLH	1,30	1,07E-04	1,76E-03	DBP	-1,59	1,09E-03	1,36E-02
CHEK2	1,30	1,36E-03	1,63E-02	TM4SF18	-1,59	4,15E-03	4,12E-02
HSD17B11	1,30	1,43E-03	1,70E-02	ROR2	-1,58	1,32E-03	1,59E-02
PF4	1,29	2,18E-03	2,41E-02	PYCR1	-1,57	2,48E-03	2,67E-02
SACS	1,28	2,00E-04	3,10E-03	EGLN3	-1,56	1,78E-04	2,80E-03
SPIRE2	1,27	3,53E-05	6,38E-04	DUSP15	-1,55	5,38E-05	9,23E-04
LOC613822	1,27	1,89E-03	2,15E-02	BMF	-1,54	2,02E-04	3,12E-03
PRIM2	1,27	6,84E-04	9,14E-03	MYBPH	-1,54	1,08E-03	1,35E-02
MED7	1,27	3,30E-05	6,00E-04	MAPK11	-1,54	3,50E-04	5,03E-03
SKA3	1,26	4,31E-04	6,05E-03	MEIS2	-1,53	2,34E-03	2,54E-02
MCM8	1,26	1,69E-03	1,95E-02	F11R	-1,50	4,89E-03	4,71E-02
MYEF2	1,25	2,17E-03	2,40E-02	TMEM140	-1,50	1,13E-04	1,85E-03
LOC101902561	1,25	2,12E-03	2,36E-02	ARL13B	-1,50	5,65E-04	7,74E-03
LOC107131159	1,25	2,24E-03	2,45E-02	ZMYND15	-1,50	3,43E-05	6,21E-04
STRA13	1,23	2,18E-05	4,12E-04	CFL2	-1,49	4,00E-04	5,66E-03
NASP	1,22	1,76E-05	3,40E-04	FERMT2	-1,49	1,42E-03	1,69E-02
MSH2	1,22	2,11E-05	4,01E-04	A2M	-1,48	3,74E-03	3,79E-02
USHBP1	1,21	3,39E-03	3,51E-02	OCSTAMP	-1,48	7,03E-04	9,36E-03
COMTD1	1,21	2,30E-03	2,50E-02	ABHD6	-1,47	1,46E-03	1,73E-02
PADI4	1,21	1,06E-03	1,34E-02	PCYOX1	-1,47	3,89E-03	3,91E-02
ASL	1,21	6,88E-05	1,16E-03	HDHD3	-1,47	5,05E-04	6,99E-03
IPP	1,20	9,94E-04	1,27E-02	DTX3	-1,47	1,71E-03	1,97E-02
TONSL	1,20	7,75E-05	1,29E-03	PIM3	-1,47	7,57E-06	1,60E-04
CKAP5	1,20	9,43E-06	1,96E-04	MYO1D	-1,46	2,65E-05	4,93E-04
PMP22	1,20	1,40E-03	1,67E-02	ANKH	-1,45	2,91E-04	4,28E-03
LAMB1	1,20	8,31E-04	1,09E-02	MARCH3	-1,44	5,90E-04	8,01E-03
CEP57	1,18	1,05E-03	1,33E-02	CDK3	-1,44	2,75E-03	2,90E-02
LOC514011	1,18	4,12E-04	5,82E-03	CBLN3	-1,42	1,71E-03	1,97E-02
CD48	1,17	8,55E-04	1,11E-02	BHLHE41	-1,42	2,24E-03	2,45E-02
GINS3	1,17	2,87E-04	4,24E-03	EHD3	-1,41	2,32E-03	2,52E-02
tmc8	1,17	3,70E-03	3,75E-02	PTPRCAP	-1,41	2,15E-04	3,29E-03
SLC9A9	1,17	1,58E-03	1,84E-02	hivep1	-1,41	1,57E-04	2,49E-03
FAM46B	1,17	1,12E-03	1,39E-02	CCDC80	-1,40	2,49E-03	2,68E-02
USP1	1,17	4,29E-05	7,59E-04	WARS	-1,40	2,53E-05	4,72E-04
HNMT	1,17	1,51E-05	2,99E-04	CHCHD10	-1,40	3,19E-05	5,83E-04
RAD54B	1,17	2,27E-03	2,48E-02	C11H9orf50	-1,39	3,43E-04	4,93E-03

UBE2T	1,16	2,60E-04	3,88E-03	MYL9	-1,39	2,00E-04	3,10E-03
VSIG4	1,16	3,75E-03	3,80E-02	ADM	-1,39	1,13E-04	1,85E-03
PARP1	1,16	9,29E-06	1,93E-04	EBI3	-1,37	3,03E-04	4,43E-03
MAP3K6	1,15	5,90E-04	8,01E-03	LOC535280	-1,37	3,42E-04	4,92E-03
WDR90	1,15	1,47E-03	1,74E-02	BCAS4	-1,36	1,11E-03	1,38E-02
MKNK1	1,14	4,39E-05	7,75E-04	GRAMD3	-1,36	2,72E-03	2,88E-02
ERMP1	1,13	5,11E-03	4,88E-02	VASN	-1,35	4,96E-05	8,62E-04
TACC3	1,13	1,49E-05	2,95E-04	DNAJA4	-1,35	8,34E-04	1,09E-02
MPHOSPH9	1,13	7,95E-05	1,32E-03	TUFT1	-1,35	1,18E-03	1,45E-02
ITGAM	1,13	2,70E-03	2,86E-02	CYP4V2	-1,35	1,32E-03	1,59E-02
POT1	1,13	1,27E-03	1,54E-02	HIF1A	-1,34	3,97E-04	5,62E-03
DOCK8	1,13	2,03E-04	3,13E-03	SLC37A1	-1,34	2,79E-03	2,94E-02
ADK	1,13	2,57E-04	3,86E-03	HSF4	-1,34	5,44E-04	7,47E-03
POLA2	1,13	5,12E-05	8,86E-04	EOGT	-1,34	3,87E-03	3,90E-02
MTBP	1,13	3,54E-03	3,63E-02	TRMT44	-1,34	4,45E-05	7,84E-04
DHCR24	1,11	4,22E-04	5,94E-03	CREG1	-1,34	2,23E-04	3,40E-03
PBX3	1,11	2,28E-04	3,47E-03	PROKR2	-1,34	1,64E-03	1,90E-02
SIVA1	1,11	4,39E-03	4,32E-02	C21H14orf79	-1,33	4,23E-04	5,94E-03
ITGAD	1,11	1,97E-03	2,22E-02	NDRG2	-1,33	3,04E-05	5,59E-04
TUBB	1,11	1,08E-04	1,78E-03	FZD1	-1,32	3,07E-03	3,21E-02
ANKLE1	1,11	1,26E-03	1,54E-02	IL36B	-1,32	1,41E-05	2,81E-04
CCDC88C	1,10	3,69E-03	3,75E-02	CCDC69	-1,31	1,01E-03	1,28E-02
NCAPD2	1,10	4,49E-05	7,90E-04	upk3b	-1,31	2,13E-03	2,36E-02
PALB2	1,10	1,00E-03	1,27E-02	ceacam19	-1,31	2,48E-03	2,67E-02
PAM	1,10	9,39E-05	1,55E-03	C3	-1,30	4,41E-03	4,34E-02
RPA3	1,10	8,16E-04	1,07E-02	ADAMTS10	-1,30	2,55E-03	2,72E-02
TYMS	1,09	1,37E-04	2,21E-03	GNAL	-1,30	1,48E-03	1,75E-02
SGO2	1,09	1,81E-04	2,84E-03	C28H10orf54	-1,29	6,07E-06	1,31E-04
NMRAL1	1,09	1,46E-04	2,34E-03	HIST2H2BE	-1,29	3,63E-04	5,19E-03
TOPBP1	1,09	7,55E-05	1,27E-03	KDM8	-1,29	8,72E-04	1,13E-02
CENPO	1,09	2,56E-03	2,73E-02	TAP1	-1,28	5,83E-05	9,92E-04
CORO7	1,08	1,13E-04	1,85E-03	H1F0	-1,28	2,51E-04	3,78E-03
RPA1	1,08	3,02E-05	5,56E-04	LRRC8E	-1,27	2,10E-03	2,34E-02
ETV5	1,08	9,81E-04	1,25E-02	PHGDH	-1,27	1,52E-03	1,79E-02
DDIAS	1,06	8,39E-04	1,10E-02	LOC507581	-1,27	5,40E-05	9,25E-04
FAM111B	1,06	1,10E-03	1,37E-02	FAM13A	-1,27	1,10E-04	1,81E-03
IGF2BP3	1,06	3,77E-03	3,81E-02	SYCP3	-1,27	4,45E-03	4,36E-02
CCDC50	1,05	1,53E-04	2,43E-03	LOC512486	-1,26	7,18E-05	1,20E-03
UBE2S	1,05	3,28E-04	4,74E-03	IFIH1	-1,26	9,86E-04	1,26E-02
LOC782629	1,04	1,88E-03	2,13E-02	RTN2	-1,26	4,48E-03	4,39E-02
SFXN3	1,04	6,56E-04	8,83E-03	BCL2L11	-1,25	1,19E-03	1,46E-02
SEH1L	1,02	1,25E-03	1,52E-02	NAPRT	-1,25	2,76E-04	4,10E-03
CDCA7L	1,01	5,13E-03	4,88E-02	OPLAH	-1,25	3,15E-04	4,58E-03
SGPL1	1,01	3,90E-04	5,54E-03	SDC3	-1,24	3,69E-03	3,75E-02
FKBP9	1,00	1,01E-03	1,28E-02	VAV2	-1,24	3,92E-03	3,94E-02
CDK4	1,00	2,39E-04	3,61E-03	GRK5	-1,23	1,51E-03	1,77E-02
LOC784451	1,00	3,43E-03	3,54E-02	LOC107131161	-1,23	4,87E-03	4,70E-02
CMC2	0,99	1,11E-03	1,39E-02	PANX2	-1,23	2,86E-03	3,01E-02
XRCC1	0,99	8,36E-04	1,09E-02	RNF135	-1,22	7,48E-06	1,58E-04
MUTYH	0,98	3,94E-03	3,95E-02	KLHL8	-1,22	4,67E-04	6,49E-03
PKP4	0,98	4,76E-03	4,62E-02	NR1D1	-1,22	2,23E-04	3,41E-03
ABRACL	0,98	1,12E-03	1,39E-02	RHOH	-1,22	6,29E-04	8,49E-03
BORA	0,97	1,21E-03	1,47E-02	GPT2	-1,22	1,74E-03	2,00E-02
KLHL5	0,97	2,02E-04	3,12E-03	COL6A3	-1,21	2,26E-04	3,45E-03

HAUS4	0,97	1,13E-03	1,39E-02	ITM2B	-1,21	3,59E-05	6,46E-04
SASH3	0,96	5,61E-04	7,70E-03	SORT1	-1,21	3,57E-03	3,65E-02
RPLP0	0,94	1,03E-03	1,31E-02	CASKIN2	-1,21	4,65E-04	6,47E-03
NRROS	0,94	3,26E-03	3,39E-02	TASP1	-1,19	5,02E-03	4,80E-02
LOC510798	0,94	3,05E-03	3,19E-02	SIRT5	-1,19	2,09E-03	2,33E-02
TDP1	0,94	2,29E-03	2,50E-02	C29H11orf24	-1,18	5,68E-04	7,78E-03
RFC2	0,93	3,15E-04	4,58E-03	NPR2	-1,17	2,46E-03	2,65E-02
CASP2	0,93	1,49E-03	1,76E-02	CXCL3	-1,17	9,61E-06	1,99E-04
TMEM97	0,93	3,67E-04	5,23E-03	SULT1A1	-1,17	1,27E-03	1,55E-02
PTMA	0,92	2,92E-04	4,29E-03	ARRDC4	-1,17	1,70E-03	1,96E-02
FCAR	0,92	9,25E-04	1,19E-02	DHRS1	-1,16	6,50E-05	1,10E-03
CDK5RAP2	0,92	2,04E-03	2,29E-02	TMCO4	-1,16	8,75E-05	1,45E-03
RGS20	0,92	4,06E-03	4,04E-02	TEF	-1,16	2,72E-03	2,88E-02
MVK	0,92	3,62E-03	3,70E-02	NEURL1	-1,16	2,53E-03	2,71E-02
HMGA1	0,91	8,95E-04	1,16E-02	AES	-1,16	2,04E-04	3,14E-03
CCND3	0,91	7,53E-04	9,97E-03	MTHFS	-1,16	2,61E-05	4,87E-04
RNF157	0,91	1,53E-03	1,79E-02	ARSG	-1,15	5,21E-04	7,17E-03
SLC46A1	0,90	8,02E-04	1,06E-02	NHLRC1	-1,14	3,50E-03	3,59E-02
H2AFV	0,90	1,12E-03	1,39E-02	LOC530348	-1,13	2,54E-03	2,72E-02
SLC39A6	0,90	4,35E-03	4,29E-02	CATSPERD	-1,13	1,41E-03	1,68E-02
HMG2	0,89	2,92E-04	4,29E-03	ptafr	-1,13	2,12E-05	4,03E-04
C11H9orf16	0,89	1,77E-03	2,02E-02	PYCR1	-1,12	7,62E-05	1,27E-03
DDT	0,88	1,05E-03	1,32E-02	BHLHE40	-1,12	1,97E-04	3,06E-03
PDIA5	0,87	3,37E-03	3,49E-02	ZACN	-1,12	2,04E-03	2,29E-02
TM6SF2	0,86	4,88E-03	4,71E-02	ERMARD	-1,11	8,59E-04	1,12E-02
PCNT	0,86	1,00E-03	1,27E-02	CA12	-1,11	4,90E-03	4,72E-02
mcp1	0,86	3,60E-03	3,68E-02	SLC25A33	-1,11	1,05E-03	1,32E-02
PAXIP1	0,86	3,94E-03	3,96E-02	CDHR5	-1,11	2,12E-03	2,36E-02
VRK1	0,85	2,30E-03	2,50E-02	LONP2	-1,11	7,96E-05	1,32E-03
DOCK2	0,85	2,02E-03	2,27E-02	NEK3	-1,11	1,38E-03	1,65E-02
POLD3	0,85	3,08E-03	3,22E-02	TSTD3	-1,10	3,79E-03	3,83E-02
CEP78	0,85	4,81E-03	4,65E-02	NDUFA4	-1,09	1,58E-03	1,84E-02
coro1a	0,85	1,38E-03	1,65E-02	SDS	-1,09	2,35E-03	2,55E-02
CDC23	0,84	4,93E-03	4,74E-02	PSAT1	-1,09	3,43E-03	3,55E-02
AAAS	0,84	5,15E-03	4,91E-02	TRAF1	-1,08	3,46E-03	3,56E-02
TTF2	0,83	1,77E-03	2,02E-02	ATP6V0A1	-1,08	6,81E-04	9,11E-03
PAICS	0,83	4,62E-03	4,51E-02	MAPK12	-1,08	1,15E-03	1,41E-02
DEK	0,83	2,22E-03	2,45E-02	TNS2	-1,06	7,16E-04	9,52E-03
RANGAP1	0,82	4,22E-03	4,17E-02	SNAI1	-1,06	2,13E-03	2,36E-02
RBBP8	0,82	2,72E-03	2,88E-02	CDC42EP4	-1,06	4,18E-04	5,88E-03
NCAPH2	0,81	3,97E-03	3,97E-02	SMOX	-1,06	2,24E-03	2,45E-02
HMGB1	0,80	1,80E-03	2,05E-02	GTF3C1	-1,05	9,02E-05	1,49E-03
SLBP	0,80	1,49E-03	1,76E-02	KIAA0513	-1,05	4,07E-03	4,05E-02
CPPED1	0,79	3,46E-03	3,56E-02	TEAD3	-1,04	1,32E-03	1,59E-02
PRIM1	0,79	2,29E-03	2,50E-02	SLC25A19	-1,04	2,03E-04	3,12E-03
FLVCR2	0,78	3,82E-03	3,84E-02	LOC508153	-1,04	5,73E-04	7,83E-03
ADSL	0,78	3,12E-03	3,25E-02	ESPNL	-1,04	5,25E-03	4,99E-02
ALDH16A1	0,78	1,95E-03	2,21E-02	MAP3K15	-1,03	1,13E-03	1,40E-02
BUB3	0,77	3,44E-03	3,55E-02	ACTRT3	-1,03	4,73E-03	4,60E-02
CCDC82	0,74	4,83E-03	4,67E-02	NXN	-1,03	3,64E-03	3,72E-02
NCKAP5L	0,73	5,10E-03	4,86E-02	PCOLCE	-1,02	4,94E-03	4,75E-02
WBSCR22	0,73	4,44E-03	4,35E-02	NFU1	-1,02	7,92E-04	1,04E-02
PLP2	0,71	5,01E-03	4,80E-02	PDHA1	-1,02	2,63E-04	3,93E-03
RTN4	0,70	4,12E-03	4,09E-02	NOD2	-1,02	1,68E-03	1,94E-02

PRDX6	0,70	4,42E-03	4,35E-02	SNN	-1,01	2,28E-03	2,49E-02
				EHF	-1,01	1,38E-03	1,65E-02
				IGSF6	-1,00	2,56E-04	3,85E-03
				MVB12A	-1,00	2,64E-04	3,94E-03
				DGKD	-1,00	5,95E-05	1,01E-03
				P3H3	-1,00	1,31E-03	1,59E-02
				DSTN	-1,00	1,25E-03	1,52E-02
				CCPG1	-0,99	4,05E-03	4,03E-02
				IRAK2	-0,99	1,36E-03	1,63E-02
				GABARAPL1	-0,98	3,32E-03	3,45E-02
				TSC22D3	-0,98	4,01E-03	4,00E-02
				CXCL16	-0,98	9,37E-04	1,20E-02
				AOC2	-0,97	3,24E-03	3,37E-02
				PARP3	-0,96	1,93E-03	2,19E-02
				TNIP1	-0,96	1,91E-03	2,17E-02
				HOMER3	-0,96	2,20E-03	2,42E-02
				TMEM134	-0,96	4,16E-03	4,12E-02
				TNFAIP3	-0,95	3,67E-03	3,74E-02
				SYTL4	-0,95	4,77E-03	4,63E-02
				CD81	-0,95	8,87E-04	1,15E-02
				FBXL20	-0,95	3,81E-03	3,84E-02
				ATF3	-0,94	9,83E-04	1,25E-02
				NQO1	-0,94	1,62E-03	1,88E-02
				CCDC85B	-0,92	1,99E-03	2,24E-02
				ZCCHC17	-0,92	3,65E-04	5,21E-03
				MIR147	-0,92	5,06E-03	4,84E-02
				TLR4	-0,91	2,24E-03	2,45E-02
				ICAM1	-0,90	1,25E-03	1,52E-02
				BCAR1	-0,90	1,74E-03	1,99E-02
				CCL24	-0,90	3,69E-03	3,75E-02
				DOCK6	-0,89	1,56E-03	1,83E-02
				SCLY	-0,89	2,46E-03	2,65E-02
				DNAH17	-0,89	1,80E-03	2,05E-02
				ZDHHC7	-0,88	1,12E-03	1,39E-02
				TMEM106A	-0,88	2,85E-03	2,99E-02
				FAH	-0,88	3,70E-03	3,75E-02
				IL17RC	-0,88	1,23E-03	1,50E-02
				ABHD8	-0,87	1,18E-03	1,45E-02
				TMEM9	-0,87	4,57E-03	4,47E-02
				PLBD2	-0,87	6,97E-04	9,29E-03
				TMEM63A	-0,87	2,66E-03	2,83E-02
				BCL9L	-0,87	8,34E-04	1,09E-02
				THEMIS2	-0,86	7,74E-04	1,02E-02
				ZNF177	-0,86	4,79E-03	4,64E-02
				MICU1	-0,86	1,57E-03	1,83E-02
				ITPKC	-0,85	3,69E-03	3,75E-02
				TMEM145	-0,85	3,36E-03	3,49E-02
				SLC3A2	-0,85	2,13E-03	2,36E-02
				ALDH2	-0,84	4,22E-03	4,17E-02
				PFKFB4	-0,84	1,07E-03	1,34E-02
				SLC11A1	-0,84	1,49E-03	1,76E-02
				SH3TC1	-0,84	2,00E-03	2,25E-02
				LTBP3	-0,83	2,50E-03	2,68E-02
				KDM6B	-0,83	8,45E-04	1,10E-02

IL2RG	-0,83	3,46E-03	3,56E-02
IMPDH1	-0,82	1,73E-03	1,99E-02
WDR59	-0,82	5,02E-03	4,80E-02
LITAF	-0,82	4,08E-03	4,05E-02
IGHMBP2	-0,82	2,85E-03	3,00E-02
MADD	-0,82	1,79E-03	2,05E-02
NFKBIE	-0,81	1,66E-03	1,92E-02
BBS4	-0,81	2,08E-03	2,32E-02
RRAGA	-0,81	1,14E-03	1,41E-02
NFKBID	-0,80	4,99E-03	4,79E-02
SCFD2	-0,80	4,36E-03	4,30E-02
TTF1	-0,80	4,74E-03	4,60E-02
EPS15L1	-0,80	1,84E-03	2,10E-02
LOC100336606	-0,79	2,40E-03	2,59E-02
APP	-0,78	3,68E-03	3,75E-02
CSTB	-0,77	4,47E-03	4,37E-02
TPCN2	-0,77	2,25E-03	2,47E-02
NFKB2	-0,76	2,44E-03	2,63E-02
OGT	-0,76	4,34E-03	4,28E-02
ABCA3	-0,72	4,01E-03	4,01E-02

APÊNDICE D - Lista de DEGs do contraste taurinos *versus* zebuínos tratados com saliva do carrapato *R. microplus*

Genes upregulated				Genes down-regulated			
Gene	logFC	p-value	FDR	Gene	logFC	p-value	FDR
CREB3L3	6,54	7,48E-11	6,13E-08	PTGDS	-11,13	3,43E-11	3,28E-08
AOX1	5,80	1,61E-10	1,15E-07	UPB1	-8,05	1,39E-13	3,20E-10
LOC539009	4,95	1,14E-14	3,28E-11	SAA2	-6,52	2,37E-08	1,36E-05
LOC526163	4,24	2,13E-08	1,29E-05	IFITM2	-6,11	6,77E-13	1,11E-09
SBSN	4,06	3,54E-07	1,35E-04	BOLA-DQA2	-5,58	1,18E-05	2,75E-03
MCF2L2	3,86	1,15E-10	8,77E-08	RSAD2	-5,37	2,92E-06	9,29E-04
LOC515676	3,78	6,38E-08	3,33E-05	SYT4	-5,25	3,73E-17	2,14E-13
fam101a	3,77	6,68E-08	3,33E-05	CD38	-5,12	1,64E-12	2,10E-09
C1QL1	3,75	9,60E-07	3,24E-04	BOLA-DQA5	-4,74	8,84E-05	1,18E-02
TGM3	3,74	1,00E-07	4,60E-05	SLC28A3	-4,59	1,28E-07	5,66E-05
CRYM	3,35	2,07E-05	4,10E-03	LOXL4	-4,09	4,22E-05	6,81E-03
LOC101906221	3,35	6,79E-07	2,44E-04	LOC107131250	-4,08	7,31E-05	1,06E-02
timd4	3,22	3,66E-04	3,59E-02	ABCB1	-4,00	3,73E-11	3,29E-08
MARCO	3,06	5,06E-06	1,42E-03	GBP4	-3,92	7,78E-05	1,09E-02
TRPM2	3,02	6,12E-05	9,00E-03	CMPK2	-3,54	9,13E-05	1,19E-02
FCER2	3,00	1,37E-05	3,06E-03	CLEC4F	-3,50	4,65E-04	4,07E-02
LOC101902787	2,95	5,20E-07	1,92E-04	LOC100139670	-3,48	1,43E-05	3,06E-03
ANGPT2	2,88	2,52E-05	4,74E-03	HSH2D	-3,44	1,76E-05	3,61E-03
GPR19	2,76	9,30E-06	2,27E-03	PLD4	-3,21	4,41E-06	1,30E-03
LOC614531	2,70	1,84E-06	6,04E-04	ISG15	-3,21	5,16E-05	7,90E-03
CARD11	2,69	5,10E-05	7,90E-03	TREML2	-3,20	8,48E-13	1,22E-09
E2F8	2,66	3,81E-05	6,33E-03	MMP25	-3,17	2,27E-13	4,34E-10
TRPC6	2,66	3,70E-05	6,27E-03	IL1RN	-3,12	3,33E-05	5,98E-03
MXD3	2,56	2,56E-04	2,69E-02	CD180	-3,04	8,92E-05	1,18E-02
SAPCD2	2,51	6,09E-04	4,78E-02	PTGR1	-3,03	3,01E-11	3,14E-08
LOC533307	2,47	8,77E-05	1,18E-02	LOC107131205	-2,85	5,01E-04	4,23E-02
CDKN2C	2,38	9,72E-05	1,24E-02	brb	-2,78	2,82E-05	5,14E-03
HOGA1	2,35	8,96E-05	1,18E-02	CDH23	-2,75	2,59E-05	4,79E-03
CDKN3	2,35	1,08E-04	1,32E-02	tmem150c	-2,74	6,65E-04	4,98E-02
SLC25A35	2,35	4,74E-06	1,36E-03	CCR5	-2,71	1,45E-05	3,06E-03
TAGAP	2,33	5,67E-06	1,55E-03	PADI6	-2,58	1,97E-04	2,22E-02
STMN1	2,32	1,27E-04	1,51E-02	TSPAN13	-2,55	4,11E-06	1,24E-03
TCF19	2,23	4,84E-04	4,15E-02	LOC507055	-2,54	1,42E-04	1,66E-02
UHRF1	2,11	5,20E-04	4,32E-02	LOC100298356	-2,52	2,34E-04	2,53E-02
LOC529196	2,11	6,72E-06	1,75E-03	SLC13A3	-2,48	3,70E-05	6,27E-03
PTER	2,09	4,73E-08	2,58E-05	USP18	-2,44	4,52E-04	3,99E-02
CLEC3B	2,09	2,14E-05	4,16E-03	LTBP4	-2,30	1,62E-04	1,86E-02
KIF15	2,08	5,72E-04	4,65E-02	TNK1	-2,29	5,94E-05	8,85E-03
arhgap33	2,07	3,79E-04	3,63E-02	NDUFA4L2	-2,26	3,11E-07	1,23E-04
ASPM	2,04	1,07E-04	1,32E-02	PIEZO2	-2,24	2,49E-04	2,67E-02
KIAA0101	2,04	3,89E-04	3,63E-02	CDH15	-2,22	1,75E-04	1,99E-02
CENPF	2,02	7,69E-05	1,09E-02	LRRC31	-2,11	5,82E-04	4,66E-02
FAM83D	1,93	4,38E-04	3,95E-02	CLU	-2,10	4,41E-04	3,95E-02
KIFC1	1,90	4,72E-04	4,10E-02	PLAC8	-2,07	4,81E-04	4,15E-02
CDC48	1,90	6,37E-04	4,85E-02	DNAJC6	-2,03	1,44E-04	1,66E-02
KIF14	1,86	3,50E-04	3,52E-02	SDS	-2,00	4,94E-05	7,76E-03
CIT	1,83	2,53E-04	2,69E-02	EGLN3	-2,00	3,49E-05	6,16E-03
FOS	1,82	1,94E-05	3,90E-03	ATP8B1	-1,99	3,55E-04	3,54E-02
HACD4	1,80	9,65E-06	2,31E-03	LOC511531	-1,94	1,00E-04	1,25E-02

NCAPH	1,80	5,85E-04	4,66E-02	SLC13A5	-1,81	4,45E-04	3,95E-02
RGS1	1,75	2,24E-05	4,27E-03	bolA	-1,77	1,33E-04	1,57E-02
SPC25	1,72	3,74E-04	3,60E-02	BOLA-NC1	-1,68	2,19E-04	2,41E-02
RARRES1	1,68	7,48E-05	1,07E-02	IFITM3	-1,68	2,34E-04	2,53E-02
LMNB1	1,67	2,68E-04	2,79E-02	TNFRSF10D	-1,62	4,40E-04	3,95E-02
CCHCR1	1,66	6,27E-04	4,83E-02	CD82	-1,53	4,32E-04	3,95E-02
EGR1	1,60	6,22E-04	4,82E-02	TMEM150A	-1,53	3,62E-04	3,57E-02
FCAR	1,59	4,37E-05	6,96E-03	TRMT44	-1,38	4,13E-04	3,82E-02
ZNF385A	1,55	6,12E-06	1,63E-03	CTSK	-1,36	3,10E-04	3,18E-02
TMEM47	1,50	6,00E-04	4,74E-02	VEGFA	-1,27	6,38E-04	4,85E-02
hirip3	1,49	2,16E-04	2,40E-02				
slc35a1	1,48	1,32E-05	3,02E-03				
PCNA	1,39	6,13E-04	4,78E-02				
cdc25b	1,37	5,14E-04	4,31E-02				
PAM	1,30	5,53E-04	4,57E-02				
DDT	1,27	3,87E-04	3,63E-02				
NMRAL1	1,26	5,71E-04	4,65E-02				
cpt2	1,17	3,16E-04	3,21E-02				

APÊNDICE E - Lista de DEGs compartilhados entre macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com controle negativo e LPS

ID do Gene	Descrição do gene	Expressão no Holandês	
		Controle negativo	LPS
<i>ECE1</i>	<i>endothelin converting enzyme 1</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>SCIN</i>	<i>scinderin</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>TUBB2B</i>	<i>tubulin, beta 2B class lib</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>BFSP2</i>	<i>beaded filament structural protein 2</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>PTGS2</i>	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>TGM3</i>	<i>transglutaminase 3</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>PADI4</i>	<i>peptidyl arginine deiminase 4</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>OCSTAMP</i>	<i>osteoclast stimulatory transmembrane protein</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>CARD14</i>	<i>caspase recruitment domain family member 14</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>LOC530348</i>	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>HSF2BP</i>	<i>heat shock transcription factor 2 binding protein</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>P2RY11</i>	<i>purinergic receptor P2Y11</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>

APÊNDICE F - Lista de DEGs compartilhados entre os macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com controle negativo e saliva de *R. microplus*

ID do Gene	Descrição do gene	Expressão no Holandês	
		Controle negativo	Saliva
<i>BRB</i>	<i>brain ribonuclease</i>	Down	Down
<i>CCR5</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 5</i>	Down	Down
<i>CDC25B</i>	<i>cell division cycle 25B</i>	Up	Up
<i>SLC13A5</i>	<i>solute carrier family 13 member 5</i>	Down	Down
<i>RARRES1</i>	<i>retinoic acid receptor responder 1</i>	Up	Up
<i>TNK1</i>	<i>tyrosine kinase non receptor 1</i>	Down	Down
<i>BOLA-NC1</i>	<i>non-classical MHC class I antigen</i>	Down	Down
<i>CTSK</i>	<i>cathepsin K</i>	Down	Down
<i>CCHCR1</i>	<i>coiled-coil alpha-helical rod protein 1</i>	Up	Up
<i>TCF19</i>	<i>transcription factor 19</i>	Up	Up
<i>CARD11</i>	<i>caspase recruitment domain family member 11</i>	Up	Up
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	Up	Up
<i>CLEC3B</i>	<i>C-type lectin domain family 3 member B</i>	Up	Up
<i>TSPAN13</i>	<i>tetraspanin 13</i>	Down	Down
<i>KIF14</i>	<i>kinesin family member 14</i>	Up	Up
<i>BOLA</i>	<i>non-classical MHC class I antigen</i>	Down	Down
<i>MXD3</i>	<i>MAX dimerization protein 3</i>	Up	Up
<i>CD180</i>	<i>CD180 molecule</i>	Down	Down
<i>ZNF385A</i>	<i>zinc finger protein 385A</i>	Up	Up
<i>LMNB1</i>	<i>lamin B1</i>	Up	Up
<i>GPR19</i>	<i>G protein-coupled receptor 19</i>	Up	Up
<i>KIF15</i>	<i>kinesin family member 15</i>	Up	Up
<i>ATP8B1</i>	<i>ATPase phospholipid transporting 8B1</i>	Down	Down
<i>NDUFA4L2</i>	<i>NDUFA4, mitochondrial complex associated like 2</i>	Down	Down
<i>CDKN3</i>	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 3</i>	Up	Up
<i>HACD4</i>	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 4</i>	Up	Up
<i>LRRC31</i>	<i>leucine rich repeat containing 31</i>	Down	Down
<i>CDH23</i>	<i>cadherin related 23</i>	Down	Down
<i>E2F8</i>	<i>E2F transcription factor 8</i>	Up	Up
<i>PLD4</i>	<i>phospholipase D family member 4</i>	Down	Down
<i>LOC100139670</i>	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	Down	Down
<i>LOC101902787</i>	<i>dynein light chain Tctex-type 1 pseudogene</i>	Up	Up
<i>LOC101906221</i>	<i>60S ribosomal protein L36a-like</i>	Up	Up

APÊNDICE G - Lista de DEGs compartilhados entre os macrófagos de taurinos e zebuínos tratados com saliva de *R. microplus* e LPS

ID do Gene	Descrição do gene	Expressão no Holandês	
		LPS	Saliva
<i>PAM</i>	<i>peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>FCER2</i>	<i>Fc fragment of IgE receptor II</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>MARCO</i>	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>LOC507055</i>	<i>guanylate-binding protein 4</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>RGS1</i>	<i>regulator of G-protein signaling 1</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>GBP4</i>	<i>guanylate binding protein 4</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>DDT</i>	<i>D-dopachrome tautomerase</i>	<i>Up</i>	<i>Up</i>
<i>CMPK2</i>	<i>cytidine/uridine monophosphate kinase 2</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>LOC100298356</i>	<i>bone marrow stromal antigen 2</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>
<i>LOC107131205</i>	<i>lysine-specific demethylase 6A-like</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>