

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE VIAS IMUNOLÓGICAS
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI:
IXODIDAE) À INFECÇÃO POR *Theileria equi* (PIROPLASMIDA:
THEILERIDAE)**

Carla Alves Rabello

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE VIAS IMUNOLÓGICAS
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI:
IXODIDAE) À INFECÇÃO POR *Theileria equi* (PIROPLASMIDA:
THEILERIDAE)**

CARLA ALVES RABELLO

Sob a orientação do Professor

Huarrisson Azevedo Santos

Sob coorientação da Dr.^a

Patrícia Gonzaga Paulino

Dissertação submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Mestre** em
Ciências no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R114e Rabello, Carla Alves, 1999-
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE VIAS IMUNOLÓGICAS
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA DE *Rhipicephalus microplus*
(ACARI: IXODIDAE) À INFECÇÃO POR *Theileria equi*
(PIROPLASMIDA: THEILERIDAE) / Carla Alves Rabello.
- São José do Vale do Rio Preto, 2025.
118 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Patricia Gonzaga Paulino.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2025.

1. Piroplasmose equina. 2. *Rhipicephalus*
microplus. 3. *Theileria equi*. 4. Interação patógeno
vetor. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient.
II. Gonzaga Paulino, Patricia, 1990-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE
JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**



ATA Nº 540 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.010110/2025-79

Seropédica-RJ, 28 de fevereiro de 2025.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARLA ALVES RABELLO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2025

(Assinado digitalmente em 07/03/2025 20:00)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS

*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###014#2*

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 16:49)

PATRICIA SILVA GOLO

*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
AI-UFRRJ (12.28.01.00.00.50)
Matrícula: ###218#5*

(Assinado digitalmente em 10/03/2025 09:53)

RODRIGO MACIEL DA COSTA GODINHO

*ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.717-##*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **540**, ano: **2025**, tipo: **ATA**, data de emissão: **28/02/2025** e o código de verificação: **13e61b5063**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor, Ele a quem pertence toda a ciência, e toda a sabedoria intrínseca à natureza, sem Ele nada haveria de ser estudado. Grata por ser meu amparo por toda a eternidade.

A minha família, que representa tudo para mim e a qual tenho a sorte de pertencer, agradeço pelo apoio incondicional, por me incentivarem a acreditar nos meus planos e sonhos, e por serem sempre minha segurança nos períodos de tormenta.

As minhas amigas Mikaella, Grazielle, Livia, Helena e Eduarda, as quais genuinamente torcem pelas minhas conquistas e se orgulham do caminho que venho trilhando.

Ao Luis Felipe, meu melhor amigo, um dos maiores presentes que eu tive a sorte de receber ao longo da minha existência, e que palavras não são suficientes para expressar minha gratidão à vida pela sua presença junto a minha.

À Karina, minha eterna parceira de Iniciação Científica, que se tornou uma das minhas melhores amigas. Agradeço por ser meu apoio em todos os sentidos durante todo o desenvolvimento deste trabalho, sua presença foi e é imprescindível para mim. Nossa amizade foi o maior presente que a vida acadêmica poderia ter me concedido. Este trabalho também é seu.

Ao Nelson, que assim como a Karina se tornou um dos meus melhores amigos. Agradeço por ser meu companheiro, meu refúgio nos dias difíceis e minha alegria nos dias felizes. Amo a sua vida e amo a nossa amizade.

À Pamella, Laís e Thamires, meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio, pelas palavras de consolo e pelos momentos de alegria. Levarei a nossa amizade para sempre, com muito carinho.

Ao meu orientador, Prof^o Huarrisson, por ter acreditado nos meus objetivos e no meu potencial, por confiar a mim o desenvolvimento deste projeto tão enriquecedor, por estar sempre presente e por transmitir o prazer em trabalhar e contribuir para o desenvolvimento científico do país.

A minha coorientadora Dr^a Patrícia, que foi uma mãe científica para mim, e por quem eu cultivo grande admiração e carinho. Seu conhecimento transmitido desde a iniciação científica, a sua presença e comprometimento no desenrolar deste trabalho e o seu cuidado

como mentora foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional. Serei genuinamente e eternamente grata por tudo, e certamente levarei seus ensinamentos ao longo de toda a minha vida.

Aos equinos utilizados neste experimento, Isadora e Esmeralda, e ao Zeca, responsável pelo cuidado dos animais, por toda a dedicação e apoio durante este trabalho.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de Mestrado Faperj Nota 10. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) dos quais eu tive a oportunidade de ser aluna em diferentes disciplinas, e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por ser minha casa durante todo esse tempo.

Aos que não foram citados, mas de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, minha mais profunda gratidão.

RESUMO GERAL

RABELLO, Carla Alves. **Expressão diferencial de genes de vias imunológicas envolvidas na resposta de *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) à infecção por *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE).** 2025. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Theileria equi é um protozoário intraeritrocítico causador da piroplasmose equina, uma doença que acomete equídeos e é responsável por gerar prejuízos à saúde e à economia do setor equestre mundialmente. No Brasil, *Rhipicephalus microplus* é a única espécie de carrapato com capacidade de atuar como vetor de *T. equi* em condições experimentais. Contudo, os mecanismos envolvidos nesta interface patógeno-vetor ainda não foram completamente esclarecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo redox e nas principais vias de sinalização imunológica de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*. Para isso, um equino portador crônico de *T. equi* (controle positivo) e um equino não infectado (controle negativo) foram infestados com larvas de *R. microplus* livres de patógenos. Após o período de fixação e repasto sanguíneo, larvas e ninfas inteiras foram coletadas e armazenadas individualmente, enquanto as fêmeas foram dissecadas e o intestino e a glândula salivar de cada exemplar foi armazenado de forma individual. Em seguida, foi feita a extração do RNA e a síntese do cDNA de cada amostra, os quais foram submetidos ao ensaio de expressão gênica relativa através da qPCR. No primeiro capítulo, foram analisados genes relacionados ao metabolismo redox de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*. Assim, observou-se uma regulação positiva tanto de genes pró-oxidantes quanto de genes antioxidantes no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas infectadas por *T. equi*, com destaque para os genes que codificam para as enzimas dual oxidases (pró-oxidante) e catalase (antioxidante), sendo ambos mais expressos no grupo infectado. Na glândula salivar, porém, o gene que codifica para a enzima glutathione-S-transferase foi significativamente suprimido no grupo infectado, sugerindo que tal enzima pode ter papel fundamental na resposta antioxidante neste tecido. Nos estágios de larva e ninfa não foi observada uma resposta oxidativa significativa. No segundo capítulo, foram analisados genes envolvidos nas vias de sinalização imunológica Toll, IMD e JAK/STAT, além de genes que codificam para os peptídeos antimicrobianos microplusina, defensina e ixodidina. A infecção por *T. equi* estimulou a ativação das vias Toll e IMD no intestino e na glândula salivar de *R. microplus*, resultando em uma regulação positiva dos genes *microplusina* e *defensina* em ambos os tecidos. A via JAK/STAT, contudo, foi modulada negativamente no intestino em resposta à infecção por *T. equi*, o que pode ter ocasionado a expressão diferencial não significativa do gene *ixodidina* observada neste tecido. Nos estágios de larva e ninfa não foi observada uma resposta significativa à infecção por *T. equi* através das vias analisadas. Os resultados obtidos neste estudo permitem elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre *T. equi* e *R. microplus*, contribuindo para uma melhor compreensão acerca de como o carrapato responde à infecção pelo protozoário. Tais informações auxiliam na identificação de moléculas-chave com potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle da piroplasmose equina no país.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, *Rhipicephalus microplus*, interação patógeno-vetor

GENERAL ABSTRACT

RABELLO, Carla Alves. **Differential expression of immune pathways genes in the tick *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) in response to *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE) infection.** 2025. 116p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Theileria equi is an intraerythrocytic protozoan that causes equine piroplasmosis, a disease that affects equids and is responsible for significant health and economic losses to the global equine industry. In Brazil, *Rhipicephalus microplus* is the only tick species experimentally proven to act as a vector for *T. equi*. However, the mechanisms involved in this pathogen-vector interaction have not yet been fully elucidated. Therefore, the aim of this study was to analyze the differential expression of genes involved in redox metabolism and the main immune signaling pathways of *R. microplus* in response to *T. equi* infection. For this, a chronically infected equine with *T. equi* (positive control) and a non-infected equine (negative control) were infested with pathogen-free larvae of *R. microplus*. After the fixation and blood feeding period, whole larvae and nymphs were collected and stored individually, while the females were dissected, and the midgut, ovary, and salivary gland of each specimen were stored separately. RNA was then extracted, and cDNA was synthesized from each sample, followed by relative gene expression assays. In the first chapter, genes related to the redox metabolism of *R. microplus* in response to *T. equi* infection were analyzed. A upregulation of both pro-oxidant and antioxidant genes was observed in the midgut and salivary gland of engorged females infected by *T. equi*, with a particular emphasis on the genes encoding the enzymes dual oxidases (pro-oxidant) and catalase (antioxidant), both being more expressed in the infected group. However, in the salivary gland, the gene encoding the enzyme glutathione-S-transferase was significantly suppressed in the infected group, suggesting that this enzyme may play a key role in the antioxidant response in this tissue. No significant oxidative response was observed in the larval and nymph stages, nor in the ovaries of engorged females. In the second chapter, genes involved in the Toll, IMD, and JAK/STAT immune signaling pathways, as well as genes encoding the antimicrobial peptides microplusin, defensin, and ixodidin, were analyzed. *T. equi* infection stimulated the activation of the Toll and IMD pathways in the midgut and salivary gland of *R. microplus*, resulting in a positive regulation of the *microplusin* and *defensin* genes in both tissues. However, the JAK/STAT pathway was suppressed in the midgut in response to *T. equi* infection, which may have led to the non-significant differential expression of the *ixodidin* gene observed in this tissue. No significant response to *T. equi* infection through the analyzed pathways was observed in the larval and nymph stages, nor in the ovaries of engorged females. The results obtained in this study provide insights into the molecular mechanisms involved in the interaction between *T. equi* and *R. microplus*, contributing to a better understanding of how the tick responds to protozoan infection. Such information aids in identifying key molecules with potential to be used in the development of new strategies for the prevention and control of equine piroplasmosis in the country.

Keywords: Equine piroplasmosis, *Rhipicephalus microplus*, pathogen-vector interface

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Cq	“quantification cycle”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etileno-Amino-Tetracético
g	força gravitacional
h	hora
HCL	Ácido Clorídrico
M	Molar
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
ng	nanograma
nM	nanomolar
<i>p</i>	p-valor
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	segundos
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
μL	microlitro
°C	Celsius

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Genes envolvidos no metabolismo redox do carrapato *Rhipicephalus microplus* selecionados para análise de expressão gênica diferencial.

CAPÍTULO II

Quadro 1. Genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológicas do carrapato *Rhipicephalus microplus* selecionados para análise de expressão gênica diferencial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa representando o formato de “cruz de Malta” dos merozoítos de *T. equi*. Adaptado de Onyiche et al. (2019).

Figura 2. Distribuição global dos diferentes genótipos de *T. equi* com base na região hipervariável do gene 18s rRNA. O mapa foi construído baseado em estudos onde a detecção de *T. equi* foi realizada em sangue de equinos através de métodos moleculares e sorológicos no período correspondente aos anos 2000-2019. Tirosh-Levy et al., 2020.

Figura 3. Representação da adaptabilidade global de *R. microplus* desenvolvida de acordo com o modelo de nicho ecológico. Marques et al., 2020.

Figura 4. Representação dos componentes da via de sinalização NF- κ B/Toll em carrapatos. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via. Paulino et al., 2022.

Figura 5. Representação dos componentes das vias de sinalização IMD e JNK em carrapatos. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via. Adaptado de Paulino et al., 2022.

Figura 6. Representação dos componentes das vias de sinalização JAK/STAT. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via, enquanto o componente de cor neutra não foi descrito ainda em carrapatos. Imagem criada com a ferramenta BioRender.com. Adaptado de Fogaça e colaboradores (2021).

Figura 7. Representação gráfica das enzimas envolvidas no metabolismo de oxidorredução. Esquema desenvolvido através da ferramenta BioRender.com

CAPÍTULO I

Figura 1. Linha temporal evidenciando as fases do período de infestação onde foram coletadas as larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em equinos cronicamente infectados por *Theileria equi*. O esquema foi criado através da ferramenta BioRender.com.

Figura 2. Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução nos estágios de larva e ninfa do carrapato *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. Genes pró-oxidantes: CUZN = cobre-zinco superóxido dismutase; DUOX-1 = dual oxidase-1; DUOX-2 = dual oxidase-2; EROI = oxirredutase do retículo endoplasmático. Genes antioxidantes: GST-1 = glutathione-s-transferase-1; GPX = glutathione peroxidase; PHGPX = fosfolípideo hidroperóxido glutathione peroxidase; PRX = peroxirredoxina; TRX = tiorredoxina; TRXR = tiorredoxina redutase; CAT = catalase

Figura 3. Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. Genes pró-oxidantes: CUZN = cobre-zinco superóxido dismutase; DUOX-1 = dual oxidase-1; DUOX-2 = dual oxidase-2; EROI = oxirredutase do retículo endoplasmático. Genes antioxidantes: GST-1 = glutathione-s-transferase-1; GPX = glutathione peroxidase; PHGPX = fosfolípideo hidroperóxido glutathione peroxidase; PRX = peroxirredoxina; TRX = tiorredoxina; TRXR = tiorredoxina redutase; CAT = catalase

CAPÍTULO II

Figura 1. Linha temporal evidenciando as fases do período de infestação onde foram coletadas as larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em equinos cronicamente infectados por *Theileria equi*. O esquema foi criado através da ferramenta BioRender.com.

Figura 2. Expressão gênica diferencial dos genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica nos estágios de larva e ninfa de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *TOLL* = receptor Toll; *DORSAL* = fator de transcrição Dorsal; *PGRP* = proteína de reconhecimento de peptidoglicano; *RELISH* = fator de transcrição Relish; *JAK* = janus kinase; *STAT* = transdutor de sinal e ativador de transcrição.

Figura 3. Expressão gênica diferencial dos genes que codificam para peptídeos antimicrobianos nos estágios de larva e ninfa de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *MIC* = microplusina; *DEF* = defensina; *IXO* = ixodidina

Figura 4. Expressão gênica diferencial dos genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *TOLL* = receptor Toll; *DORSAL* = fator de transcrição Dorsal; *PGRP* = proteína de reconhecimento de peptidoglicano; *RELISH* = fator de transcrição Relish; *JAK* = janus kinase; *STAT* = transdutor de sinal e ativador de transcrição.

Figura 5. Expressão gênica diferencial dos genes que codificam para peptídeos antimicrobianos no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *MIC* = microplusina; *DEF* = defensina; *IXO* = ixodidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 <i>Theileria equi</i> (Laveran, 1901)	4
2.1.1 Visão geral e taxonomia	4
2.1.2 Hospedeiros e ciclo biológico	5
2.1.3 Distribuição global de <i>T. equi</i> e fatores de risco associados à infecção	6
2.1.4 Impactos à saúde animal relacionados à infecção por <i>T. equi</i>	7
2.1.5 Tratamento, prevenção e controle da piroplasmose equina	8
2.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887)	9
2.2.1 Visão geral e taxonomia	9
2.2.2 Hospedeiros e ciclo biológico	10
2.2.3 Distribuição e importância de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> no Brasil e no mundo	11
2.3 Mecanismos humorais de resposta à infecção em carrapatos	12
2.3.1 Visão geral	12
2.3.2 Principais vias de sinalização imunológica em carrapatos	13
2.3.3 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)	18
2.3.4 Metabolismo de oxidorredução	20
CAPÍTULO I	25
Expressão Diferencial de Genes Envolvidos no Metabolismo de Oxidorredução nos Diferentes Estágios Evolutivos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) em Resposta à Infecção por <i>Theileria equi</i> (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE)	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Comitê de Ética	31
2.2 Local do estudo	31
2.3 Manutenção dos equinos	31
2.4 Coleta de sangue dos animais	31
2.5 Criação e manutenção das colônias de carrapato livre de <i>T. equi</i>	32
2.6 Obtenção de larvas, ninfas e tecidos (glândulas salivares e intestino) de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	32

2.6.1 Infestação e coleta dos carrapatos	32
2.6.2 Higienização, dissecação e acondicionamento das amostras	32
2.7 Extração de DNA total das amostras de sangue equino	33
2.8 Extração de RNA total das amostras de carrapato	34
2.9 Síntese de cDNA a partir do RNA extraído das amostras de carrapato	35
2.10 Detecção e quantificação de <i>T. equi</i> a partir de amostras de DNA total de sangue equino e do cDNA das amostras de carrapato	35
2.11 Ensaio de expressão gênica	36
2.12 Análise estatística	37
3 RESULTADOS	38
3.1 Carga parasitária de <i>T. equi</i> em larvas, ninfas e tecidos de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	38
3.2 Expressão gênica diferencial em larvas inteiras de <i>R. microplus</i>	38
3.3 Expressão gênica diferencial em ninfas inteiras de <i>R. microplus</i>	38
3.4 Expressão gênica diferencial tecido-específica em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	39
3.4.1 Intestino	39
3.4.2 Glândula salivar	40
4 DISCUSSÃO	42
4.1 Expressão diferencial de genes pró-oxidantes	42
4.1.1 <i>Dual oxidase-1 (DUOX-1)</i> e <i>Dual oxidase-2 (DUOX-2)</i>	42
4.1.2 <i>Cobre-Zinco Superóxido Dismutase (CuZnSOD)</i>	43
4.1.3 <i>Oxirredutase do Retículo Endoplasmático (ERO1)</i>	44
4.2 Expressão diferencial de genes antioxidantes	45
4.2.1 <i>Catalase (CAT)</i>	45
4.2.2 <i>Glutathione Peroxidase (GPX)</i> e <i>Fosfolipídio Hidroperóxido Glutathione Peroxidase (PHGPX)</i>	46
4.2.3 <i>Peroxirredoxina (PRX)</i> , <i>Tiorredoxina (TRX)</i> e <i>Tiorredoxina Redutase (TRXR)</i>	47
4.2.4 <i>Glutathione-S-Transferase (GST-1)</i>	48
5 CONCLUSÕES	50
CAPÍTULO II	51
Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Vias de Sinalização Imunológica em Diferentes Estágios Evolutivos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) em Resposta à Infecção por <i>Theileria equi</i> (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE)	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53

1 INTRODUÇÃO	54
2 MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1 Comitê de Ética	56
2.2 Local do estudo	56
2.3 Manutenção dos equinos	56
2.4 Coleta de sangue dos animais	56
2.5 Criação e manutenção das colônias de carrapato livre de <i>T. equi</i>	57
2.6 Obtenção de larvas, ninfas e tecidos (glândulas salivares e intestino) de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	57
2.6.1 Infestação e coleta dos carrapatos	57
2.6.2 Higienização, dissecação e acondicionamento das amostras	57
2.7 Extração de DNA total das amostras de sangue equino	58
2.8 Extração de RNA total das amostras de carrapato	59
2.9 Síntese de cDNA a partir do RNA extraído das amostras de carrapato	60
2.10 Detecção de <i>T. equi</i> a partir de amostras de DNA total de sangue equino e do cDNA das amostras de carrapato	60
2.11 Ensaio de expressão gênica	61
2.12 Análise estatística	63
3 RESULTADOS	64
3.1 Carga parasitária de <i>T. equi</i> em larvas, ninfas e tecidos de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	64
3.2 Expressão gênica diferencial em larvas inteiras de <i>R. microplus</i>	64
3.3 Expressão gênica diferencial em ninfas inteiras de <i>R. microplus</i>	64
3.4 Expressão gênica diferencial tecido-específica em fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	66
3.4.1 Intestino	66
3.4.2 Glândula salivar	66
4 DISCUSSÃO	69
4.1 Via NF- κ B/Toll	69
4.2 Via IMD	70
4.3 Via JAK/STAT	72
5 CONCLUSÕES	74
6 CONCLUSÕES GERAIS	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8 ANEXOS	95

Anexo I - Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo redox de *R. microplus* no estágio de larva. 95

Anexo II - Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo redox de <i>R. microplus</i> no estágio de ninfa.	96
Anexo III - Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo redox do intestino de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> .	97
Anexo IV - Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo redox da glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> .	98
Anexo V - Expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica em larvas de <i>R. microplus</i>	99
Anexo VI - Expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica em ninfas de <i>R. microplus</i>	100
Anexo VII - Expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica no intestino de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> .	101
Anexo VIII - Expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> .	102

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as principais patologias que acometem os plantéis equídeos no Brasil, a piroplasmose equina assume um papel de destaque. Também conhecida como nutaliose ou febre biliar, tal patologia é causada pelos hemoprotozoários *Theileria equi* (Laveran, 1901, Mehlhorn & Schein, 1998), *Theileria haneyi* (Knowles & Kappmeyer, 2018) e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912), pertencentes ao filo Apicomplexa e à ordem Piroplasmida (Allsopp et al., 1994; Rothschild, 2013; Knowles et al., 2018).

Estes parasitos infectam não só equinos domésticos, como também cavalos selvagens, mulas, burros e zebras (Qablan et al., 2013; Tirosh-Levy et al., 2020). A transmissão se dá principalmente através do repasto sanguíneo de carrapatos infectados por estes protozoários, sendo descritas como vetores diversas espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Amblyomma* (De Wall, 1992; Scoles & Ueti, 2015). Além disso, os animais podem ser infectados de forma iatrogênica pelo uso de instrumentação cirúrgica e agulhas contaminadas ou através da via transplacentária (Wise et al., 2013; Oniyche et al., 2019).

A piroplasmose equina é endêmica principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde há presença de vetores competentes, sendo reportada na Ásia, África, América Central, América do Sul e em determinadas áreas de clima temperado, como a região sul da Europa e dos Estados Unidos (Oniyche et al., 2020; Tirosh-Levy et al., 2020; Axt et al., 2024). Os prejuízos econômicos gerados pela presença da piroplasmose em rebanhos equídeos incluem queda de desempenho, perdas reprodutivas e gastos medicamentosos (Rothschild, 2013; Wise et al., 2013). Além disso, uma vez que a piroplasmose equina está listada como uma enfermidade de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A entrada de equídeos portadores em áreas não endêmicas é proibida, comprometendo o trânsito desses animais para fins de exportação e competições equestres (Friedhoff et al., 1990; Knowles et al., 1996; Scoles & Ueti, 2015; Coultous et al., 2023).

Pelo fato de serem parasitos intraeritrocíticos, as manifestações clínicas relacionadas à piroplasmose nos casos agudos e superagudos estão associadas à ocorrência de anemia hemolítica, incluindo sinais variados e inespecíficos como febre, icterícia, dispneia, perda de peso e edema, podendo culminar com o óbito do animal (Battsetseg et al., 2002; Zobba et al., 2008; Guidi et al., 2015; Dodiya et al., 2022). Contudo, em regiões endêmicas com elevadas taxas de adultos infectados, casos subagudos ou crônicos são mais frequentes, onde os animais podem apresentar sinais clínicos leves e inespecíficos como desconforto abdominal e apatia, ou, na maioria dos casos, podem ser assintomáticos (Tamzali, Y., 2013;

Piantedosi et al., 2014; Laus et al., 2015).

O tratamento de eleição é feito com dipropionato de imidocarb. Contudo, infecções por *T. equi* tendem a ser mais severas e mais resistentes ao tratamento quando comparadas às infecções por *Babesia caballi*, sendo necessário doses mais altas e uma duração mais prolongada do tratamento (De Wall, 1992; Sears et al., 2020). Além disso, enquanto a infecção por *B. caballi* é considerada autolimitante e a eliminação do parasito no organismo do hospedeiro ocorre em aproximadamente quatro anos, a infecção por *T. equi* tende a perdurar por toda a vida do animal, tornando este uma fonte de infecção para o rebanho (De Wall, 1992; Wise et al., 2013). Com isso, uma vez que não existem vacinas eficazes comercialmente disponíveis, o controle da doença é feito através da combinação entre uso de medicamentos, controle do vetor e restrição do trânsito animal. Porém, a elevada morbidade da doença e a estimativa de que 90% da população equina mundial reside em áreas endêmicas fazem com que as ferramentas de controle disponíveis atualmente não sejam suficientes para limitar de forma eficaz a ocorrência da doença (Tirosh-Levy et al., 2020; Mendoza et al., 2024).

Apesar da existência de diversas espécies de carrapatos capazes de atuar como vetor de *T. equi* ao redor do mundo, a única espécie de carrapato com capacidade vetorial comprovada experimentalmente de transmitir *T. equi* em território brasileiro é *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Guimarães et al., 1998; Battsetseg et al., 2002; Peckle et al., 2022). Contudo, informações a respeito dos mecanismos envolvidos na forma como o parasito e o vetor se relacionam no processo de infecção e transmissão ainda são escassas.

Sabe-se que, durante o repasto sanguíneo, a liberação de moléculas bioativas na saliva do carrapato a fim de modular a resposta imunológica do hospedeiro facilita a aquisição e a transmissão de patógenos (Francischetti et al., 2009; Kazimirová & Stibrániová, 2013). Com isso, quando um agente patogênico é adquirido pelo carrapato, ele precisa superar diferentes barreiras teciduais, como intestino e glândulas salivares e resistir aos componentes imunológicos inatos do carrapato para se manter viável e, posteriormente, ser transmitido com sucesso para outro hospedeiro (Kopacek et al., 2010; Hajdusek et al., 2013).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra infecções microbianas em animais e assim como nos demais invertebrados, o sistema imunológico inato do carrapato é composto por respostas imunes celulares e humorais que reconhecem patógenos e agem contra eles de maneira orquestrada (Hofmann et al., 1999; Sonenshine & Hynes, 2008; Fogaça et al., 2021). A resposta imune humoral de carrapatos é regulada pela transdução do

sinal de diferentes vias de sinalização imunológica, sendo as principais: fator nuclear-kappaB/Toll (NF-κB/Toll), c-Jun N-terminal quinase (JNK), imunodeficiência (IMD), Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT). A ativação destas vias culmina com a síntese e liberação de peptídeos antimicrobianos e moléculas efetoras que irão atuar no combate ao processo infeccioso (Smith & Pal, 2014; Rosa et al., 2016; Aguilar-Díaz et al., 2021).

Cabe destacar ainda que, dentre os mecanismos humorais de defesa imunológica, as espécies reativas de oxigênio (ERO) envolvidas no metabolismo de oxidorredução assumem relevante papel, uma vez que consistem em moléculas altamente reativas que atuam em diversos processos metabólicos como controle de injúrias, sinalização, proliferação e diferenciação celular (Fang, 2004; Jones, 2006). Estes compostos são gerados pela ação de uma série de enzimas mitocondriais responsáveis por gerar, principalmente, ânions superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Murphy, 2009; Breitenbach & Eckl, 2015; Weidinger & Kaslov, 2015). Contudo, pelo fato dessas moléculas possuírem potencial para danificar componentes celulares chaves como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, diversas enzimas estão envolvidas no processo de detoxificação celular e reparo de danos relacionadas à essas substâncias, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), tioredoxinas (TRX), peroxidases (PRX), dentre outras (Navarro-Yepes et al., 2014; Rahal et al., 2014).

Considerando a relevância da piroplasmose equina nos rebanhos equestres mundiais e as limitações nas estratégias de prevenção e controle da doença, ampliar a compreensão a respeito da dinâmica de interação à nível molecular entre *T. equi* e *R. microplus* possibilita identificar moléculas-chave envolvidas nesta interface, as quais podem atuar como alvo para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas destinadas ao bloqueio da transmissão. Assim, este trabalho teve por objetivo analisar a expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica e no metabolismo de oxidorredução de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Theileria equi* (Laveran, 1901)

2.1.1 Visão geral e taxonomia

Theileria equi é um protozoário intraeritrocítico pertencente ao filo Apicomplexa e à Ordem Piroplasmida. Inicialmente, este parasito foi descrito por Laveran (1901) como *Piroplasma equi* devido ao seu formato piriforme quando observado no interior dos eritrócitos em sangue de cavalo, sendo posteriormente renomeado para *Nuttalia equi* (Nuttal & Strickland, 1912).

Anos mais tarde, este parasito foi novamente reclassificado como *Babesia equi*. Tal nomenclatura foi discutida uma vez que este protozoário não realiza transmissão transovariana comprovada experimentalmente e replica-se inicialmente em linfócitos, características estas pertencentes às espécies do gênero *Theileria* (Schein et al., 1981; Uilenberg, 2006). Devido a tais diferenças observadas na biologia deste protozoário quando comparado às demais espécies pertencentes ao gênero *Babesia*, Melhorn & Schein (1998) o reclassificaram como *Theileria equi*, nomenclatura estabelecida até os dias atuais.

A espécie *Theileria equi* é também conhecida como pequeno piroplasma, possuindo em média 1,5 a 2,5 μm de diâmetro em sua forma evolutiva intraeritrocítica (merozoíto), com formato variando entre piriforme, arredondado ou ovalado (Melhorn & Schein, 1998; Malekifard et al., 2014). Estes parasitos são normalmente encontrados formando tétrades nos eritrócitos infectados, também conhecidas como “cruz de Malta”, mas também podem ser encontrados de forma isolada ou em díades (Holbrook et al., 1968; Schein et al., 1981; Sumbria et al., 2014).

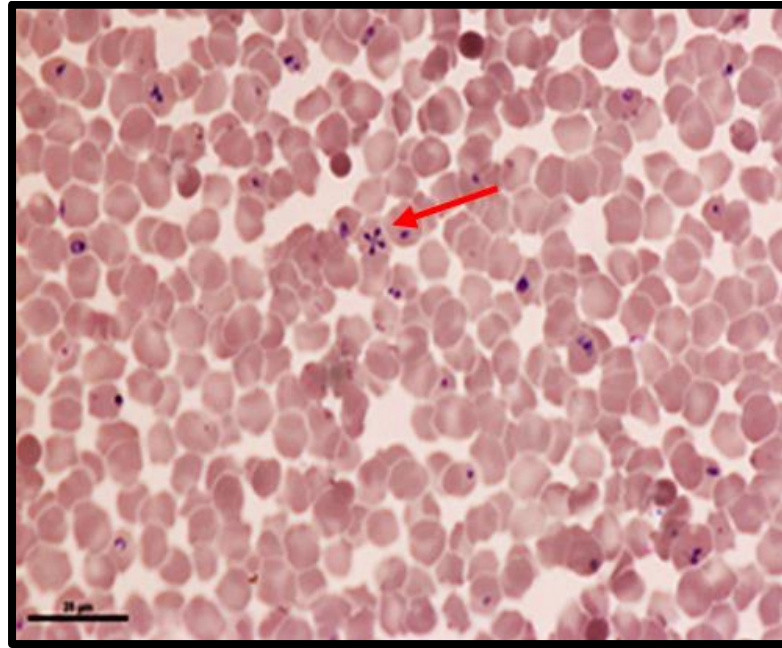


Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa representando o formato de “cruz de Malta” dos merozoítos de *T. equi*. Adaptado de Onyiche et al. (2019).

A posição taxonômica de *Theileria equi* é representada da seguinte forma:

Império: Eukaryota CORLISS, 1994

Reino: Protista LEVINE 1980

Filo: Apicomplexa LEVINE 1970

Classe: Aconoidasida MELHORN 1980

Ordem: Piroplasmida WENYON 1962

Família: Theileriidae DU TOIT, 1918

Gênero: *Theileria* BETTENCOURT, FRANCA & BORGES, 1907

Espécie: *Theileria equi* LAVERAN, 1901, MELHORN & SCHEIN, 1998

2.1.2 Hospedeiros, vetores e ciclo biológico

Theileria equi tem como hospedeiro definitivo os equídeos, incluindo cavalos, mulas, burros e zebras, sendo também descrita na literatura a detecção deste parasito em hospedeiros não equídeos, como cães, camelos e antas (Criado-Fornelio et al., 2004; Fritz, 2010; Qablan et al., 2012; Da Silveira et al., 2017; Elsaywy et al., 2023). A transmissão se dá principalmente através da picada de carrapatos infectados durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro suscetível, onde mais de 30 espécies de carrapatos já foram apontadas como sendo capazes de

transmitir *T. equi*, sendo elas pertencentes aos gêneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemophysalis*, *Ixodes* e *Amblyomma* (De Wall, 1992; Scoles & Ueti, 2015).

Sendo assim, ao se alimentar em um hospedeiro suscetível, o carrapato inocula no sangue animal as formas infectantes de *T. equi*, chamadas esporozoítos, presentes na saliva do ectoparasito. Estes esporozoítos penetram inicialmente as células mononucleares do sangue periférico, como linfócitos, e reproduzem-se de forma assexuada (esquizogonia) formando os macro e microesquizontes (Schein et al., 1981; Rothschild, 2013). Após aproximadamente 9 dias, estes parasitos dão origem aos merozoítos que, ao romperem os esquizontes, são liberados na circulação sanguínea e penetram os eritrócitos, onde reproduzem-se de forma assexuada por fissão binária (merogonia) e geram novos merozoítos de formato piriforme que se organizam principalmente em tétrades, formando a “cruz de malta” observada no esfregaço sanguíneo (Melhorn & Shein, 1998; Wise et al., 2013).

Ao romperem os eritrócitos, estes merozoítos podem infectar novos eritrócitos ou diferenciarem-se em estruturas arredondadas denominadas macro e microgametócitos (gametogonia), as quais serão ingeridas pelo carrapato durante o repasto sanguíneo. No intestino do ectoparasito estas formas evolutivas diferenciam-se, ocorrendo um processo de fissão nuclear e a formação de estruturas protusas denominadas corpos raiados. Após 4 a 6 dias da ingestão do sangue infectado pelo carrapato, os corpos raiados dividem-se formando os macro e microgametas (gametogênese), os quais se unem por reprodução sexuada formando o zigoto, o qual diferencia-se em cineto e penetra a parede intestinal do carrapato após 5 a 7 dias, alcançando a hemocèle. Nesta cavidade, o cineto é transportado através da hemolinfa e penetra as células tipo III da glândula salivar entre 7 e 8 dias. Nestas células, ocorre o processo de esporogonia com a formação dos esporontes, esporoblastos e, por fim, esporozoítos, que serão inoculados no hospedeiro suscetível durante o repasto sanguíneo. Com isso, a formação dos esporozoítos é completada entre 6 a 24 dias após a conclusão do processo alimentar realizado pelo ectoparasito (Moltman et al., 1983; Zapf & Schein, 1994; Guimarães et al., 1998; Rothschild, 2013).

2.1.3 Distribuição global de *T. equi* e fatores de risco associados à infecção

A piroplasmose equina é uma enfermidade cosmopolita, sendo relatada em todos os continentes onde há presença de vetores competentes e é considerada endêmica em diversas regiões do planeta. Até o presente momento, os únicos países considerados não endêmicos são os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Irlanda, Islândia, Groelândia, países pertencentes à

região norte da Europa, Singapura, Japão, Nova Zelândia e Austrália, onde somente casos isolados são reportados (Guidi et al., 2015; Onyiche et al., 2019; Tirosh-Levy et al., 2020). Dessa forma, no Brasil, a piroplasmose equina é uma doença endêmica, sendo já relatada em todas as regiões do país.

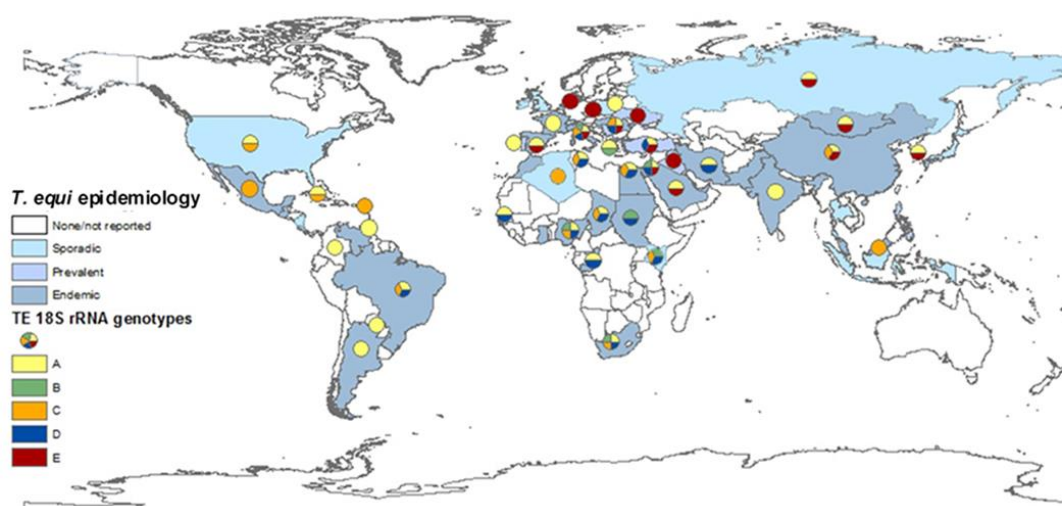


Figura 2. Distribuição global dos diferentes genótipos de *T. equi* com base na região hipervariável do gene *18s rRNA*. O mapa foi construído baseado em estudos onde a detecção de *T. equi* foi realizada em sangue de equinos através de métodos moleculares e sorológicos no período correspondente aos anos 2000-2019. Tirosh-Levy et al., 2020.

Por ser uma enfermidade de ampla distribuição global, diversos estudos preocuparam-se em identificar fatores intrínsecos e extrínsecos associados ao risco de positividade para a piroplasmose equina. Dentre os principais fatores que contribuem para a infecção por *T. equi*, destaca-se a presença de carrapatos com capacidade de transmitir *T. equi* e a criação de rebanhos equídeos com acesso a outras espécies animais, como bovinos, cães domésticos e animais silvestres (Moretti et al., 2010; Peckle et al., 2013; Camino et al., 2021; Ganesan, 2023). Além disso, as crescentes alterações nos padrões climáticos podem influenciar na dinâmica de interação patógeno-vetor, fazendo com que ambos os parasitos sejam detectados em áreas anteriormente livres; contribuindo, assim, para a disseminação da piroplasmose equina ao redor do mundo (Baptista et al., 2013; de La Fuente et al., 2023).

2.1.4 Impactos à saúde animal relacionados à infecção por *Theileria equi*

A piroplasmose equina pode se apresentar de forma superaguda, aguda, subaguda ou crônica. O período de incubação para *T. equi* varia de 12 a 19 dias e os sinais clínicos, quando presentes, estão relacionados à anemia hemolítica causada pela replicação do parasito no

interior dos eritrócitos (De Wall, 1992). Dessa forma, os casos superagudos podem ocorrer, principalmente, em neonatos devido à infecção intrauterina (Lewis et al., 1999; Phipps & Otter, 2004), em animais livres do patógeno quando recém introduzidos em áreas endêmicas ou, ainda, em indivíduos adultos submetidos à atividade física extenuante, sendo estes casos caracterizados pela manifestação abrupta de sinais clínicos não específicos como anemia severa e cólica, os quais podem levar ao colapso e a consequente morte súbita (Hailat et al., 1999; Zobba et al., 2008; Sumbria et al., 2014).

Em casos de manifestação da forma aguda da doença, os animais podem apresentar febre alta ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), letargia, anemia moderada, desidratação, anorexia, hemoglobinúria, icterícia, perda de peso e queda de desempenho, sendo esta condição relatada com maior frequência em animais imunossuprimidos ou primo infectados (Tamzali, 2013; Coultous et al., 2018; Aida et al., 2020; Maiti et al., 2021).

Em áreas endêmicas, por sua vez, é comum observar casos subagudos a crônicos, uma vez que nestas áreas os animais se infectam no primeiro ano de vida e, controlada a infecção, estes se tornam hospedeiros do parasito por toda a vida (Rothschild, 2013; Onyiche et al., 2019). Sendo assim, em casos subagudos, os sinais são semelhantes aos da fase aguda; porém, apresentam-se de forma mais branda, sendo possível observar diferentes graus de anemia, palidez de mucosas e redução na produtividade. Já nos casos crônicos, os animais são geralmente assintomáticos, podendo manifestar sinais inespecíficos como perda de peso e queda no desempenho (Friedhoff & Soulé, 1996; Zobba et al., 2008; Pasolini et al., 2018; Tirosch-Levy et al., 2020).

2.1.5 Tratamento, prevenção e controle da piroplasmose equina

Por ser uma enfermidade onde o animal se torna portador do agente patogênico por toda a vida, o tratamento para a piroplasmose equina consiste em minimizar os sinais clínicos, quando presentes, e no “clearance” do parasito na circulação sanguínea de animais infectados em áreas não endêmicas (Wise et al., 2013; Onyiche et al., 2019). Atualmente, o fármaco de eleição para o tratamento da piroplasmose equina é o antiprotozoário dipropionato de imidocarb, sendo recomendada a aplicação de quatro injeções intramusculares de 4mg/kg em um intervalo de 72h para o combate à infecção por *T. equi*, e, em casos mais resistentes, faz-se necessário realizar ciclos deste tratamento (Butler et al., 2008; Hines et al., 2015).

Apesar de ser um medicamento considerado seguro, a depender do tempo de tratamento e da dose aplicada, a utilização deste fármaco pode causar diversos efeitos colaterais, como

agitação, sudorese, hipermotilidade intestinal e diarreia (Tamzali et al., 2013; Grause et al., 2013). Outro medicamento utilizado é a buparvaquona, um antiprotozoário utilizado no tratamento de infecções por diferentes espécies de *Theileria* e *Babesia* (Zaugg & Lane, 1989; Kumar et al., 2006; Dayia et al., 2022). Contudo, apesar dos efeitos colaterais relacionados ao uso deste fármaco aparentarem serem mais brandos quando comparados àqueles causados pelo dipropionato de imidocarb, ambos não são capazes de eliminar o parasito do organismo animal (Muller et al., 2016; Mendoza et al., 2024).

Com isso, diferentes métodos alternativos de tratamento têm sido investigados, como a utilização de compostos antimaláricos (Nugraha et al., 2019; Rizk et al., 2019), inibidores de metabolismo parasitário (Hines et al., 2015; Silva et al., 2017; Maji et al., 2019) e compostos fitoterápicos (Badr al et al., 2017; Ganchimeg et al., 2019). Contudo, a eficácia destes compostos contra piroplasmas foi analisada apenas *in vitro*, não havendo dados suficientes que justifiquem a utilização dos mesmos como método de tratamento da piroplasmose em rebanhos equídeos.

Sendo assim, pelo fato de não haver vacinas comprovadamente eficazes e disponíveis comercialmente contra tal enfermidade, o controle da doença é feito principalmente através da limitação do trânsito de animais infectados e do controle de ectoparasitos no rebanho (Friedhoff et al., 1990; Wise et al., 2013; Tlirosh-Levy et al., 2020). Além disso, em áreas endêmicas, o tratamento farmacológico é utilizado como forma de controle ao realizar o “clearance” do parasito no sangue de animais infectados presentes nessa região, sendo realizada também a quarentena de animais recém introduzidos e, em alguns casos, opta-se pela eutanásia dos animais que testarem positivos para piroplasmose (Martin, 1999; Rothschild, 2013).

2.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)

2.2.1 Visão geral e taxonomia

Dentre as diversas espécies de carrapatos com importância em medicina veterinária, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* destaca-se pelos impactos que pode gerar à saúde e à economia do setor de produção animal, principalmente bovino e equino. Conhecido popularmente como carrapato-do-boi, este parasito é o carrapato com maior relevância mundial no que tange à transmissão de doenças parasitárias bovinas, sendo vetor de patógenos como *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* (Grisi et al., 2014; da Silva et al., 2018).

No caso dos equinos, a importância de *R. microplus* reside no fato deste ectoparasito atuar como vetor de *Theileria equi*, protozoário responsável por comprometer a saúde animal e

a indústria equina ao redor do mundo (Friedhoff et al., 1990; Kerber et al., 1999; Sumbria et al., 2016).

A posição taxonômica de *R. microplus* é representada da seguinte forma:

Reino: Animalia LINNAEUS, 1758.

Subreino: Bilateria HATSCHECK, 1888.

Filo: Artrópodes SIELBOLD, 1848.

Classe: Aracnídeos LAMARCK, 1801.

Ordem: Ixodida LEACH, 1817.

Família: Ixodidae DUGÈS, 1834.

Gênero: *Rhipicephalus* KOCH, 1844.

Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* CANESTRINI, 1887.

2.2.2 Hospedeiros e ciclo biológico

Apesar de parasitar preferencialmente bovinos, outras espécies podem ser parasitadas por *R. microplus* em casos de alta infestação, como equinos, caprinos, cães e até mesmo humanos (Battsetseg, 2002; Nyangiwe & Horak 2007; Soares et al., 2007). No Brasil, *R. microplus* é especialmente relevante para o setor equestre por ser a única espécie de carrapato em território nacional com capacidade vetorial de transmitir *T. equi* comprovada experimentalmente, podendo tal transmissão ser realizada tanto de forma intraestadial quanto interestadial (Guimarães et al, 1998; Battsetseg et al., 2002; Ueti et al., 2005; Peckle et al., 2022).

Sendo assim, *Rhipicephalus microplus* é considerado um carrapato monoxênico, ou seja, necessita de um único hospedeiro para completar seu ciclo biológico (Hitchcock 1955, Gonzáles, 1974). Tal ciclo foi descrito inicialmente em bovinos e é dividido em fase parasitária e fase de vida livre. Na primeira, as larvas infestam o hospedeiro vertebrado e se alimentam por 6 a 8 dias até realizarem a muda para ninfas. Estas, por sua vez, atingem o estágio adulto em 7 a 9 dias, onde as fêmeas teleóginas se desprendem do hospedeiro no 21º ao 23º dia após a infestação, embora os machos possam permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (Hitchcock, 1955; Gonzáles, 1974; Bittencourt, 1990).

Em equinos, contudo, pelo fato de não serem hospedeiros definitivos do carrapato, a fase parasitária é mais prolongada em relação aos bovinos, uma vez que as fêmeas necessitam de um maior período de tempo para ingurgitar, levando de 28 a 38 dias, enquanto os machos podem permanecer no hospedeiro por até mais de 60 dias (Bittencourt, 1990; Franque et al., 2009; Peckle et al., 2022).

Já na fase de vida livre do ciclo de *R. microplus*, as teleóginas realizam a postura dos ovos no ambiente após se desprenderem do corpo do hospedeiro. Aproximadamente quatro semanas após o início da postura, as larvas eclodem, maturam-se pelo período aproximado de uma semana e deslocam-se de forma conjunta às extremidades da vegetação para alcançarem mais facilmente o hospedeiro suscetível, reiniciando o ciclo (Gonzáles, 1974; Bittencourt, 1990).

2.2.3 Distribuição e importância de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil e no mundo

Rhipicephalus (Boophilus) microplus possui uma ampla distribuição geográfica, sendo relatado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como Ásia, África e Américas (Estrada-Peña et al., 2006; Kamani et al., 2017). Contudo, alterações ambientais relacionadas ao clima como temperatura, precipitação e umidade, além de mudanças no uso da terra, são capazes de modificar a dinâmica de distribuição e abundância destes artrópodes, fazendo com que estes sejam capazes de se adaptar a diferentes ambientes e ampliar cada vez mais o seu alcance geográfico (Rizzoli et al., 2019; Marques et al., 2020; Nava et al., 2022).

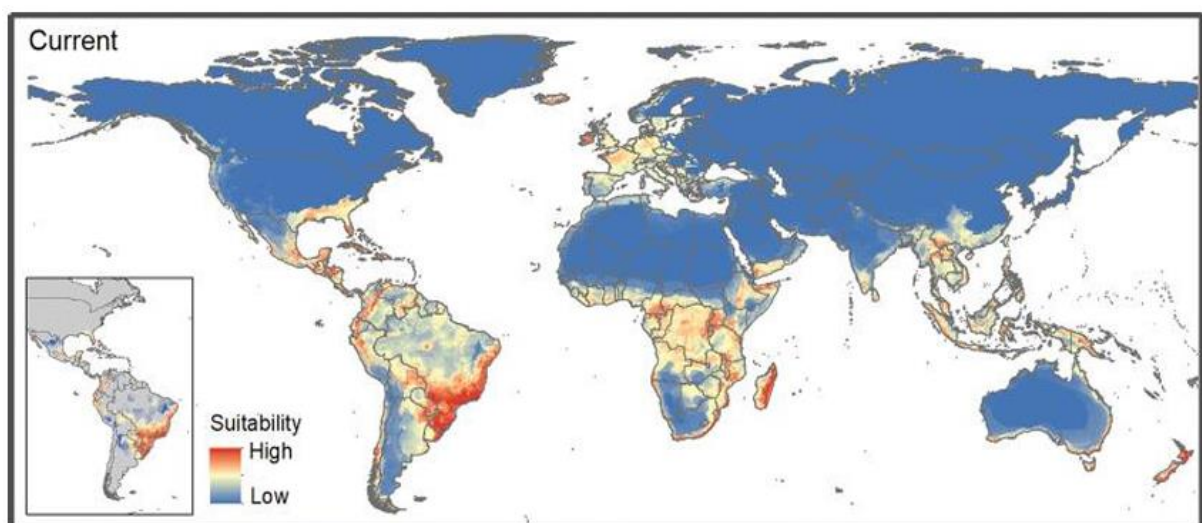


Figura 3. Representação da adaptabilidade global de *R. microplus* desenvolvida de acordo com o modelo de nicho ecológico. Marques et al., 2020.

O Brasil é um país que naturalmente oferece condições ideais para a ocorrência de *R. microplus*, pois apresenta elevada densidade de hospedeiros suscetíveis e condições ambientais adequadas para o desenvolvimento do ectoparasito. Sendo assim, *R. microplus* encontra-se amplamente disseminado no território nacional, principalmente em áreas rurais, onde estima-se que 80% do gado brasileiro esteja infestado por este ectoparasito, gerando um prejuízo anual estimado em 3,24 bilhões de dólares ao setor agropecuário (Grisi et al., 2014). Além disso, alterações climáticas associadas ao crescente aumento da temperatura em diferentes regiões do país podem contribuir para o aumento das gerações anuais de *R. microplus* nestes locais, intensificando ainda mais a ocorrência do ectoparasito no território brasileiro (Nicaretta et al., 2021).

Com isso, devido à elevada prevalência de *R. microplus* no país, a falta de programas oficiais direcionados à prevenção e controle do ectoparasito e ao aumento no número de cepas resistentes aos acaricidas disponíveis comercialmente (Klafke et al., 2024), hospedeiros secundários como os equídeos acabam se tornando altamente suscetíveis à infestação e à infecção por parasitos transmitidos por este carrapato, como *T. equi*. Esta dinâmica dificulta ainda mais o monitoramento e o controle da ocorrência de *R. microplus* no país; gerando, assim, impactos em diferentes âmbitos do setor agropecuário nacional.

2.3 Mecanismos humorais de resposta à infecção em carrapatos

2.3.1 Visão geral

O sistema imunológico de artrópodes vetores tem sido objeto de estudo por parte da comunidade científica há décadas. Contudo, boa parte destes estudos concentram-se principalmente em investigar a resposta imunológica em dípteros, como moscas e mosquitos, enquanto as informações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na interface patógeno-vetor em carrapatos permanecem escassas (Aguilar-Díaz et al., 2021; Fogaça et al., 2021).

Sabe-se, porém, que os carrapatos são eficientes reservatórios e vetores de diferentes agentes patogênicos responsáveis por ameaçar a vida animal e humana, incluindo protozoários, vírus e bactérias (Dantas-Torres et al., 2012). Sendo ectoparasitos hematófagos obrigatórios, tal versatilidade se dá devido a aspectos favoráveis da biologia do próprio carrapato como, por exemplo, a presença de moléculas bioativas na saliva, as quais modulam a resposta imune local do hospedeiro, facilitando a ingestão de sangue e a transmissão de patógenos (Kotál et al., 2015; Šimo et al., 2017). Além disso, os carrapatos possuem uma adaptação a longos períodos de

repastos sanguíneos, característica que também favorece tanto a aquisição, quanto a transmissão de diferentes microrganismos (Hajdusek et al., 2013).

Uma vez adquiridos pelo carrapato durante o repasto sanguíneo, os patógenos necessitam evadir os mecanismos de defesa existentes nos distintos tecidos do ectoparasito a fim de garantir sua sobrevivência, permanência e posterior transmissão a um hospedeiro suscetível (Smith & Pal, 2014; Sonenshine & Macaluso, 2017). Estes mecanismos correspondem principalmente à resposta imune inata do carrapato, a qual compreende a resposta celular, desenvolvida pela fagocitose e pelo encapsulamento, e a resposta humoral, a qual inclui as espécies reativas de oxigênio (ERO), os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e as demais moléculas efetoras produzidas a partir da transdução do sinal de diferentes vias de sinalização imunológica, sendo as principais: fator nuclear-kappa B/Toll (NF- κ B/Toll), c-Jun N-terminal quinase (JNK), via da imunodeficiência (IMD) e Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) (Severo et al., 2013; Rosa et al., 2016; Capelli-Peixoto et al., 2017).

2.3.2 Principais vias de sinalização imunológica

Dentre as principais vias de sinalização imunológica estudadas em artrópodes, a NF- κ B/Toll é reconhecida por possuir um papel central na resposta à infecção por diferentes microrganismos, sendo descrita principalmente em investigações envolvendo a resposta de *Drosophila* a infecções bacterianas e fúngicas e na resposta de *Aedes aegypti* a infecções virais (Lemaitre & Hoffmann, 2004; Xi et al., 2008; Valanne et al., 2011). Em carrapatos, por sua vez, análises genômicas avançadas demonstraram que grande parte dos componentes da via “Toll” também são conservados neste ectoparasito (Smith & Pal, 2014; Giulia-Nuss et al., 2016; Kitsou & Pal, 2018).

Ao realizar a caracterização do perfil transcricional de *R. microplus* sob desafio microbiano, Rosa e colaboradores (2016) descreveram os principais componentes da via NF- κ B/Toll presentes neste ectoparasito, sendo eles: citocina extracelular Spatzle, receptor transmembrana Toll, proteína adaptadora Myd88, as quinases Tube e Pelle, a proteína interativa com Pelle (Pellino), fatores associados ao fator de necrose tumoral (TRAF), intermediário de sinalização conservado evolutivamente na via Toll (ECSIT), fator de transcrição Dorsal, proteína interativa com Toll (TOLLIP), alfa-estéreo e “armadillo-motif” contendo proteína (SARM), proteína inibidora de Dorsal IkappaB Cactus (IkB) e a proteína interativa com IkB,

Cactina. Contudo, o modo como esta via opera e a forma como é orquestrada em carrapatos ainda não estão totalmente esclarecidos (Aguilar-Díaz et al., 2021; Fogaça et al., 2021).

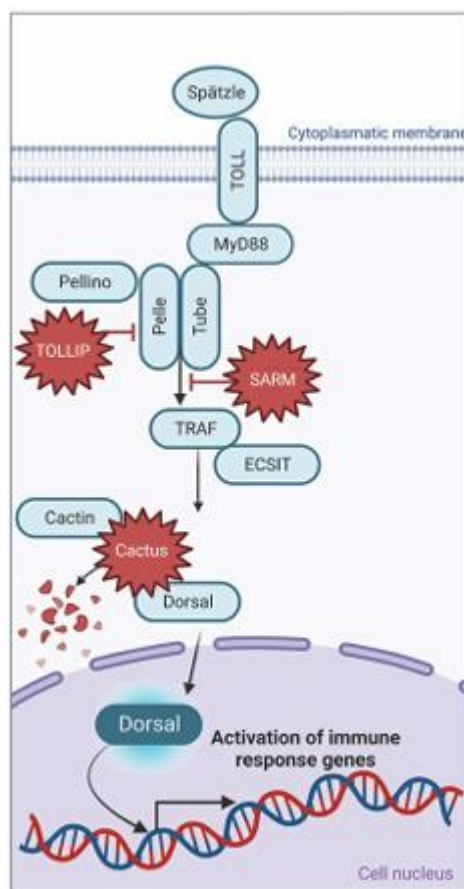


Figura 4. Representação dos componentes da via de sinalização NF-κB/Toll em carrapatos. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via. Paulino et al., 2022.

Sabe-se, porém, que diferentes patógenos são capazes de modular a resposta imunológica do carrapato, levando a alterações na expressão de genes envolvidos nesta via de sinalização (Sonenshine & Macaluso, 2017; Feng et al., 2024). À exemplo, a bactéria intracelular *Anaplasma marginale* demonstrou ser capaz de regular negativamente a expressão do fator de transcrição *Dorsal* na glândula salivar e no intestino de adultos de *Rhipicephalus microplus* (Capelli-Peixoto et al., 2017), enquanto uma elevada carga parasitária do protozoário *T. equi* é capaz de levar a um aumento na expressão do *receptor Toll* e do gene que codifica para a proteína *ECSIT* no intestino de *R. microplus* (Paulino et al., 2022). Da mesma forma, *Borrelia burgdorferi* é capaz de modular a resposta imunológica de células de *Ixodes scapularis* ao induzir um aumento na expressão do gene que codifica para a proteína adaptadora Myd88 (Smith et al., 2016), ao passo que a infecção de células de *I. ricinus* por flavivírus leva também a uma regulação positiva do receptor Toll (Mansfield et al., 2017). Tais fatos evidenciam que, assim como nos demais artrópodes, a via Toll está intrinsicamente relacionada à resposta a

infecções; contudo, os mecanismos funcionais envolvidos neste processo ainda necessitam ser melhor compreendidos.

Outra importante via de sinalização descrita em artrópodes é a IMD. Em *Drosophila*, esta via é ativada através do reconhecimento do ácido diaminopimélico (DAP)-tipo peptidoglicano, presente na superfície de grande parte das bactérias gram negativas e de algumas gram positivas, pelas proteínas de reconhecimento de peptideoglicanos (PGRPs) (Neyen et al., 2012; Kleino & Silverman, 2014). Além disso, foi demonstrado em células de *Aedes aegypti* que padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes em vírus de genoma RNA também são capazes de ativar a via IMD (Russell et al., 2021). Já em carrapatos, observou-se que glicerofosfolipídeos presentes na membrana de bactérias como *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* e *A. marginale* também podem atuar como PAMPs na ativação da via IMD; contudo, o mecanismo envolvido no reconhecimento dessas moléculas em carrapatos ainda não é esclarecido (Shaw et al., 2017; Fogaça et al., 2021).

Análises genômicas demonstraram que carrapatos, assim como certos aracnídeos e hemípteros, não possuem alguns dos principais componentes envolvidos nesta via, como a proteína transmembrana de reconhecimento de peptideoglicano (PGRP-L), proteína associada a Fas (FADD), molécula adaptadora IMD, repressor defensivo 1 (Dnr1) e a proteína semelhante a ced-3/Nedd2 relacionada à morte (DREDD), proteínas estas envolvidas no mecanismo de ativação desta via descrita em *Drosophila* (Palmer & Jiggins, 2015; Rosa et al., 2016; Zumaya-Estrada et al., 2018). Contudo, apesar da ausência destes componentes, a via IMD é ativada e desempenha relevante papel no controle da infecção em carrapatos por diferentes patógenos, como *B. burgdorferi* e *A. phagocitophylum* (Shaw et al., 2017; McClure et al., 2019; O'neal et al., 2023).

Dessa forma, em carrapatos, foi demonstrado que esta via pode ser ativada através de uma E3 ubiquitina ligase chamada proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP), a qual interage com o complexo heterodímero da enzima conjugadora E2 Bendless:UEV1a (SEVERO et al., 2013). Com isso, a XIAP realiza a poliubiquitinação de seu substrato p47, o qual conecta-se com Kenny/Nemo, subunidade reguladora do complexo da quinase inibidora de NF-κB. Tal ligação induz a fosforilação da quinase inibidora de NF-κB (IKK) e de Relish, o fator de transcrição da via IMD. Com isso, Relish é clivado e translocado para o núcleo, culminando com a síntese de moléculas efetoras, como peptídeos antimicrobianos, que irão atuar contra o agente infeccioso (Shaw et al., 2017; McClure et al., 2019). Além disso, os componentes inibitórios desta via também foram descritos em carrapatos, sendo eles: Caspar (fator 1

associado a FAS), POSH (E3ligase com domínio SH3) e Caudal (Rosa et al., 2016; McClure et al., 2019).

Em *Drosophila*, foi observado que os componentes da via IMD denominados quinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformador (TAK1) e a proteína de ligação ao TAK1 2 (TAB2) são capazes de ativar uma via de sinalização alternativa chamada “Jun-N-terminal quinase” (JNK), a qual aparentemente não induz a formação de peptídeos antimicrobianos (Silverman et al., 2003). Foram descritos cinco componentes nesta via, sendo eles também encontrados em carrapatos, os quais incluem: proteína ativada por mitógeno (MAP), quinase Hemipterous (MKK), quinase “Jun Basket” (JNK), ativador de proteína 1 (AP-1) e os fatores de transcrição JRA (antígeno relacionado a Jun) e FRA (antígeno relacionado a Fos) (Rosa et al., 2016; McClure et al., 2019). Contudo, estudos adicionais necessitam ser conduzidos para melhor compreensão do funcionamento deste ramo pertencente à via IMD em carrapatos.

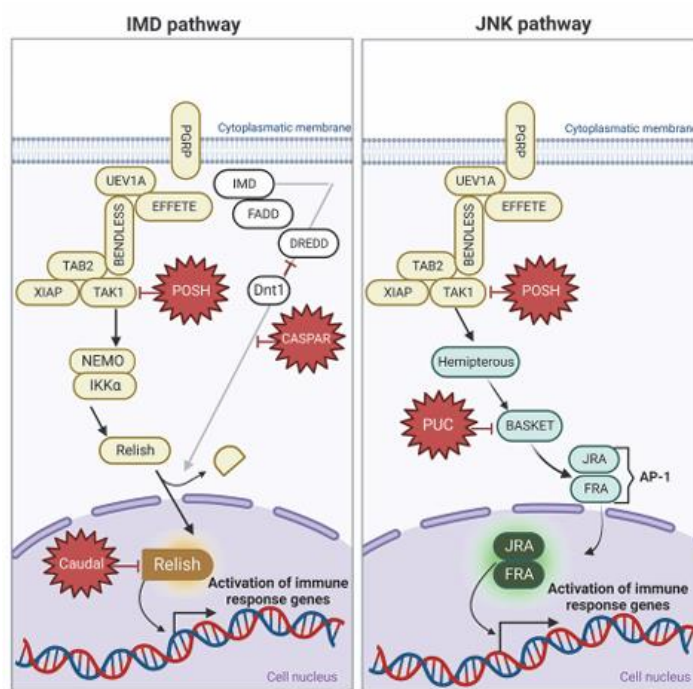


Figura 5. Representação dos componentes das vias de sinalização IMD e JNK em carrapatos. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via. Adaptado de Paulino et al., 2022.

A via JAK/STAT, por sua vez, assim como a via Toll, possui a grande maioria dos seus componentes centrais conservados em carrapatos, assim como nos demais artrópodes, sendo uma via particularmente sensível a infecções virais (Dostert et al., 2005). Com isso, seis dos sete componentes comumente encontrados em artrópodes foram também descritos em

carrapatos, sendo eles: o receptor transmembrana de citocinas Domeless, a tirosina janus quinase (JAK), o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), a molécula adaptadora de transdução de sinal (STAM) e as proteínas inibidoras PIAS (inibidores de proteínas ativadas STAT) e SOCS (supressores da sinalização de citocinas) (Kotsyfakis et al., 2015; Giulia-Nuss et al., 2016; Rosa et al., 2016). Contudo, o gene codificante para a proteína ligante do receptor Domeless, a Unpaired (Upd), não foi ainda encontrado no genoma de carrapatos, sendo esta proteína responsável pelo desencadear da transdução do sinal em estudos envolvendo a resposta de *Drosophila* a infecções microbianas (Hayashi et al., 2012; Amoyel et al., 2014; Shin et al., 2020).

Apesar da ausência da proteína Upd, a via JAK/STAT desempenha importante papel no controle de infecções em carrapatos (Liu et al., 2012; Narasimhan et al., 2014); contudo, a forma como tal via é ativada ainda não é completamente elucidada. Foi demonstrado que *Ixodes scapularis* utiliza um receptor Dome1 que reconhece a citocina interferon gamma (IFN- γ), proveniente do sangue hospedeiro durante o repasto, para ativar a via JAK/STAT e gerar a molécula efetora amidase domesticado 2 (Dae2), a qual atua no controle da infecção por *Borrelia burgdorferi* (Smith et al., 2016; Rana et al., 2023). Além disso, Ayllón e colaboradores (2015) observaram que a inibição de JAK e STAT resultou em uma redução da carga parasitária de *Anaplasma phagocytophilum* em *Ixodes scapularis*, uma vez que tal via é implicada na inibição da apoptose em neutrófilos (Galindo & de la Fuente, 2012).

Contudo, um outro estudo conduzido por Narasimhan e colaboradores (2014) demonstrou que uma das moléculas efetoras da via JAK/STAT, a peritrofina-1, é essencial para a integridade da matriz peritrófica no intestino de ninfas de *I. scapularis* e para a colonização de *Borrelia burgdorferi*, uma vez que mudanças na microbiota intestinal gerou uma diminuição na expressão de *STAT* e, conseqüentemente, da *peritrofina-1* e nos níveis da bactéria, demonstrando que a presença da molécula contribui para a sobrevivência de *B. burgdorferi* no intestino do carrapato. Em contrapartida, a infecção por *A. phagocytophilum* resultou em desestabilização da microbiota intestinal de *I. scapularis* uma vez que a redução de peritrofina-1 contribui para o aumento na expressão de uma glicoproteína anti-congelante no intestino do carrapato, a qual compromete a matriz peritrófica e facilita a colonização de *A. phagocytophilum* (Abraham et al., 2017). Já em *Rhipicephalus microplus*, Capelli-Peixoto e colaboradores (2017) observaram que a deficiência de STAT leva a uma regulação negativa dos AMPs ixodidina e lisozima na glândula salivar e da defensina na glândula salivar e no

intestino destes carrapatos, demonstrando o papel da ativação desta via na síntese e liberação de moléculas efetoras antimicrobianas.

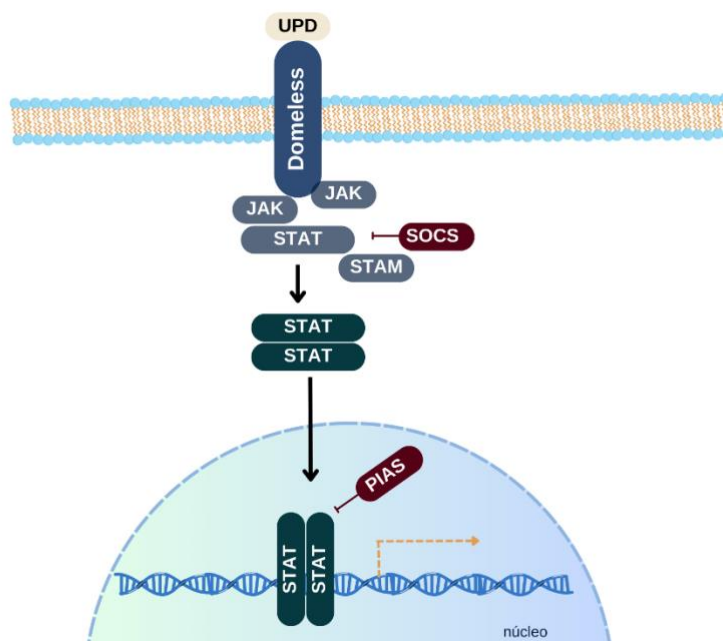


Figura 6. Representação dos componentes das vias de sinalização JAK/STAT. Os componentes em vermelho representam os inibidores da via, enquanto o componente de cor neutra não foi descrito ainda em carrapatos. Imagem criada com a ferramenta BioRender.com. Adaptado de Fogaça e colaboradores (2021).

2.3.3 Peptídeos antimicrobianos (AMP's)

Os peptídeos antimicrobianos (AMP's) correspondem a uma classe de moléculas efetoras conservadas evolutivamente de elevada importância no sistema imunológico de vertebrados e invertebrados, uma vez que possuem um amplo espectro de propriedades antimicrobianas (Zhang & Gallo, 2016; Xuan et al., 2023). Em carrapatos, os peptídeos antimicrobianos são encontrados principalmente nos hemócitos, corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário (Sonenshine & Hynes et al., 2008).

Uma das classes de AMP's produzidas por carrapatos, as hemocidinas, são peptídeos produzidos por proteinases presentes no intestino do ectoparasito, as quais utilizam a hemoglobina ingerida durante o repasto sanguíneo como substrato para a síntese de AMP's derivados da hemoglobina. (Fogaça et al., 1999; Nakajima et al., 2003; Cruz et al., 2010). Apesar de estudos estruturais com a hemocidina Hb33-61a sintética amidada de *R. microplus* terem demonstrado que seu terminal C- α -helicoidal é responsável pela permeabilização de membranas microbianas (Machado et al., 2007), a forma como esses peptídeos atuam ainda não é bem esclarecida (Fogaça et al., 2021).

Uma outra classe de AMP's descritas em diferentes espécies de carrapato é a defensina, a qual atua no combate a diferentes microrganismos, como bactérias resistentes a antibióticos, fungos e protozoários (Hajdusek et al., 2013; Wu et al., 2022). Em *Dermacentor variabilis*, foi demonstrado que a defensina-2 é responsável por causar permeabilização da membrana bacteriana de *Rickettsia montanensis*, resultando no vazamento de proteínas citoplasmáticas e na redução da carga bacteriana no intestino deste carrapato (Pelc et al., 2014). Já em *Ixodes ricinus*, foram isoladas duas isoformas de defensina (Def1 e Def2), sendo a Def2 apontada como mais eficaz em inibir e eliminar bactérias em comparação com a Def1 (Rudenko et al., 2005, 2007). Além disso, foi observado que infecções por *Borrelia* sp., *Rickettsia* sp. e *Neoehrlichia mikurensis* levam a um aumento na expressão de genes codificantes para defensinas em *Ixodes ricinus* e *Dermacentor variabilis* (Szcotko et al., 2024).

Em *Drosophila*, foi demonstrado que a translocação do fator de transcrição Dorsal para o núcleo induz a produção de defensinas (Imler & Hoffman, 2000). Contudo, Alvarado-Delgado e colaboradores (2022) demonstraram que, ao silenciar o gene *PGRP* em *Triatoma pallidipennis* infectado por *Escherichia coli* e *Mycobacterium luteus*, a expressão de defensinas foi diminuída, sugerindo que a via IMD também atua na regulação da expressão deste peptídeo. Além disso, um estudo conduzido por Capelli-Peixoto e colaboradores (2017) demonstrou que a deficiência do fator de transcrição STAT na glândula salivar e no intestino de *R. microplus* infectado por *Anaplasma marginale* resultou em uma diminuição da expressão de defensinas nestes tecidos, sugerindo que a regulação da expressão deste AMP não é restrita a uma única via de sinalização imunológica.

Dentre os peptídeos descritos em carrapatos, cabe destacar ainda a microplusina, um AMP com domínios histidina e cisteína o qual foi isolado inicialmente da hemolinfa de *R. microplus* (Fogaça et al., 2004) e *Amblyomma hebraeum* (Lai et al., 2004). Foi demonstrado que este peptídeo possui atividade bacteriostática contra bactérias gram positivas em *R. microplus*, interferindo no processo de respiração celular ao atuar como quelante de cobre, além de afetar a melanização e a formação de cápsula em infecções por *Cryptococcus neoformans* e exercer um efeito protetor contra a infecção por *Rickettsia rickettsii* em *Amblyomma aureolatum* (Silva et al., 2009, 2011; Martins et al., 2018). Além disso, foi observado que os níveis de microplusina aumentam gradualmente ao longo do desenvolvimento do ovário, alcançando um valor máximo três dias após as fêmeas adultas caírem dos hospedeiros e iniciarem a oviposição, sugerindo que tal peptídeo atua na proteção do embrião antes e após a oviposição (Esteves et al., 2009). Cabe destacar, ainda, que em *R. microplus*, o silenciamento

do gene que codifica para o fator de transcrição da via IMD, o *Relish*, resultou em uma diminuição nos níveis de expressão da microplusina no intestino e na glândula salivar deste carrapato durante infecção por *Anaplasma marginale*, sugerindo que esta via está envolvida na regulação da síntese deste AMP (Capelli-Peixoto et al., 2017).

Uma outra importante classe de moléculas com propriedades antimicrobianas são os inibidores de serina proteases, os quais atuam sobre proteinases de microrganismos envolvidas na colonização de tecidos e evasão das defesas do hospedeiro (Armstrong, 2001). Dentre estes inibidores, destaca-se a ixodidina, descrita inicialmente na glândula salivar de *Rhipicephalus microplus* (Fogaça et al., 2006). Além disso, outros peptídeos inibidores de protease foram descritos em diferentes espécies de carrapatos, como o inibidor de serina proteinase tipo Kunitz (HIMKI) em *Haemaphysalis longicornis* (Miyoshi et al., 2009), o inibidor de tirosina do tipo Kutniz em *Dermacentor variabilis* (Ceraul et al., 2011) e, ainda, a ixoquimostatina em *Ixodes scapularis* (Martins et al., 2025). Em *R. microplus*, a deficiência do fator de transcrição STAT na glândula salivar deste carrapato resultou em uma redução na expressão da ixodidina, indicando que a via JAK/STAT pode regular a expressão de tal molécula efetora (Capelli-Peixoto et al., 2017). Contudo, a forma como estes peptídeos atuam e respondem à infecção em carrapatos ainda não é bem esclarecido.

2.3.4 Metabolismo de oxidorredução

O metabolismo de oxidorredução, ou apenas metabolismo redox, consiste em um complexo sistema que compreende a regulação fina das reações de oxidorredução que ocorrem durante o metabolismo celular (Lennicke & Cochemé, 2021). Fisiologicamente, durante o processo de respiração celular aeróbica, são geradas diversas espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais consistem em uma extensa família de moléculas oxidantes derivadas do oxigênio molecular (Sies et al., 2022). Durante décadas, tais moléculas foram implicadas como descarte metabólico pelo fato de possuírem caráter tóxico, podendo danificar uma gama de biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e, com isso, podendo levar à disfunção e morte celular (Jones, 2006; Cadet & Wagner, 2013; Weidinger & Koslov, 2015). Todavia, os avanços no estudo destes metabólitos demonstraram que as ERO estão envolvidas também em diversos processos significativos para a sobrevivência das células, como controle de lesões teciduais e inflamação, sinalização e proliferação celular, além de diferenciação e apoptose (Fang, 2004; Forrester et al., 2018; Sies, 2020).

Dito isto, durante um processo infeccioso, as ERO possuem relevante papel devido ao seu potencial tóxico ao agente invasor e a sua atuação nas diferentes esferas do metabolismo celular. Dentre as diversas espécies reativas de oxigênio descritas, as principais e mais conhecidas são o radical ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Lennicke & Cochemé, 2021, Sies et al., 2022). Estes metabólitos são produzidos principalmente por enzimas mitocondriais pertencentes à superfamília da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio oxidases (NADPH-oxidases), a qual compreende cinco subfamílias de enzimas homônimas, cuja nomenclatura foi abreviada para NOX (NADPH-oxidases), e duas subfamílias de enzimas relacionadas denominadas dual-oxidases (DUOX) (Lambeth, 2004; Kawahara, 2007). Em geral, as NOXs são enzimas responsáveis por transferir elétrons da molécula NADPH para moléculas de O_2 , formando o radical ânion superóxido (O_2^-), enquanto as enzimas DUOX estão envolvidas principalmente na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela adição de íons H^+ ao O_2^- (Leto & Geiszt, 2006; Block & Gorin, 2012; Conner, 2021).

Além da mitocôndria, uma outra organela que atua como importante fonte de ERO é o retículo endoplasmático, o qual consiste no local de dobragem de proteínas realizada através da formação de pontes dissulfeto intramoleculares, um processo redox que resulta na geração de H_2O_2 . (Sies & Jones, 2020). Tal dobragem oxidativa das proteínas é catalisada principalmente por enzimas da família oxirredutase do retículo endoplasmático 1 (ERO1), as quais transferem elétrons de proteínas com carga por meio de proteínas dissulfeto isomerases (PID) para o oxigênio molecular, gerando peróxido de hidrogênio (Masciarelli & Sitia, 2008; Aanelli et al., 2012; Battharai et al., 2021).

Além disso, uma outra classe de enzimas envolvidas na geração de H_2O_2 são as superóxidos dismutases (SOD), as quais consistem em metaloenzimas que apresentam íons metálicos como cofator, sendo a cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) e a manganês superóxido dismutase (MnSOD) as mais conhecidas (Zelko et al., 2002). Estudos com camundongos demonstraram que tais enzimas podem ser encontradas no citosol ou no meio extracelular, no caso da CuZnSOD ou, ainda, na matriz e membrana interna da mitocôndria, como a MnSOD (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). Como sugere sua nomenclatura, estas enzimas são responsáveis pela reação de dismutação do O_2^- em H_2O_2 (Fridovich, 1995).

Pelo fato de o ânion superóxido ser altamente instável, sua conversão em peróxido de hidrogênio é rapidamente realizada pelas enzimas responsáveis por catalisar tal reação, fazendo com que o H_2O_2 seja a principal molécula utilizada como sensor de estresse oxidativo pelas

células (Marinho et al., 2014; Sies, 2017). Com isso, para evitar que a célula hospedeira seja danificada pelo estresse oxidativo gerado durante processos infecciosos, diversas enzimas antioxidantes atuam de forma a neutralizar tais moléculas e garantir a sobrevivência da célula. Dentre elas, pode-se citar a catalase (CAT), encontrada principalmente nos peroxissomos, e a glutathiona peroxidase (GPX), encontrada principalmente no citoplasma, as quais atuam em conjunto com as enzimas SOD convertendo o H_2O_2 gerado em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2) (Rahal et al., 2014; Handy & Loscalzo, 2022).

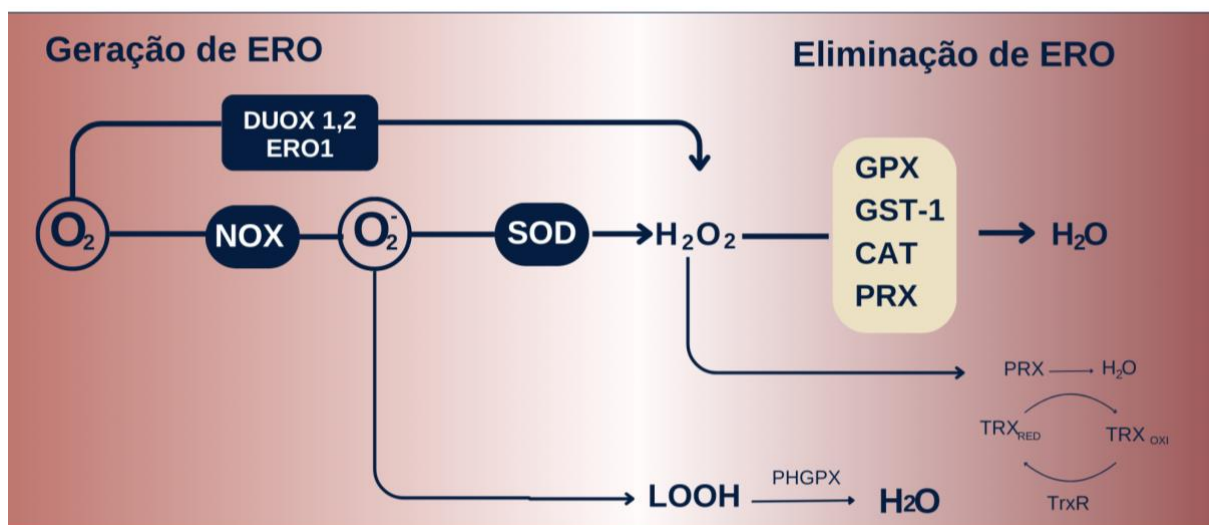


Figura 7. Representação gráfica das enzimas envolvidas no metabolismo de oxidorredução. Esquema desenvolvido através da ferramenta BioRender.com

Uma outra família de enzimas antioxidantes são as peroxirredoxinas (PRX), que correspondem a um grupo de não-seleno peroxidases específicas para tióis responsáveis por eliminar hidroperóxidos orgânicos através de um resíduo específico de cisteína conhecido como Cys, sendo encontrada em diversos compartimentos celulares, como mitocôndria, citosol e peroxissomos (Wood et al., 2003; Villar et al., 2023). Já a fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGPX), uma outra classe de peroxidases, é responsável pela hidrólise de hidroperóxidos de lipídio utilizando o aminoácido glutathiona como doador de elétrons, sendo encontrada principalmente na mitocôndria e no citosol (Hall et al., 2009; Navarro-Yepes et al., 2014). Além disso, uma outra família de enzimas que catalisa reações de oxidorredução utilizando a glutathiona como substrato é a glutathiona-s-transferase (GST), que consiste em um grupo de enzimas encontradas principalmente no citosol, na mitocôndria ou, ainda, associadas a membranas celulares (Hayes et al., 2005). Tais enzimas são responsáveis pela conjugação da glutathiona a compostos eletrofílicos, como o peróxido de hidrogênio, aumentando a solubilidade destes produtos e facilitando sua excreção (Tew et al., 2011; Mazari et al., 2023).

Cabe destacar, ainda, o papel antioxidante das tioredoxinas (TRX) na regulação do metabolismo redox, sendo enzimas redutases que atuam catalisando a troca de dissulfeto/ditíol de moléculas proteicas oxidantes, como a glutathiona ou até mesmo as peroxirredoxinas em seu estado oxidado, através de um sítio altamente conservado contendo resíduos de cisteína (Nakamura et al., 1997). Após a conclusão de um ciclo catalítico, esses dois resíduos de cisteína são oxidados e formam uma ligação dissulfeto, sendo convertidos de volta ao estado reduzido pela tioredoxina redutase (TRXR) (Zhong et al., 2000; Lu & Holmgren, 2014). Estas enzimas são distribuídas em diversos compartimentos celulares, como citosol, mitocôndria, associadas à membrana celular ou, ainda, podem ser secretadas para o compartimento extracelular (Collet & Messens, 2010).

Com isso, observa-se que a regulação do balanço redox celular depende da atuação conjunta de diferentes enzimas com atividade tanto pró-oxidantes como antioxidantes. Assim, em células de mamífero, a expressão de genes codificantes para tais enzimas envolvidas no metabolismo redox, como as SOD e as enzimas envolvidas no metabolismo de oxidação/redução da glutathiona, está associada principalmente à atuação de fatores de transcrição sensíveis à variação na concentração de peróxido de hidrogênio, como o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e o NF- κ B (Marinho et al., 2014; Sies, 2017). O mesmo foi observado em *Drosophila*, onde a sinalização do Nrf2 ativada por substâncias oxidantes induziu respostas antioxidantes no organismo da mosca, conferindo maior tolerância ao estresse oxidativo (Sykiots & Bohman, 2008). Já em células de *Aedes albopictus* infectadas pelo vírus da dengue (DENV2), o silenciamento de um outro fator de transcrição, o p53, envolvido na expressão do gene da catalase, resultou em acúmulo de ERO nas células infectadas, evidenciando o papel deste fator no metabolismo redox de mosquitos (Chen et al., 2018).

Em carrapatos, por sua vez, foi demonstrado que o Nrf2 está diretamente envolvido na resposta oxidativa a patógenos, uma vez que a infecção por *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* em *Ixodes scapularis* induziu a atividade de Nrf2, enquanto que células de carrapato deficientes para a expressão de Nrf2 mostraram acúmulo de espécies reativas de oxigênio, além de uma redução na sobrevivência microbiana (Rosche et al., 2023). Apesar destes resultados evidenciarem o papel deste fator de transcrição na resposta oxidativa de carrapatos, maiores estudos ainda necessitam ser conduzidos para melhor compreensão de como a expressão de genes pró e antioxidantes é induzida nestes artrópodes em resposta à infecção.

Vale ressaltar que, embora não haja evidências de como o metabolismo redox de carrapatos opera no combate a infecções, sabe-se que os hemócitos produzem espécies reativas de oxigênio sob estimulação, uma vez que bactérias gram-positivas induziram a produção de peróxido de hidrogênio e superóxido pelos hemócitos de *Rhipicephalus microplus* (Pereira et al., 2001). Nesta mesma espécie de carrapato, a enzima citocromo c oxidase III, pertencente ao complexo IV mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons e envolvida na formação de ERO, demonstrou ser relevante para o balanço redox e para a transmissão de *Anaplasma marginale*, uma vez que o silenciamento desta enzima resultou em falha na transmissão deste patógeno para bovinos (Bifano et al., 2014).

Já em *Ixodes scapularis*, o silenciamento da peroxirredoxina Salp25D dificultou a aquisição de *Borrelia burgdorferi* pelo carrapato quando este alimentou-se em camundongos infectados, sugerindo que a referida enzima pode estar envolvida na desintoxicação das ERO tanto no local de alimentação, quanto no intestino do carrapato (Narasimhan et al., 2007). Além disso, na mesma espécie, foi observado que uma matriz extracelular formada por ligações covalentes de ditirosina, catalisadas pela dual oxidase (DUOX) e por outras enzimas denominadas heme peroxidases, está localizada no intestino e atua como um escudo, favorecendo a colonização por *B. burgdorferi* (Yang et al., 2014). Em *Amblyomma maculatum*, por sua vez, foi observado que a infecção por *Rickettsia parkeri* induziu um aumento na expressão da enzima catalase na glândula salivar, no intestino e no ovário do vetor, enquanto que o silenciamento do gene que codifica para tal enzima resultou em diminuição nos níveis da bactéria; demonstrando, assim, o papel da catalase no controle do estresse oxidativo em resposta à infecção em carrapatos (Budachetri et al., 2017).

Sendo assim, observa-se que o metabolismo redox constitui um importante mecanismo tanto em processos fisiológicos, quanto em processos fisiopatológicos envolvidos na sobrevivência de carrapatos (Sabadin et al., 2019; Hernandez et al., 2022). Dessa forma, a ampliação de estudos envolvendo os diferentes componentes deste metabolismo, assim como sua interrelação com outros componentes da resposta imunológica de carrapatos, podem auxiliar na identificação de potenciais alvos para o controle destes artrópodes e, consequentemente, das doenças transmitidas por eles.

CAPÍTULO I

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE OXIDORREDUÇÃO NOS DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDIDAE) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE)

RESUMO

RABELLO, Carla Alves. **Expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução nos diferentes estágios evolutivos de *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDIDAE) em resposta à infecção por *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE)**. 2025. 24p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A piroplasmose equina corresponde a uma das principais enfermidades que acomete equídeos ao redor do mundo e tem o protozoário *Theileria equi* como um de seus agentes etiológicos. A transmissão se dá principalmente através de carrapatos infectados durante o repasto sanguíneo. No Brasil, *Rhipicephalus microplus* é a única espécie de carrapato com capacidade vetorial de transmitir *T. equi* comprovada experimentalmente. Contudo, existem diversas lacunas a respeito dos mecanismos envolvidos nesta interface patógeno-vetor. Para sobreviver e ser transmitido a um hospedeiro suscetível, o parasito necessita evadir a resposta imunológica inata do carrapato. Um dos principais componentes desta resposta é o metabolismo redox, o qual compreende uma série de enzimas que atuam na síntese e na regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) no ambiente celular. As ERO atuam em processos infecciosos devido ao seu caráter tóxico, podendo gerar danos celulares aos patógenos. Porém, tal toxicidade se estende também à célula hospedeira, havendo necessidade de uma resposta orquestrada envolvendo componentes pró e antioxidantes para garantir a sobrevivência celular. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo redox nos diferentes estágios evolutivos de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. Para isso, um equino portador crônico de *T. equi* (controle positivo) e um equino não infectado (controle negativo) foram infestados com larvas de *R. microplus* livres de patógenos. Após o período de fixação e repasto sanguíneo, larvas e ninfas inteiras foram coletadas e armazenadas individualmente, enquanto as fêmeas foram dissecadas e o intestino e a glândula salivar de cada exemplar foi armazenado de forma individual. Em seguida, foi feita a extração do RNA e a síntese do cDNA de cada amostra, os quais foram submetidos ao ensaio de expressão gênica relativa através da qPCR. No intestino de *R. microplus*, os genes pró-oxidantes *CuZnSOD*, *DUOX-1*, *DUOX-2* e *ERO1* foram mais expressos no grupo infectado em relação ao controle, enquanto que na glândula salivar apenas os genes *DUOX-1* e *DUOX-2* foram regulados positivamente, sugerindo que tais enzimas podem desempenhar relevante papel na resposta oxidativa de *R. microplus* à infecção por *T. equi* em diferentes tecidos. Em relação aos genes antioxidantes analisados, apenas o gene *catalase* foi mais expresso no grupo infectado, considerando ambos os tecidos, sugerindo que esta enzima pode ser crucial no controle dos níveis de ERO no ambiente celular. Na glândula salivar, contudo, foi observado que o gene que codifica para a enzima glutationa-s-transferase (*GST-1*) foi significativamente suprimido no grupo infectado, sugerindo que tal enzima pode ter papel fundamental na resposta antioxidante neste tecido e sua supressão indica um mecanismo de favorecimento da resposta oxidativa pelo carrapato. Nos estágios de larva e ninfa de *R. microplus*, contudo, a infecção por *T. equi* pareceu não estimular significativamente uma resposta oxidativa. Os resultados obtidos neste trabalho auxiliam na elucidação da resposta oxidativa de *R. microplus* à infecção por *T. equi* e permite identificar possíveis moléculas-chave para o desenvolvimento de novas ferramentas de prevenção e controle da piroplasmose equina no Brasil.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, interação patógeno-vetor., metabolismo redox de carrapatos

ABSTRACT

RABELLO, Carla Alves. **Differential expression of genes related to redox metabolism in different developmental stages of *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDIDAE) in response to *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE) infection.** 2025. 24p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Equine piroplasmosis is one of the main diseases affecting equids worldwide, with the protozoan *Theileria equi* being one of its etiological agents. Transmission occurs mainly through infected ticks during blood feeding. In Brazil, *Rhipicephalus microplus* is the only tick species with experimentally proven vector capacity to transmit *T. equi*. However, there are still several gaps regarding the mechanisms involved in this pathogen-vector interface. To survive and be transmitted to a susceptible host, the parasite needs to evade the tick's innate immune response. One of the main components of this response is redox metabolism, which involves a series of enzymes that regulate the synthesis and levels of reactive oxygen species (ROS) in the cellular environment. ROS play a role in infectious processes due to their toxic nature, potentially causing cellular damage to pathogens. However, this toxicity also extends to the host cell, necessitating a coordinated response involving both pro- and antioxidants to ensure cellular survival. Therefore, the aim of this study was to evaluate the differential expression of genes related to redox metabolism in different developmental stages of *Rhipicephalus microplus* in response to *Theileria equi* infection. For this, a chronically infected equine with *T. equi* (positive control) and a non-infected equine (negative control) were infested with *T. equi*-free *R. microplus* larvae. After the fixation and blood feeding period, whole larvae and nymphs were collected and stored individually, while the females were dissected, and the midgut, ovary, and salivary gland of each specimen were stored separately. RNA extraction and cDNA synthesis were performed for each sample, followed by relative gene expression assays using qPCR. In the midgut of *R. microplus*, the pro-oxidant genes *CuZnSOD*, *DUOX-1*, *DUOX-2*, and *ERO1* were more highly expressed in the infected group compared to the control, while in the salivary gland, only the *DUOX-1* and *DUOX-2* genes were positively regulated, suggesting that these enzymes may play a significant role in the oxidative response of *R. microplus* to *T. equi* infection in different tissues. Regarding the antioxidant genes analyzed, only the *catalase* gene was more highly expressed in the infected group in both tissues, suggesting that this enzyme may be crucial in controlling ROS levels in the cellular environment. In the salivary gland, however, it was observed that the gene encoding the enzyme glutathione S-transferase (*GST-1*) was significantly suppressed in the infected group, suggesting that this enzyme may play a key role in the antioxidant response in this tissue, and its suppression indicates a mechanism favoring the oxidative response by the tick. In the larval and nymph stages and in the ovary of *R. microplus*, *T. equi* infection did not seem to significantly stimulate an oxidative response. The results obtained in this study help to elucidate the oxidative response of *R. microplus* to *T. equi* infection and identify potential key molecules for the development of new tools for the prevention and control of equine piroplasmosis in Brazil.

Keywords: Equine piroplasmosis, pathogen-vector interface, tick redox metabolism.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por carrapatos representam uma ameaça global e são responsáveis por causar prejuízos à saúde de diferentes espécies animais (de la Fuente et al., 2023). Em equídeos, a principal delas é a piroplasmose equina (PE), uma enfermidade que possui como um de seus agentes etiológicos o protozoário intraeritrocítico *Theileria equi* (Laveran, 1901, Melhorn & Schein, 1998), capaz de infectar uma gama de hospedeiros, como cavalos, mulas, burros e zebras, sendo também descrita na literatura a detecção deste parasito em hospedeiros não equídeos, como cães, camelos e antas (Criado-Fornelio et al., 2004; Fritz, 2010; Qablan et al., 2012; Da Silveira et al., 2017; Elsway et al., 2023).

Infecções por *T. equi* podem gerar sinais clínicos variados. Em casos agudos, os animais podem apresentar febre alta ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), inapetência, perda de peso, hemoglobinúria, icterícia, anemia hemolítica e, ainda, podem vir a óbito (Tamzali, 2013; Coultous et al., 2018). Em casos crônicos, todavia, os animais tendem a ser assintomáticos e atuar como fonte de infecção no rebanho (Rothschild, 2013; Onyiche et al., 2019). Isso se deve principalmente ao fato de não haver vacinas eficazes em prevenir a infecção ou fármacos comercialmente disponíveis que sejam capazes de eliminar o parasito do organismo animal (Sears et al., 2020; Tyrosh-Levy et al., 2020). Assim, o diagnóstico positivo para piroplasmose equina faz com que haja impedimentos no trânsito internacional de equídeos e, associado aos gastos medicamentosos e aos prejuízos à saúde animal, tal enfermidade é responsável por gerar severos impactos ao setor equestre ao redor do mundo (Friedhoff, 1990; Wise et al., 2013).

Diversas espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Amblyomma* são incriminadas como vetores de *T. equi*, (De Wall, 1992; Scoles & Ueti, 2015). No Brasil, a única espécie com capacidade vetorial comprovada experimentalmente é o carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus* (Guimarães et al., 1998; Peckle et al., 2022). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos na interface patógeno-vetor que permitem com que *R. microplus* seja capaz de transmitir *T. equi* ainda não estão esclarecidos.

Sabe-se que, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, *R. microplus* ingere as formas evolutivas de macro e microgametócitos de *T. equi*, as quais irão colonizar o intestino do carrapato, se diferenciar e, posteriormente, migrar para a glândula salivar através da hemolinfa para então serem transmitidas a um hospedeiro suscetível (Rothschild, 2013). Em cada um desses tecidos, o parasito necessita evadir as defesas imunológicas do vetor para que

consiga completar seu ciclo de forma eficiente (Hajdusek, 2013; Aguilar-Díaz et al., 2021). Nesse sentido, a resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra infecções microbianas em animais e, assim como nos demais invertebrados, o sistema imunológico inato do carrapato é composto por respostas imunes celulares e humorais que reconhecem patógenos e agem contra eles de maneira orquestrada (Hofmann et al., 1999; Sonenshine & Hynes, 2008; Fogaça et al., 2021).

Dentre os mecanismos humorais de defesa, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são reconhecidas por desempenhar importante papel em processos fisiopatológicos associados à infecção (Fang, 2004; Jones, 2006). Estas ERO correspondem a moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio que atuam em diversos processos significativos para a sobrevivência das células, como controle de lesões teciduais e inflamação, sinalização, proliferação celular e controle de patógenos (Fang, 2004; Forrester et al., 2018; Sies et al., 2020). Em células humanas, por exemplo, foi observado que moléculas derivadas do H_2O_2 foram capazes de neutralizar a carga viral do HIV in vitro (Chocola et al., 1994). Já em *Drosophila*, o silenciamento de genes pró-oxidativos resultou em um aumento na mortalidade de moscas após infecção bacteriana, indicando a importância das ERO no combate a diferentes patógenos (Ha et al., 2005).

Com isso, diferentes enzimas estão envolvidas na geração das ERO, como a NADPH oxidase, responsável por produzir ânions superóxido (O_2^-), além das enzimas dual oxidase (DUOX), oxidoredutase do retículo endoplasmático 1 (ERO1) e as superóxido dismutases (SOD), as quais atuam na síntese do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Lambeth, 2004; Batharai et al., 2021; Conner, 2021). Contudo, tais moléculas possuem também um caráter tóxico, podendo danificar uma gama de biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e, com isso, levar à disfunção e a morte celular tanto do agente patogênico, quanto da célula hospedeira (Jones, 2006; Cadet et al., 2010; Weidinger & Koslov, 2015).

Sendo assim, a regulação nos níveis das ERO envolve também a atuação de diversas enzimas antioxidantes que irão neutralizar esses compostos e minimizar seus efeitos nocivos à célula hospedeira, como a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPX), envolvidas na detoxificação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Além delas, destacam-se também a tioredoxina (TRX), uma redutase que catalisa a troca de dissulfeto/ditíol de moléculas proteicas oxidantes, como a glutational, através de um sítio altamente conservado contendo resíduos de cisteína (Nakamura et al., 1997). Após a conclusão de um ciclo catalítico, esses dois resíduos de cisteína são

oxidados e formam uma ligação dissulfeto, sendo convertidos de volta ao estado reduzido pela tiorredoxina redutase (TRXR) (Zhong et al., 2000; Lu & Holmgren, 2014).

Já as peroxirredoxinas (PRX) correspondem a um grupo de não-seleno peroxidases específicas para tióis responsáveis por eliminar hidroperóxidos orgânicos (Wood et al., 2003; Villar et al., 2023), enquanto a fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPX), é responsável pela redução de H_2O_2 utilizando o aminoácido glutathione como doador de elétrons (Hall et al., 2009; Navarro-Yepes et al., 2014). Além disso, uma outra família de enzimas que catalisa reações de oxidorredução utilizando a glutathione é a glutathione-S-transferase (GST), que consiste em um grupo de enzimas responsáveis pela conjugação da glutathione a compostos eletrofílicos, como o peróxido de hidrogênio, aumentando a solubilidade destes produtos e facilitando sua excreção (Tew et al., 2011; Mazari et al., 2023).

Em carrapatos, diferentes estudos buscaram avaliar o papel das enzimas envolvidas no metabolismo redox frente a um processo infeccioso. À exemplo, foi observado em *Amblyomma maculatum* que a infecção por *Rickettsia parkeri* induziu um aumento na expressão do gene *catalase* na glândula salivar, no intestino e no ovário do vetor, enquanto que o silenciamento do gene que codifica para tal enzima resultou em diminuição nos níveis da bactéria (Budachetri et al., 2017). Já em *Ixodes scapularis*, foi sugerido que a enzima dual oxidase desempenha um papel relevante na sobrevivência da bactéria *Borrelia burgdorferi* no intestino do vetor (Yang et al., 2014). Em cultivos celulares de *Rhipicephalus microplus*, por sua vez, a infecção por *Anaplasma marginale* resultou em um aumento na expressão de genes que codificam para diferentes enzimas antioxidantes, sugerindo que tal resposta imunológica atua no controle da infecção nesta espécie de carrapato (Kalil et al., 2017).

Sendo assim, elucidar os componentes imunológicos envolvidos na interface patógeno-carrapato à nível molecular fornece subsídios que auxiliam na identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas no intuito de bloquear a transmissão do patógeno. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão diferencial de genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo redox nos diferentes estágios evolutivos de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Comitê de Ética

O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro aprovou esses procedimentos inscritos sob o número 3948221223.

2.2 Local do estudo

O estudo experimental foi realizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ, do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro e no Laboratório de Sanidade Avícola, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, pertencente ao mesmo instituto e instituição acima citados.

2.3 Manutenção dos equinos

Os cavalos utilizados no experimento foram mantidos estabulados em baias individuais da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (UFRRJ). Os animais receberam uma dieta à base de feno de Coast Cross, ração comercial fornecida três vezes ao dia e água ad libitum.

O equino utilizado como controle positivo consiste em um animal sem raça definida (SRD), com idade de 2 anos, infectado naturalmente por *T. equi*. Já o equino utilizado como controle negativo consiste em um animal SRD livre de hemoparasitos, apresentando 2 meses de idade à época do experimento, sendo mantido estabulado juntamente da progenitora por apresentar idade inferior ao desmame e alimentado através da amamentação natural.

2.4 Coleta de sangue dos animais

O sangue dos equinos foi coletado semanalmente durante o experimento para análise através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) de acordo com Kim et al. (2008) no intuito de determinar o “status” da infecção dos animais durante todo o período de infestação pelo carrapato *R. microplus*.

Dessa forma, os animais foram posicionados em troncos de contenção e o sangue coletado através da punção da veia jugular utilizando seringas estéreis de 5,0 mL, sendo feita a antisepsia prévia da região de coleta utilizando algodão imerso em solução de álcool 70%. Após coleta, o sangue foi armazenado em tubos de 4mL contendo K3 EDTA, os quais foram acondicionados a -20°C para posterior extração do DNA e análise por meio da qPCR.

2.5 Criação e manutenção de colônias de carrapatos livres de *Theileria equi*

A cepa Porto Alegre de *R. microplus* livre de hemoparasitos foi mantida no Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em bovinos jovens da raça girolanda livre de patógenos. A partir desta colônia, foram selecionadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* provenientes de animais experimentalmente infestados e mantidas em câmara climatizada tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) à temperatura de 27 °C (\pm 1) e umidade relativa superior a 80% (Bittencourt, 1990).

Amostras de ovos dos três primeiros dias de postura foram separadas e transferidas para seringas descartáveis estéreis adaptadas (Daemon, 1985), as quais foram mantidas em B.O.D., nas mesmas condições descritas anteriormente, para incubação e eclosão das larvas.

2.6 Obtenção de larvas, ninfas e tecidos (glândulas salivares e intestino) de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

2.6.1 Infestação e coleta dos carrapatos

Foram depositados 4g de larvas de *R. microplus* livremente no dorso dos cavalos através de seringas estéreis descartáveis. No 9º dia as larvas foram recuperadas do corpo dos animais, no 17º dia as ninfas e, no 28º dia pós-infestação, as fêmeas ingurgitadas foram também recuperadas diretamente do corpo dos animais, sendo coletados 15 exemplares de cada equino para cada estágio evolutivo, totalizando 90 amostras.

Os carrapatos infectados com *T. equi* foram obtidos a partir de infestação em equinos cronicamente infectados, formando o grupo *T. equi*-infectado. Os carrapatos não infectados foram obtidos a partir da infestação no equino livre de hemoparasitos, formando o grupo controle.

2.6.2 Higienização, dissecação e acondicionamento dos carrapatos

Após coletados, os carrapatos foram imediatamente imersos em água corrente e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por 3 min e em álcool 70% por 2 min (Antunes et al., 2012). Após a identificação, os exemplares de larvas e ninfas, em seus respectivos dias de coleta pós-infestação, foram armazenados inteiros de forma individual em tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 30 uL de “RNAlater” (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia). Os microtubos foram mantidos em freezer a -80 °C até o momento da execução das análises moleculares. As fêmeas ingurgitadas, por sua vez, foram dissecadas após a higienização e identificação. Dessa forma, os espécimes foram fixados individualmente em placas de Petri contendo parafina preta para aumentar o contraste. Em seguida, foi feita uma

incisão no sulco marginal, passando-se o idiossoma, com auxílio de tesoura oftálmica de ponta fina e pinça entomológica, também sob microscópio estereoscópico (LED SMZ 445, Nikon, Tóquio, Japão). Após a incisão completa, o tegumento foi dobrado para melhor visualização das estruturas internas e a cavidade exposta foi banhada em solução fisiológica estéril a 0,9% solução salina a 4 °C. Em seguida, o intestino e as glândulas salivares foram coletados e lavados em solução fisiológica estéril a 0,9% gelada três vezes antes do armazenamento de forma individual nas mesmas condições descritas para larvas e ninfas.

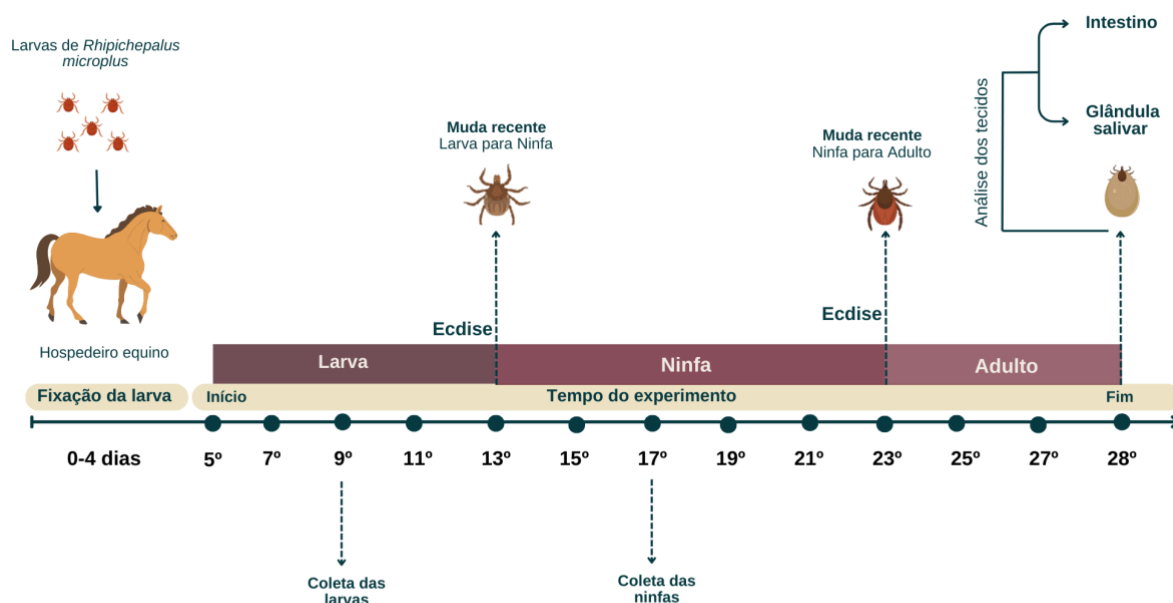


Figura 1. Linha temporal evidenciando as fases do período de infestação onde foram coletadas as larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em equinos cronicamente infectados por *Theileria equi*. O esquema foi criado através da ferramenta BioRender.com.

2.7 Extração do DNA total das amostras de sangue equino

Amostras de sangue total dos animais utilizados no experimento foram extraídas através do método fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Assim, foi adicionado 350 uL de sangue total em microtubos de polipropileno de 2,0 mL contendo 500 uL de solução de lise (Tris-HCL 10 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; cloreto de sódio 100 mM e SDS 2%) e 20 uL de proteinase K (20 mg/ml). Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado em vórtex “Classic Vortex Mixer” (VELP Scientifica, MB, Itália) e incubado a 56°C durante 1 h com agitação a 650 rpm em um “Thermomixer” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Após esse processo, as amostras foram retiradas do “Thermomixer” e em seguida foi adicionado 870 uL de solução de fenol tamponado pH 8.0 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt,

Alemanha). As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas a 15000 x rpm por 10min em uma centrífuga refrigerada Rotina 380R (Hettich Lab, BW, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado a novos tubos de 2,0 mL contendo 500 uL de clorofórmio, sendo agitadas em vortex e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. Após esse processo, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL contendo 50 uL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 500 uL de etanol 100%. As amostras foram agitadas em vortex mantidas a -20°C durante 1,5 h. Posteriormente, o DNA foi recuperado por centrifugação a 15.000 x rpm durante 10 min e o sobrenadante descartado. Foi adicionado, em seguida, 500 uL de álcool 70% seguido de centrifugação nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 40 min para secagem e, em seguida, eluídas em 30 uL de água livre de nucleases (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia).

2.8 Extração do RNA total das amostras de carrapato

Primeiramente, as amostras foram lavadas três vezes utilizando 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugadas a 12.000 × g por 15 min para remoção do “RNAlater” (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia). O RNA das amostras coletadas foi extraído utilizando um kit de purificação de RNA Invitrogen™ TRIzol™ Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo todo o processo realizado com as amostras acondicionadas no gelo.

Assim, após a lavagem com PBS, foi adicionado 1 mL de TRIzol nos tubos contendo as amostras, sendo eles agitados manualmente até a dissolução completa do tecido. As amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado 200 uL de clorofórmio. Após agitar vigorosamente por 15 s, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 3 min e, em seguida, centrifugadas a 12.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno de 2,0 mL contendo o mesmo volume de álcool 70%. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 seg e o conteúdo transferido para colunas de sílica dispostas em tubos coletores. As colunas foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 seg, o tubo coletor foi descartado e a sílica inserida em novo tubo coletor. Foi adicionado 350 uL de “Wash Buffer I” em cada amostra, seguida de centrifugação nas condições descritas acima. Após esse processo, adicionou-se 40 uL de solução de DNase I (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) no centro da coluna de sílica a fim de eliminar o DNA genômico contaminante. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado novamente 350 uL de “Wash Buffer I”. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 seg, as colunas

foram inseridas em novos tubos coletores, sendo adicionado 700 uL de “Wash Buffer II”. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas acima e o processo repetido duas vezes. Por fim, as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, onde foi adicionado 30 uL de “RNase Free Water” no centro de cada coluna para eluição do RNA extraído.

Após a extração, a quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

2.9 Síntese do cDNA a partir do RNA extraído das amostras de carrapato

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando um kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Vilnius, Lituânia) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as reações foram feitas em triplicata, com um volume final de reação de 15 µL contendo: 1X “RT Buffer”, 1X “dNTP Mix”, 1X “RT Random Primer”, 1uL de “Multi Scribed Reverse Transcriptase”, 4,2 uL de “Nuclease Free Water” e 5 uL de amostra. Posteriormente, o cDNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

2.10 Detecção e quantificação de *Theileria equi* a partir das amostras de DNA total de sangue equino e do cDNA das amostras de carrapato

O DNA do sangue total dos cavalos e o cDNA das amostras de carrapatos dos grupos experimentais foram submetidos à reação de qPCR baseados na sequência *18S rRNA* de *T. equi* conforme descrito por Kim e colaboradores (2008). Sendo assim, foi empregado o par de primers Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3'), além de uma sonda fluorescente Be18SP (5'-FAM-AATTAGCGAATCGCATGGCTT-TAMRA3'), marcada na extremidade 5' com o reporter 6-carboxifluoresceína (FAM) e com o quencher 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) na extremidade 3'. As reações foram realizadas com um volume final de reação de 12 µL contendo: 1X “TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA)”, 450 nM de cada primer, 250 nM de sonda e 90 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 45 ciclos a 95 °C por 20 seg, seguidos de 55 °C por 1 min. Como controle positivo, foi utilizado 90 ng de DNA total extraído do sangue de equino cronicamente infectado com *T. equi*. Como controle negativo, foi utilizado 3 µL de água livre de nuclease. Todas as reações foram realizadas em triplicata. As amostras foram consideradas positivas se o valor de Cq for menor ou igual a 40 ciclos. Os valores médios de Cq obtidos a partir das três repetições do grupo infectado foram plotadas em uma curva

padrão produzida por Peckle et al. (2022) para fins de quantificação da carga parasitária das amostras.

2.11 Ensaios de expressão gênica

Foram selecionados 11 genes relacionados ao metabolismo redox, conforme descrito na Tabela 1. Além destes, foram utilizados quatro genes de referência para posterior normalização dos níveis relativos de expressão gênica obtidos, sendo eles: *RmRIBS3A* [CV443892], *RmBact* [AY255624], *RmGAPDH* [CK180824] e *RmMALATE* [CV455409].

Quadro 1. Genes envolvidos no metabolismo redox do carrapato *Rhipicephalus microplus* selecionados para análise de expressão gênica diferencial.

Abreviação do gene	Nome do gene	GenBank [número]	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Referência
<i>RmRIBS3A</i>	<i>40S ribosomal protein S3A</i>	[CV443892]	GGACGACCGA TGGCTACCT	TGAGTTGATTG GCGCACTTCT	Rosa et al. (2016)
<i>RmBact</i>	<i>B-actina</i>	[AY255624]	CCCATCTACG AAGGTTACGC C	CGCACGATTTC ACGCTCAG	Nijhof et al. (2009)
<i>RmGAPDH</i>	<i>Gliceraldeído 3-Fosfato Dehidrogenase</i>	[CK180824]	AGTCCACCGG CGTCTTCCTCA	GTGTGGTTCAC ACCCATCACA	Nijhof et al. (2009)
<i>RmMALATE</i>	<i>Malate dehidrogenase</i>	[CV455409]	AAACTGTCCC AGTACGAGTC	TTCTTGACGA AGTCCTCTCC	Kalil et al. (2017)
<i>RmERO1</i>	<i>Oxirredutase do Retículo Endoplasmático</i>	[CV453012.1]	ATGGCCCATA CACGACATCC	ACGTTGATAC TGCGTGTAG	Kalil et al. (2017)
<i>RmDUOX-1</i>	<i>Dual oxidase-1</i>	[CV442800.1]	GATAACGCTTT TCGACCGCC	ACGGCCACAT AGAGTCATGC	Este estudo
<i>RmDUOX-2</i>	<i>Dual oxidase-2</i>	[CV449552]	CTGTACACCC TCGTGCTGTT	ACGTATTGGT GCAGGAACGT	Este estudo
<i>RmCAT</i>	<i>Catalase</i>	[CK175079]	TTCATGGAGA TGTTGACCGC	TGAAGTCCTG AGCATCCTTC	Kalil et al. (2017)
<i>RmGPX</i>	<i>Glutathiona Peroxidase</i>	[CV440147]	TCTCTGTTGG TGACTGAGAC	TGAGTGTTCA GTCCATGGTG	Kalil et al. (2017)

Quadro 1. Continuação.

Abreviação do gene	Nome do gene	GenBank [número]	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Referência
<i>RmGSTI</i>	<i>Glutathiona-S-Transferase</i>	[CK180220]	AGCAGCCAAT GGCAACATTA	TTCGCACTCC TTCACCTCAT	Kalil et al. (2017)
<i>RmTRX</i>	<i>Tiorredoxina</i>	[CK190673]	TGGTACGCCCT CAAGTATGG	GTCCATTGGC AGTGATCACG	Kalil et al. (2017)
<i>RmTRXR</i>	<i>Tiorredoxina Redutase</i>	[CV451339]	CCCTGACTGTG AGCAAGAGG	CAGTGAGTTT GGGTGCAAGC	Este estudo
<i>RmPRX</i>	<i>Peroxirredoxina</i>	[CK179571]	TGATGACAAG GGCAACCTTC	GTAGGGATGA TCGTATCTCC	Kalil et al. (2017)

Antes de serem empregados, cada par de primer foi submetido a uma curva de eficiência de seis pontos a fim de garantir a eficiência das reações analisadas. O ensaio de expressão gênica foi realizado em triplicata utilizando uma placa de reação de 96 poços MicroAmp® Fast em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Singapore, Singapore). Cada reação de qPCR continha 1X “SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,4 µM de cada primer e 45 ng/µL de cDNA em um volume final de 12 µL. Os níveis relativos de expressão gênica no grupo controle em comparação ao grupo infectado por *T. equi* foram normalizados com a média aritmética dos valores de Cq dos quatro genes de referência, sendo calculados segundo o método $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.12 Análise Estatística

A análise estatística das da expressão gênica diferencial observada entre o grupo infectado e o grupo controle foi analisada através do GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, CA, EUA). . Inicialmente, os valores de ΔCq foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Com isso, de acordo com os resultados obtidos, o grupo controle e infectado por *T. equi* foram comparados pelo teste paramétrico t de Student ou pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de $p < 0,05$ em um intervalo de confiança (IC) de 95% foram considerados estatisticamente significativas

3 RESULTADOS

3.1 Carga parasitária de *T. equi* em larvas, ninfas e tecidos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

A carga parasitária resultante da infecção por *T. equi* nas amostras de larvas foi de 198116 ± 853377 parasitos/ μL de amostra analisada, enquanto no estágio de ninfa foi observada uma carga parasitária de 7680832 ± 75484787 parasitos/ μL . Já em amostras de intestino das fêmeas ingurgitadas coletadas, a carga parasitária resultante foi de 5064 ± 62081 parasitos/ μL , enquanto na glândula salivar o valor obtido foi de 5696727 ± 14700221 parasitos/ μL .

3.2 Expressão gênica diferencial em larvas inteiras de *R. microplus*

Dentre os 11 genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo redox, dois deles apresentaram expressão diferencial significativa no estágio de larva (Figura 2). O gene *oxirredutase do retículo endoplasmático 1 (ERO1)* foi 5 vezes regulado negativamente no grupo infectado em relação ao grupo controle ($p = 0,0008$; IC = 1,13 – 3,48). Em contrapartida, o gene *glutathione-s-transferase 1 (GST-1)* foi 2,35 vezes regulado positivamente no grupo infectado quando comparado ao controle ($p = 0,03$; IC = -2,08 – 0,08). Os demais genes analisados não apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa (Anexo 1).

3.3 Expressão gênica diferencial em ninfas inteiras de *R. microplus*

No estágio de ninfa, o único gene que apresentou expressão diferencial significativa foi o gene antioxidante *fosfolipídio hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPX)*, sendo 5 vezes menos expresso em *R. microplus* infectado por *T. equi* em relação ao controle ($p < 0,0001$; IC = 1,674 – 3,025) (Figura 2). Os demais genes não apresentaram expressão diferencial significativa estatisticamente (Anexo 2).

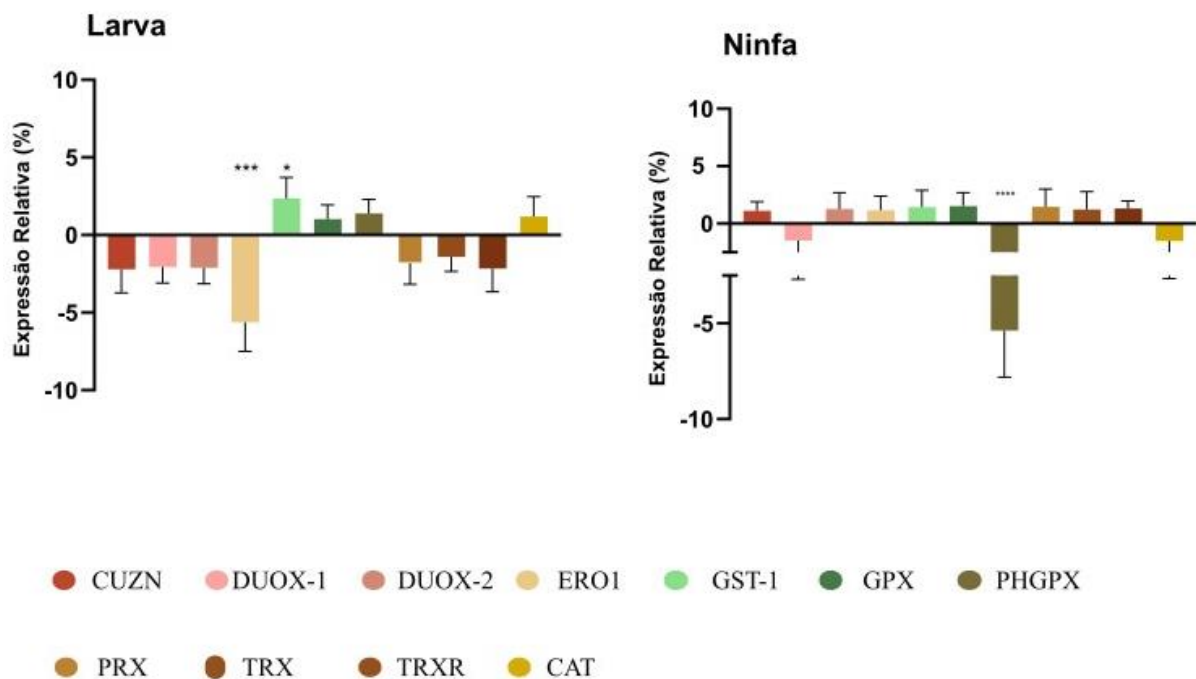


Figura 2. Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução nos estágios de larva e ninfa do carrapato *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. Genes pró-oxidantes: CUZN = cobre-zinco superóxido dismutase; DUOX-1 = dual oxidase-1; DUOX-2 = dual oxidase-2; ERO1 = oxirredutase do retículo endoplasmático. Genes antioxidantes: GST-1 = glutathione-s-transferase-1; GPX = glutathione peroxidase; PHGPX = fosfolípido hidropéroxido glutathione peroxidase; PRX = peroxirredoxina; TRX = tiorredoxina; TRXR = tiorredoxina redutase; CAT = catalase

3.4 Expressão gênica diferencial tecido-específica em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

3.4.1 Intestino

No intestino das fêmeas ingurgitadas foi observada uma intensa resposta oxidativa diferencial entre os grupos infectado e não infectado (Figura 3). Com isso, dentre os genes pró-oxidantes, o gene *cobre-zinco superóxido dismutase* (*CuZnSOD*) foi 9,7 vezes regulado positivamente no grupo infectado em relação ao controle ($p = <0,0001$; IC = -3,68 – -2,50). Da mesma forma, os genes *dual oxidase-1* e *dual oxidase-2* (*DUOX-1* e *DUOX-2*) foram 3,14 ($p = 0,04$; IC = -1,96 – -0,44) e 6,42 ($p = 0,0002$; IC = - 3,25 – - 1,31) vezes mais expressos no grupo infectado, respectivamente. Um outro gene pró-oxidante regulado positivamente foi o *oxirredutase do retículo endoplasmático 1* (*ERO1*), sendo aproximadamente 8 vezes mais expresso no grupo infectado quando comparado ao não infectado ($p = <0,0001$; IC = -3,77 – -2,13).

Considerando os genes antioxidantes, destaca-se o gene *catalase (CAT)*, o qual foi 35 vezes regulado positivamente no grupo infectado em relação ao controle ($p = <0,0001$; IC = -5,58 – -4,42). Em contrapartida o gene *glutathione peroxidase (GPX)* foi aproximadamente 8 vezes regulado negativamente no grupo infectado quando comparado ao controle ($p = <0,0001$; IC = 2,97 – 6,51). Além disso, o gene *glutathione-s-transferase-1 (GST-1)* foi 7 vezes menos expresso no grupo infectado ($p = 0,0019$; IC = 2,31 – 3,13) enquanto o gene *fosfolipídeo hidropéroxido glutathione peroxidase (PHGPX)* foi, semelhantemente, 7 vezes regulado negativamente no grupo infectado em relação ao controle ($p = 0,0003$; IC = 1,25 – 3,34). Os demais genes analisados (*PRX*, *TRX* e *TRXR*) não apresentaram expressão diferencial significativa (Anexo 3).

3.4.2 Glândula salivar

Dentre os genes pró-oxidantes avaliados, apenas os genes *dual oxidase-1* e *dual oxidase-2* foram diferencialmente expressos, sendo 6,5 ($p = <0,0001$; IC = -3,28 – -1,41) e 3,6 ($p = 0,03$; IC = -3,18 – -0,12) vezes mais expressos no grupo infectado em relação ao controle, respectivamente (Figura 2). Os demais genes pró-oxidantes analisados (*CuZnSOD* e *ERO1*) não foram diferencialmente expressos de forma significativa (Anexo 4).

Considerando os genes antioxidantes, o único regulado positivamente de forma significativa foi o gene *CAT*, sendo 5 vezes mais expresso no grupo infectado em relação ao controle ($p = <0,0001$; IC = -2,97 – 1,48). O gene *GST-1*, por sua vez, demonstrou uma regulação negativa, sendo 18 vezes menos expresso no grupo infectado quando comparado ao controle ($p = 0,001$; IC = 1,74 – 5,53). De forma menos intensa, o gene *tiorredoxina redutase (TRXR)* foi 3,5 vezes regulado negativamente no grupo infectado ($p = 0,003$; IC = -2,37 – -0,57) (Figura 3). Os demais genes analisados (*GPX*, *PRX*, *PHGPX* e *TRX*) não demonstraram expressão diferencial estatisticamente significativa (Anexo 4).

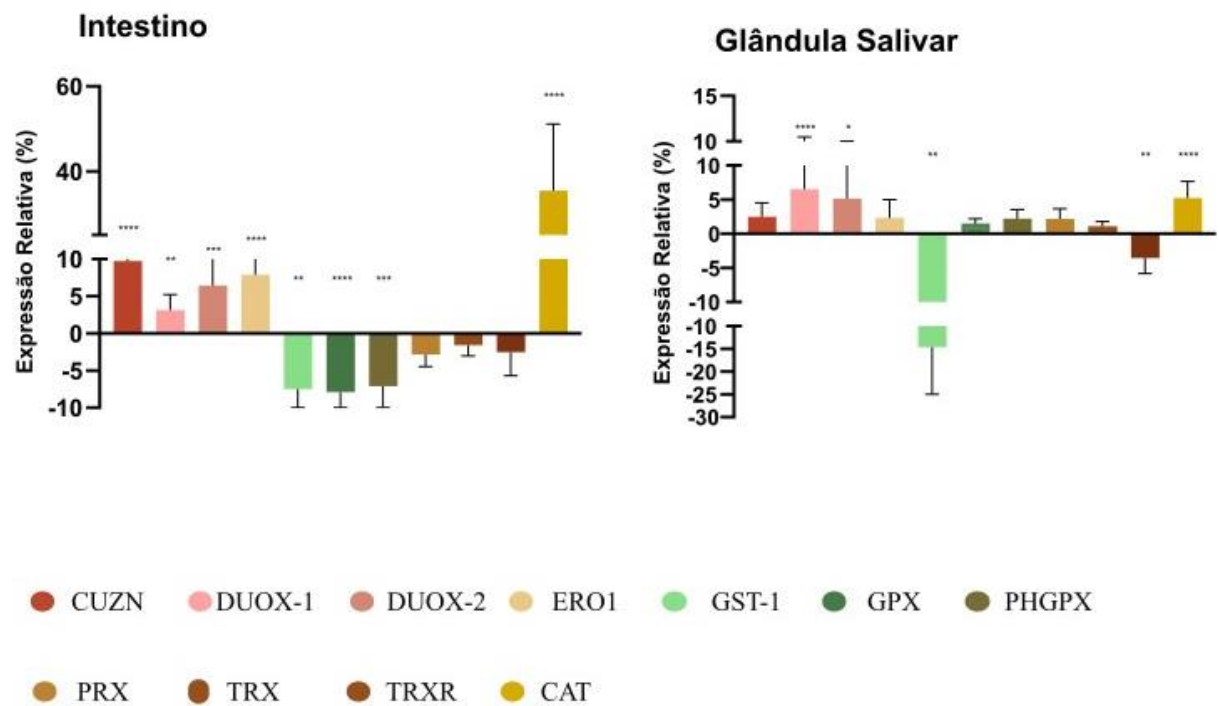


Figura 3. Expressão diferencial dos genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. Genes pró-oxidantes: *CUZN* = cobre-zinco superóxido dismutase; *DUOX-1* = dual oxidase-1; *DUOX-2* = dual oxidase-2; *ERO1* = oxirredutase do retículo endoplasmático. Genes antioxidantes: *GST-1* = glutathione-s-transferase-1; *GPX* = glutathione peroxidase; *PHGPX* = fosfolípido hidropéroxido glutathione peroxidase; *PRX* = peroxirredoxina; *TRX* = tiorredoxina; *TRXR* = tiorredoxina redutase; *CAT* = catalase

4 DISCUSSÃO

4.1 Expressão diferencial de genes pró-oxidantes

O metabolismo redox corresponde a um importante sistema conservado evolutivamente, o qual está envolvido em inúmeras esferas do funcionamento celular (Fang, 2004; Jones, 2006). Com isso, foi demonstrado que enzimas pró-oxidantes desempenham papel crucial na geração das espécies reativas de oxigênio (ERO) em artrópodes, atuando na defesa contra infecção por patógenos (Crispell et al., 2016; Gandara & Oliveira, 2023).

4.1.1 *Dual oxidase-1 (DUOX-1)* e *Dual oxidase-2 (DUOX-2)*

A atuação das enzimas dual-oxidases (DUOX) nas diferentes esferas do metabolismo de artrópodes tem sido cada vez mais reconhecida. Foi demonstrado que tais enzimas são fundamentais para a manutenção da homeostase da microbiota intestinal de *Drosophila* (Ha et al., 2005). Da mesma forma, no intestino de mosquitos das espécies *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensis*, as DUOXs catalisam a síntese de uma matriz extracelular formada por pontes ditirosina, a qual oferece um ambiente favorável para o desenvolvimento de *Plasmodium* (Kumar et al., 2010; Kakani et al., 2019).

Em carrapatos, resultado semelhante foi obtido em estudo com *Ixodes ricinus*, onde uma rede formada por pontes ditirosina, catalisada pelas referidas enzimas, propicia a colonização da bactéria *Borrelia burgdorferi* no intestino do carrapato (Yang et al., 2014). Em *Rhipicephalus microplus*, por sua vez, a infecção por *Anaplasma marginale* em linhagens celulares BME26 resultou em uma diminuição na expressão dos genes *DUOX-1* e *DUOX-2*, enquanto a infecção por *Rickettsia rickettsii*, microrganismo que naturalmente não é transmitido por esta espécie de carrapato, resultou em um aumento na expressão destes genes (Kalil et al., 2017).

Sendo assim, a expressão diferencial dos genes *DUOX-1* e *DUOX-2* obtida neste estudo, tanto no intestino, quanto na glândula salivar (órgãos diretamente envolvidos no ciclo biológico de *T. equi* em *R. microplus*), sugere que as enzimas dual-oxidases desempenham relevante papel nesta interface patógeno-vetor. No intestino, o gene *DUOX-2* foi diferencialmente mais expresso quando comparado ao gene *DUOX-1*. Curiosamente, o oposto foi obtido na glândula salivar. Este resultado sugere que a atuação destas enzimas pode ter relevância diferente em função do tecido em que elas se encontram. Contudo, análises adicionais envolvendo

silenciamento gênico, atividade enzimática e imunofluorescência devem ser realizadas para elucidar o papel destas enzimas nos referidos tecidos, uma vez que elas podem facilitar a colonização microbiana, mas também podem gerar danos celulares aos patógenos pela geração de espécies reativas de oxigênio.

Vale destacar ainda que nos estágios de larva e ninfa, não houve expressão diferencial significativa destes genes. Estes resultados sugerem que a infecção por *T. equi* não foi suficiente para gerar uma resposta pró-oxidante significativa através da atuação destas enzimas nos estágios iniciais do desenvolvimento do carrapato.

4.1.2 Cobre-Zinco Superóxido Dismutase (CuZnSOD)

A cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) é uma enzima responsável por catalisar a dismutação de O_2^- em H_2O_2 (Fridovich, 1995), onde o seu envolvimento na resposta de carrapatos à infecção por agentes patogênicos já foi demonstrado em diferentes trabalhos. À exemplo, um estudo conduzido por Crispell e colaboradores (2016) demonstrou que o silenciamento do gene *CuZnSOD* resultou em um aumento nos níveis de *Rickettsia parkeri* no intestino de *Amblyomma maculatum*; na glândula salivar, contudo, foi observada uma diminuição da carga bacteriana após o silenciamento do gene, sugerindo que a atuação desta enzima em resposta à infecção pode variar a depender do tecido em que ela está inserida (Crispell et al., 2016).

Já em linhagens de células BME26 de *Rhipicephalus microplus*, a infecção por *Anaplasma marginale* resultou em um aumento na expressão do referido gene, sendo obtida uma resposta predominantemente antioxidante (Kalil et al., 2017). Na glândula salivar de *Ixodes scapularis*, por sua vez, a infecção por *Borrelia burgdorferi* resultou em uma diminuição na expressão do gene *CuZnSOD* e um aumento na expressão de genes antioxidantes, sugerindo que a bactéria modula o metabolismo redox do carrapato de forma a reduzir o estresse oxidativo (Kim et al., 2021).

De fato, a enzima CuZnSOD possui uma atuação ambivalente, uma vez que ela pode atuar como antioxidante ao neutralizar o ânion superóxido (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que será convertido em água por enzimas como CAT, GPX e PRX, ou pode atuar como pró-oxidante pelo fato do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido também ser um radical altamente reativo (Singh et al., 2017, Rosa et al., 2021).

No presente estudo, o gene *CuZnSOD* foi regulado positivamente apenas no intestino e na glândula salivar, sendo 9 vezes e 2 vezes mais expresso no grupo infectado. Contudo, apenas no intestino essa expressão diferencial se mostrou significativa estatisticamente. Uma possível justificativa para esta diferença reside no fato da mucosa intestinal ser naturalmente mais responsiva à estímulos microbianos e possuir um metabolismo mais intenso por estar constantemente em contato com o meio externo (Sonenshine & Hynes, 2008). Sendo assim, a infecção por *T. equi* pode intensificar o desafio microbiano no intestino de *R. microplus* e, com isso, induzir um aumento significativo na expressão de diferentes genes envolvidos no balanço oxidativo neste tecido no intuito de controlar a infecção.

Assim como os genes *DUOX-1* e *DUOX-2*, nos estágios de larva e ninfa, a modulação do gene *CuZnSOD* não se mostrou significativa. Tais resultados reforçam a hipótese de que a infecção por *T. equi* parece não estimular uma resposta pró-oxidante nem nos estágios iniciais de desenvolvimento de *R. microplus*.

4.1.3 Oxirredutase do Retículo Endoplasmático 1 (*ERO1*)

Sabe-se que o retículo endoplasmático corresponde ao compartimento celular onde ocorre a dobragem de proteínas para que estas assumam sua forma funcional (Hebert & Molinari, 2007). Tal processo envolve uma série de reações de redução/oxidação catalisadas principalmente pela ação da enzima oxirredutase do retículo endoplasmático (*ERO1*), gerando peróxido de hidrogênio como molécula intermediária (Zito, 2015). Em artrópodes, foi sugerido que processos infecciosos podem levar ao estresse oxidativo neste compartimento pelo acúmulo de proteínas que não foram dobradas ou não foram dobradas corretamente, levando a uma resposta inflamatória mediada pela ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear-kappa B (Rosche et al., 2021).

Em consonância com este fato, foi observado no presente estudo um aumento na expressão do gene *ERO1* na glândula salivar e no intestino de *R. microplus*, sendo este 2 vezes e aproximadamente 8 vezes mais expresso no grupo infectado quando comparado ao controle, respectivamente. Assim como o gene *CuZnSOD*, o gene em questão foi diferencialmente expresso de forma significativa apenas no intestino, sugerindo que a infecção por *T. equi* pode levar ao estresse oxidativo no retículo endoplasmático das células intestinais do carrapato e consequentemente à ativação de respostas pró-inflamatórias. Contudo, investigações mais

específicas sobre o metabolismo oxidativo no retículo endoplasmático e a resposta ao estresse neste compartimento necessitam ser conduzidas para corroborar tal sugestão.

Além disso, no estágio de larva, tal regulação negativa se mostrou significativa estatisticamente, sendo o gene *ERO1* 5 vezes menos expresso no grupo infectado em relação ao controle. Tais resultados corroboram que, nos estágios iniciais de desenvolvimento de *R. microplus* infectado por *T. equi* os genes pró-oxidantes se mantêm não regulados ou regulados negativamente em relação à *R. microplus* não infectado, sugerindo que a resposta oxidativa de *R. microplus* nestes estágios e no referido órgão não é suficientemente ativada através destas enzimas em resposta à infecção por *T. equi*.

4.2 Expressão diferencial de genes antioxidantes

Apesar do importante envolvimento das espécies reativas de oxigênio no combate à infecção por diferentes patógenos, o potencial tóxico dessas moléculas se estende também à célula hospedeira, de modo que diversas enzimas antioxidantes atuam em conjunto a fim de neutralizá-las (Lennicke & Cochemé, 2021).

4.2.1 Catalase (CAT)

Diferentes trabalhos demonstraram o papel de enzimas como a catalase na regulação do estresse oxidativo em artrópodes hematófagos, estando principalmente envolvida na detoxificação de substâncias pró-oxidantes presentes no sangue hospedeiro (Sabadin et al., 2019). Contudo, a atuação de tal enzima também foi implicada na resposta de artrópodes à infecção por diferentes patógenos. À exemplo, a infecção das linhagens de célula BME26 de *R. microplus* por *Anaplasma marginale*, resultou em um aumento na expressão de genes antioxidantes, incluindo o gene *catalase*, indicando que a bactéria modula o metabolismo redox do carrapato a fim de favorecer a sua sobrevivência (Kalil et al., 2017).

De forma semelhante, a infecção de *Ixodes scapularis* por *Borrelia burgdorferi* induziu um aumento na expressão deste gene na glândula salivar do carrapato, sugerindo também uma modulação da resposta oxidativa da bactéria em seu favor (Kim et al., 2021). Além disso, em *Aedes aegypti*, foi demonstrado que a catalase atua não só na proteção do epitélio intestinal contra o estresse oxidativo, mas também favorece a infecção pelo vírus da dengue, uma vez que o silenciamento do gene *CAT* resultou em diminuição da prevalência do vírus no intestino do mosquito (Oliveira et al., 2017).

Semelhante ao que foi descrito na literatura com diferentes modelos de interação patógeno-vetor, os dados obtidos neste estudo indicam que a catalase desempenha um importante papel na resposta de *R. microplus* à infecção por *T. equi*, uma vez que o gene *CAT* foi regulado positivamente de forma significativa tanto no intestino, quanto na glândula salivar do carrapato. Cabe destacar que, no intestino, todos os demais genes antioxidantes foram suprimidos, enquanto o gene *CAT* foi o único antioxidante a ser regulado positivamente, sendo 35 vezes mais expresso no grupo infectado em relação ao controle. Já na glândula salivar, o gene *CAT* foi 5 vezes regulado positivamente, enquanto os demais genes antioxidantes não apresentaram expressão diferencial significativa, com exceção apenas dos genes *GST-1* e *TRXR*. Além disso, nos estágios de larva e ninfa não houve expressão diferencial significativa do gene em questão.

Sendo assim, a superexpressão do gene *CAT* no intestino de *R. microplus* pode ter ocorrido como uma forma compensatória devido à regulação negativa dos demais genes antioxidantes, visando controlar e reduzir o impacto da resposta oxidativa gerada pela expressão dos genes pró-oxidantes (*CuZnSOD*, *DUOX-1*, *DUOX-2* e *ERO1*), também regulados positivamente neste tecido. Uma vez que a competência vetorial de artrópodes está relacionada à capacidade do patógeno em resistir ao estresse oxidativo e aos mecanismos imunológicos do vetor, a regulação positiva do gene *CAT* no intestino e na glândula salivar de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi* sugere que a enzima catalase pode ser fundamental não só para a proteção dos tecidos do carrapato contra o estresse oxidativo, mas também para a colonização e o estabelecimento da infecção pelo protozoário.

4.2.2 Fosfolípido Hidroperóxido Glutathione Peroxidase (PHGPX) e Glutathione peroxidase (GPX)

A fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPX) e a glutathione peroxidase (GPX) são enzimas que contribuem para o balanço redox ao catalisarem a redução de hidroperóxidos utilizando a glutathione como doadora de elétrons (Xie et al., 2023). Contudo, informações a respeito do papel dessas enzimas em resposta a infecções em artrópodes ainda são escassas.

Estudos envolvendo a enzima PHGPX são focados principalmente no seu papel protetor contra acaricidas, uma vez que estes podem levar à lipoperoxidação de membranas em tecidos de carrapato, gerando danos celulares (Cossío-Bayúgar et al., 2005). Todavia, um estudo focado

em demonstrar o papel desta enzima em dípteros aquáticos da espécie *Chironomus riparius* revelou um aumento na expressão do gene *PHGPX* em resposta a poluentes causadores de estresse oxidativo (Nair et al., 2012). Além disso, por executar um papel crucial na manutenção da integridade de biomembranas, foi demonstrado em células de mamíferos que tal enzima possui atividade antiapoptótica, uma vez que os hidroperóxidos de lipídeos, quando associados às membranas celulares, podem desencadear a ativação da transdução do sinal em vias envolvidas no mecanismo de apoptose celular (Imai & Nakagawa, 2003).

Tendo em vista a atuação antioxidante e antiapoptótica desta enzima, a supressão significativa do gene *PHGPX* no intestino de *R. microplus* infectado por *T. equi* (7 vezes menos expresso) sugere uma resposta de *R. microplus* em tentar debelar a infecção através de uma resposta pró-oxidativa e pró-apoptótica. Resultado semelhante foi obtido em *Aedes caspius*, onde foi demonstrado que a infecção pela bactéria *Bacillus thuringiensis* também induz uma supressão do gene *PHGPX*, favorecendo o acúmulo de hidroperóxidos de lipídeos (Ahmed, 2012). Além disso, no estágio de ninfa, a supressão significativa deste gene (5 vezes menos expresso) sugere também um favorecimento do acúmulo de ERO em resposta à infecção por *T. equi*, indicando que tal enzima pode ser relevante na resposta antioxidante deste estágio evolutivo. Contudo, no estágio larval e na glândula salivar de *R. microplus* tal gene não foi modulado de forma significativa, sugerindo uma participação não relevante da enzima *PHGPX* na resposta à *T. equi* nestas categorias analisadas.

Com relação ao gene *GPX*, foi observado neste estudo um padrão de supressão parecido com o gene *PHGPX* no intestino de *R. microplus* (aproximadamente 7 vezes menos expresso no grupo infectado), reforçando o favorecimento de acúmulo das espécies reativas de oxigênio na tentativa de combater a infecção por *T. equi* neste órgão. Na glândula salivar e nos estágios de larva e ninfa, houve uma regulação positiva mínima do gene *GPX*, não sendo esta expressão diferencial significativa estatisticamente, sugerindo que esta enzima não possui um papel relevante nesta interface

4.2.3 Peroxirredoxina (PRX), Tiorredoxina (TRX) e Tiorredoxina redutase (TRXR)

O sistema tiorredoxina (PRX, TRX e TRXR) corresponde a um importante mecanismo antioxidante em artrópodes (Holzerova et al., 2016; Huang et al., 2018). Em *Drosophila*, foi observado que a tiorredoxina redutase (TRXR) está envolvida em processos relacionados à longevidade e à tolerância ao estresse oxidativo (Svensson & Larsson, 2007). Já em

Amblyomma maculatum, o silenciamento do gene *TRXR* resultou em uma diminuição da carga bacteriana nativa existente na glândula salivar do carrapato, indicando que tal enzima desempenha um relevante papel na manutenção da microbiota neste tecido (Budachetri & Karim, 2015).

Além disso, a supressão de *TRXR*, assim como de outros genes antioxidantes, já foi observada na glândula salivar, no intestino e em linhagens celulares de *Ixodes scapularis* infectado por *Anaplasma phagocytophilum*, sugerindo que a bactéria induz uma resposta pró-oxidante no carrapato (Alberdi et al., 2019). Sendo assim, os dados obtidos no presente estudo sugerem que a supressão de *TRXR* corresponde a uma tentativa de favorecer o acúmulo de ERO na glândula salivar de *R. microplus* a fim de combater a infecção por *T. equi*.

Cabe ressaltar ainda que o gene *PRX* não apresentou expressão gênica diferencial em nenhuma das categorias analisadas. Apesar de ser considerado parte do sistema tiorredoxina, sua expressão não significativa sugere que a participação da PRX na regulação da resposta oxidativa de *R. microplus* à infecção por *T. equi* pode não ser relevante nesta interface patógeno-vetor. Contudo, investigações mais aprofundadas sobre o papel dessa enzima no metabolismo redox do carrapato devem ser conduzidas para corroborar tal sugestão.

4.2.4 Glutathione-S-Transferase-1 (*GST-1*)

A glutathione-s-transferase (GST) corresponde a uma enzima responsável pela conjugação da glutathione a compostos eletrofílicos, como o peróxido de hidrogênio, aumentando a solubilidade destes produtos e facilitando sua excreção (Tew et al., 2011; Mazari et al., 2023). Em artrópodes, inclusive carrapatos, estudos envolvendo GST são focados principalmente na resistência destes organismos a inseticidas e acaricidas (Nandi et al., 2015; Sabadin et al., 2017; Hernandez et al., 2018). À exemplo, o silenciamento do gene *GST-1* em *Rhipicephalus sanguineus* diminuiu a resistência e a capacidade de detoxificação do acaricida permetrina pelo carrapato (Duscher et al., 2019).

Contudo, estudos demonstram que a GST atua também na resposta de carrapatos a processos infecciosos. Dessa forma, no intestino do carrapato *Dermacentor variabilis*, foi observada uma supressão na expressão do gene *GST-1* após infecção por *Escherichia coli* (Drheher-Lesnick et al., 2006). Em outro estudo envolvendo a mesma espécie de carrapato, a infecção por diferentes espécies de *Rickettsia* resultou em uma regulação negativa do gene *GST-1* no intestino e na glândula salivar de *D. variabilis* (Sunyakumthorn et al., 2013).

Da mesma forma, foi observado no presente trabalho uma supressão do gene *GST-I* em todos os tecidos de carrapatos adultos analisados. Contudo, apenas no intestino e na glândula salivar tal supressão foi significativa, sendo 7 e 18 vezes menos expresso no grupo infectado, respectivamente. Uma vez que esta enzima atua de forma a neutralizar compostos tóxicos, inclusive espécies reativas de oxigênio, sua regulação negativa nestes tecidos de forma substancial indica um esforço de *R. microplus* em gerar um estresse oxidativo para combater a infecção por *T. equi*.

Cabe destacar ainda que, ao contrário do intestino onde todos os genes antioxidantes analisados foram suprimidos com exceção do gene *catalase*, na glândula salivar, todos foram regulados positivamente, apesar de não estatisticamente significativo, com exceção da *tiorredoxina redutase* que foi suprimida. Esta corresponde a uma possível justificativa para a intensa supressão de *GST-I* observada na glândula salivar, sugerindo que a enzima glutathione-S-transferase-1 pode ter um papel crucial na neutralização de ERO neste tecido que vale a pena ser investigado em análises futuras.

Além disso, vale ressaltar que em contraponto ao que foi obtido na avaliação tecido-específica, o gene *GST-I* foi regulado positivamente tanto nas ninfas, quanto nas larvas. Nesta última, a expressão gênica diferencial se mostrou significativa, onde o gene foi 2 vezes mais expresso no grupo infectado quando comparado ao controle. Um estudo conduzido por Freitas e colaboradores (2007) demonstrou que a atividade da enzima *GST-I* possui um aumento gradual ao longo do desenvolvimento embrionário de *R. microplus* e exerce importante papel no controle do estresse oxidativo durante os estágios embrionário e larval. Dessa forma, a infecção por *T. equi* pode ter conferido um estímulo a mais para a expressão dessa enzima no estágio de larva, constituindo uma ferramenta do carrapato de garantir sua sobrevivência e dar continuidade ao seu desenvolvimento. Contudo, maiores investigações devem ser realizadas para esclarecer o papel desta enzima no referido estágio frente à infecção por *T. equi*.

5 CONCLUSÕES

A resposta pró-oxidativa frente à infecção por *T. equi* através dos genes avaliados ocorre apenas no intestino e na glândula salivar de *R. microplus*, onde as enzimas dual-oxidases parecem desempenhar um papel significativo. As enzimas CuZnSOD e ERO1, cujos genes foram diferencialmente expressos apenas no intestino, podem ter sua relevância restrita a esse tecido.

A infecção por *T. equi* induz, ainda, uma resposta antioxidante nestes tecidos a fim de balancear a resposta oxidativa, onde a catalase parece corresponder à principal enzima envolvida no controle do estresse gerado pelas ERO no intestino e na glândula salivar das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

A enzima GST-1 parece exercer também um papel de destaque na neutralização das ERO na glândula salivar, de forma que a supressão significativa de *GST-1* pode ter sido induzida a fim de favorecer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio neste tecido frente à infecção por *T. equi*.

A infecção por *T. equi* não induz uma resposta oxidativa significativa através das enzimas pró-oxidantes avaliadas nos estágios iniciais de desenvolvimento do carrapato.

O padrão de expressão de genes envolvidos no metabolismo de oxidorredução de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi* é tecido-específico, de modo que as enzimas-chave presentes nesta interface patógeno-vetor podem variar em função do tecido infectado.

CAPÍTULO II

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES ENVOLVIDOS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO IMUNOLÓGICA EM DIFERENTES ESTÁGIO EVOLUTIVOS DE *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDIDAE) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE)

RESUMO

RABELLO, Carla Alves. **Expressão Diferencial de Genes Envolvidos nas Vias de Sinalização Imunológica em Diferentes Estágios Evolutivos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) em Resposta à Infecção por *Theileria equi* (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE).** 2025. 22p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

O protozoário *Theileria equi* é um dos principais agentes causadores da piroplasmose equina, uma doença que acomete equídeos e que causa graves impactos à saúde e à economia equestre mundialmente. A transmissão ocorre principalmente durante o repasto sanguíneo de carrapatos infectados em um hospedeiro suscetível. No Brasil, o único carrapato com capacidade de atuar como vetor de *T. equi* comprovada experimentalmente pertence à espécie *Rhipicephalus microplus*. Todavia, o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nesta interface patógeno-vetor ainda é escasso. Após a exposição ao patógeno pelo carrapato durante o repasto sanguíneo, o parasito necessita evadir a resposta imunológica inata do vetor para sua sobrevivência e posterior transmissão. Dentre os mecanismos inatos de defesa, a resposta humoral compreende diferentes moléculas efetoras que atuam no combate à infecção. A síntese e liberação destas moléculas é regulada através da transdução do sinal de diferentes vias de sinalização, sendo as principais: NF- κ B/Toll, IMD e JAK/STAT. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão diferencial de genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*. Com isso, um equino portador crônico de *T. equi* (controle positivo) e um equino não infectado (controle negativo) foram infestados com larvas de *R. microplus* livres de patógenos. Após o período de fixação e repasto sanguíneo, larvas e ninfas inteiras foram coletadas e armazenadas individualmente, enquanto as fêmeas foram dissecadas e o intestino e a glândula salivar de cada exemplar foi armazenado de forma individual. Em seguida, foi feita a extração do RNA e a síntese do cDNA de cada amostra, os quais foram submetidos ao ensaio de expressão gênica relativa através da qPCR. Considerando a via Toll, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que no intestino e na glândula salivar o *receptor Toll* e o fator de transcrição desta via (*Dorsal*) foram mais expressos no grupo infectado quando comparados ao controle, sugerindo que a infecção por *T. equi* induz a ativação desta via em ambos os tecidos. Em relação à via IMD, o gene que codifica para o receptor desta via (*PGRP*) foi mais expresso no intestino de *R. microplus* infectado, enquanto que o fator de transcrição *Relish* foi mais expresso na glândula salivar de *R. microplus* infectado em relação ao controle, sugerindo que a ativação desta via pode ocorrer de formas alternativas. Em ambos os tecidos, os genes que codificam para os peptídeos antimicrobianos *microplusina* e *defensina* foram mais expressos no grupo infectado em relação ao controle. No intestino, a via JAK/STAT foi regulada negativamente em resposta à *T. equi*, o que pode ter ocasionado a expressão diferencial não significativa do gene *ixodidina* observada neste tecido. Nos estágios de larva e ninfa de *R. microplus* não foi observada uma resposta imunológica diferencial significativa através das vias analisadas. Tais resultados contribuem para ampliar o conhecimento de como *R. microplus* responde à infecção por *T. equi* e auxiliam na identificação de moléculas com potencial de serem utilizadas no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle e prevenção da piroplasmose equina no país.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, interação patógeno-vetor, resposta imunológica de carrapatos

ABSTRACT

RABELLO, Carla Alves. **Differential gene expression of signaling immune pathways at different evolutionary stages of *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE) in response to *Theileria equi* infection (PIROPLASMIDA: THEILERIDAE).** 2025. 22p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The protozoan *Theileria equi* is one of the main causative agents of equine piroplasmosis, a disease that affects equids and causes significant impacts on health and the global equine economy. Transmission occurs mainly during the blood feeding of infected ticks on a susceptible host. In Brazil, the only tick with experimentally proven vector capacity to transmit *T. equi* belongs to the species *Rhipicephalus microplus*. However, knowledge about the mechanisms involved in this pathogen-vector interface is still limited. Once acquired by the tick, the parasite must evade the tick's innate immune response for its survival and subsequent transmission. Among the innate defense mechanisms, the humoral response involves different effector molecules that combat the infection. The synthesis and release of these molecules are regulated through the signal transduction of different signaling pathways, with the main ones being NF- κ B/Toll, IMD, and JAK/STAT. Thus, the objective of this study was to analyze the differential expression of genes involved in the main immune signaling pathways of *R. microplus* in response to *T. equi* infection. For this, a chronically infected equine with *T. equi* (positive control) and a non-infected equine (negative control) were infested with *T. equi*-free *R. microplus* larvae. After the fixation and blood feeding period, whole larvae and nymphs were collected and stored individually, while the females were dissected, and the midgut, ovary, and salivary gland of each specimen were stored separately. RNA was then extracted, and cDNA was synthesized for each sample, which were subjected to relative gene expression assays using qPCR. Considering the Toll pathway, the results obtained in this study showed that in the midgut and salivary gland, the *Toll receptor* and the transcription factor of this pathway (*Dorsal*) were upregulated in the infected group compared to the control, suggesting that *T. equi* infection induces the activation of this pathway in both tissues. Regarding the IMD pathway, the gene encoding the receptor of this pathway (*PGRP*) was upregulated in the midgut of infected *R. microplus*, while the transcription factor *Relish* was upregulated in the salivary gland of infected *R. microplus* compared to the control, suggesting that activation of this pathway may occur in alternative forms. In both tissues, the genes encoding the antimicrobial peptides *microplusin* and *defensin* were upregulated in the infected group compared to the control. In the midgut, the JAK/STAT pathway was suppressed in response to *T. equi*, which may have resulted in the non-significant differential expression of the *ixodidin* gene observed in this tissue. In the larval and nymph stages and in the ovary of *R. microplus*, no significant differential immune response was observed through the analyzed pathways. These results contribute to expanding the knowledge of how *R. microplus* responds to *T. equi* infection and assist in identifying molecules with the potential to be used in the development of biotechnological tools for the control and prevention of equine piroplasmosis in the country.

Keywords: Equine piroplasmosis, pathogen-vector interface, tick immune response.

1 INTRODUÇÃO

A Piroplasmose Equina (PE) corresponde a uma das principais enfermidades que acomete equídeos, gerando grandes perdas econômicas no setor equestre ao redor do mundo (Scoles & Ueti, 2015, Tirosh-Levy et al., 2020). Causada por protozoários intraeritrocíticos pertencentes às espécies *Theileria equi* (Laveran, 1901, Mehlhorn & Schein, 1998), *Theileria haneyi* (Knowles & Kappmeyer, 2018) e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912), os sinais clínicos podem se apresentar de forma inaparente e inespecífica, durante a fase crônica, ou de forma mais grave durante a fase aguda, onde o animal pode apresentar febre alta, anemia hemolítica, anorexia e até mesmo vir a óbito (Tamzali, 2013; Guidi et al., 2015, Dodiya et al., 2022).

Infecções por *T. equi* tendem a ser mais severas quando comparadas às demais espécies, fazendo com que os gastos com tratamento e os prejuízos relacionados à PE sejam particularmente mais agravados (De Wall, 1992; Wise et al, 2013). Além disso, o tratamento farmacológico de eleição contra *T. equi* baseia-se no uso do antiprotozoário dipropionato de imidocarb. Contudo, este fármaco é ineficaz em eliminar o parasito do organismo hospedeiro, fazendo com que uma vez infectado, o animal se torne uma fonte de infecção no rebanho (Sears et al., 2020, Medonza et al. 2024), gerando prejuízos ao desempenho produtivo e ao tráfego internacional destes animais (Friedhoff et al., 1990; Scoles & Ueti, 2015; Coultous et al., 2023).

A transmissão de *T. equi* se dá principalmente através da picada de carrapatos (Rothschild, 2013; Onyiche et al., 2019). Assim, diversas espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Amblyomma* são capazes de atuar como vetores de *T. equi* (De Wall, 1992; Scoles & Ueti, 2015). No Brasil, contudo, a única espécie com capacidade vetorial comprovada experimentalmente é o carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus* (Guimarães et al., 1998; Peckle et al., 2022). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na interface patógeno-vetor que permitem que *R. microplus* seja capaz de transmitir *T. equi* ainda não estão totalmente esclarecidos.

Considerando o ciclo biológico de *T. equi*, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, *R. microplus* ingere as formas evolutivas de macro e microgametócitos do parasito, as quais irão colonizar o intestino do carrapato, se diferenciar e, posteriormente, migrar para a glândula salivar através da hemolinfa para então serem transmitidas a um hospedeiro suscetível (Rothschild, 2013). Para que *T. equi* consiga completar seu ciclo de forma eficiente, é necessário que este parasito seja capaz de evadir as defesas imunológicas do vetor,

garantindo sua sobrevivência e transmissão (Hajdusek et al., 2013; Aguilar-Díaz et al., 2021). Dessa forma, assim como nos demais invertebrados, a resposta imune inata de carrapatos é composta por mecanismos celulares e humorais, os quais desempenham papel fundamental na defesa contra agentes patogênicos (Hoffmann et al., 1999; Sonenshine & Hynes, 2008; Fogaça et al., 2021).

Sabe-se que a resposta humoral de carrapatos envolve a regulação da transdução do sinal de quatro vias principais, sendo elas: fator nuclear-kappa B/Toll (NF- κ B/Toll), c-Jun N-terminal quinase (JNK), via da imunodeficiência (IMD), janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT). A ativação destas vias culmina com a síntese e liberação de peptídeos antimicrobianos que irão atuar no combate ao processo infeccioso, como a microplusina, a ixodidina e a defensina (Smith & Pal, 2014; Rosa et al., 2016; Aguilar-Díaz et al., 2021).

Estudos anteriores demonstraram que o silenciamento do gene que codifica para o fator de transcrição da via IMD (*Relish*) resultou em uma diminuição nos níveis de expressão do peptídeo antimicrobiano microplusina no intestino e na glândula salivar de *R. microplus* durante infecção por *Anaplasma marginale*, enquanto que a deficiência do fator de transcrição *STAT* na glândula salivar deste carrapato resultou em uma redução na expressão peptídeo ixodidina (Capelli-Peixoto, et al., 2017). Além disso, em *Ixodes ricinus*, foi observado que a ativação da via Toll induz a expressão de uma defensina “downstream” intitulada “defIR” (Jalovecka et al., 2024).

Pelo fato da resposta imunológica de carrapatos não ser completamente compreendida e não haver tantas informações acerca deste tema quando comparado aos demais artrópodes, a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na interface patógeno-carrapato se mostra essencial para ampliar o entendimento sobre os componentes imunológicos envolvidos na resposta de carrapatos à infecção por patógenos e, com isso, auxiliar na identificação de possíveis alvos para o desenvolvimento de ferramentas que visam bloquear a transmissão de agentes patogênicos. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão diferencial de genes pertencentes às principais vias de sinalização imunológica e aos peptídeos antimicrobianos em *Rhipicephalus microplus* infectado e não infectado por *Theileria equi*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Comitê de Ética

O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro aprovou esses procedimentos inscritos sob o número 3948221223.

2.2 Local do estudo

O estudo experimental foi realizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ, do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e no Laboratório de Sanidade Avícola, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, pertencente ao mesmo instituto e instituição acima citados.

2.3 Manutenção dos equinos

Os cavalos utilizados no experimento foram mantidos estabulados em baias individuais da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (UFRRJ). Os animais receberam uma dieta à base de feno de Coast Cross, ração comercial fornecida três vezes ao dia e água ad libitum.

O equino utilizado como controle positivo consiste em um animal sem raça definida (SRD), com idade de 2 anos, infectado naturalmente por *T. equi*. Já o equino utilizado como controle negativo consiste em um animal SRD livre de hemoparasitos, apresentando 2 meses de idade à época do experimento, sendo mantido estabulado juntamente da progenitora por apresentar idade inferior ao desmame e alimentado através da amamentação natural.

2.4 Coleta de sangue dos animais

O sangue dos equinos foi coletado semanalmente durante o experimento para análise através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) de acordo com Kim et al. (2008), no intuito de determinar o “status” da infecção e a estabilidade da parasitemia dos animais durante todo o período do experimento.

Dessa forma, os animais foram posicionados em troncos de contenção e o sangue coletado através da punção da veia jugular utilizando seringas estéreis de 5,0 mL, sendo feita a antisepsia prévia da região de coleta utilizando algodão imerso em solução de álcool 70%. Após a coleta, o sangue foi armazenado em tubos de 4mL contendo K3 EDTA, os quais foram

acondicionados a -20°C para posterior extração do DNA e análise por meio da qPCR.

2.5 Criação e manutenção de colônias de carrapatos livres de *T. equi*

A cepa Porto Alegre de *R. microplus* livre de hemoparasitos é mantida no Laboratório de Controle Microbiano da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em bovinos jovens da raça girolanda livre de patógenos. A partir desta colônia, foram selecionadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* provenientes de animais experimentalmente infestados e mantidas em câmara climatizada tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) à temperatura de 27 °C (± 1) e umidade relativa superior a 80% (Bittencourt, 1990).

Amostras de ovos dos três primeiros dias de postura foram separadas e transferidas para seringas descartáveis estéreis adaptadas (Daemon, 1985), as quais foram mantidas em B.O.D., nas mesmas condições descritas anteriormente, para incubação e eclosão das larvas.

2.6 Obtenção de larvas, ninfas e tecidos (glândulas salivares e intestino) de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

2.6.1 Infestação e coleta dos carrapatos

Foram depositados 4g de larvas livremente no dorso dos cavalos através de seringas estéreis descartáveis. No 9º dia as larvas foram recuperadas do corpo dos animais, no 17º dia as ninfas e, no 28º dia pós-infestação, as fêmeas ingurgitadas foram também recuperadas diretamente do corpo dos animais, sendo coletados 15 exemplares de cada equino para cada estágio evolutivo, totalizando 90 amostras.

Os carrapatos da espécie *R. microplus* infectados por *T. equi* foram obtidos a partir da infestação no cavalo portador crônico do parasito, formando o grupo *T. equi*-infectado. Os carrapatos não infectados foram obtidos a partir da infestação no equino livre de hemoparasitos, o qual formou o grupo controle.

2.6.2 Higienização, acondicionamento e dissecação dos carrapatos

Após coletados, os carrapatos foram imediatamente imersos em água corrente e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% por 3 min e em álcool 70% por 2 min (Antunes et al., 2012).

Após a identificação, os exemplares de larvas e ninfas, em seus respectivos dias de

coleta pós-infestação, foram armazenados inteiros de forma individual em tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 30 uL de “RNAlater” (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia), sendo mantidos acondicionados a -80 °C para posterior análise. As fêmeas ingurgitadas, por sua vez, foram dissecadas após a higienização e identificação. Dessa forma, os espécimes foram fixados individualmente em placas de Petri contendo parafina preta para aumentar o contraste. Em seguida, foi feita a incisão no sulco marginal, passando-se o idiossoma, com auxílio de tesoura oftálmica de ponta fina e pinça entomológica, também sob microscópio estereoscópico (LED SMZ 445, Nikon, Tóquio, Japão). Após a incisão completa, o tegumento foi dobrado para melhor visualização das estruturas internas e a cavidade exposta foi banhada em solução fisiológica estéril a 0,9% solução salina a 4 °C. Em seguida, o intestino e as glândulas salivares foram coletados e lavados em solução fisiológica estéril a 0,9% gelada três vezes antes do armazenamento de forma individual nas mesmas condições descritas para larvas e ninfas.

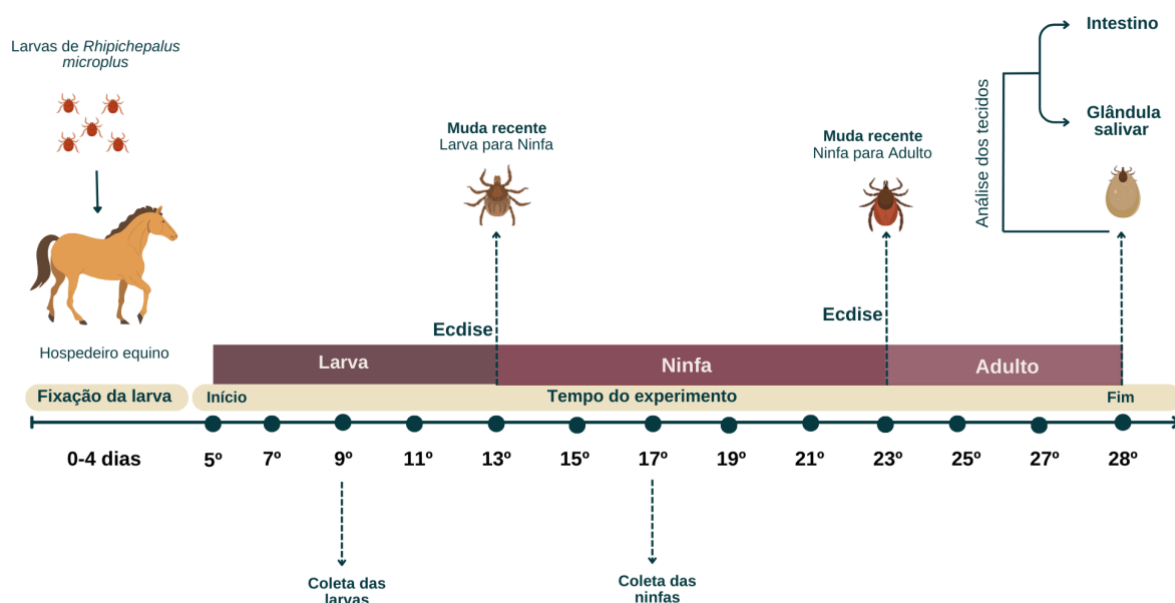


Figura 1. Linha temporal evidenciando as fases do período de infestação onde foram coletadas as larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em equinos cronicamente infectados por *Theileria equi*. O esquema foi criado através da ferramenta BioRender.com.

2.7 Extração do DNA total de sangue equino

Amostras de sangue total dos animais utilizados no experimento foram extraídas através do método fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Assim, foi adicionado 350 uL de sangue total em tubos de polipropileno de 2,0 mL contendo 500 uL de solução de lise (Tris-

HCL 10 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; cloreto de sódio 100 mM e SDS 2%) e 20 uL de proteinase K (20 mg/mL). Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado em vórtex “Classic Vortex Mixer” (VELP Scientifica, MB, Itália) e incubado a 56°C durante 1 h com agitação a 650 rpm em um “Thermomixer” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Após esse processo, as amostras foram retiradas do “Thermomixer” e em seguida foi adicionado 870 uL de solução de fenol tamponado pH 8,0 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 15000 x rpm por 10min em uma centrífuga refrigerada Rotina 380R (Hettich Lab, BW, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado a novos tubos de 2,0 mL contendo 500 uL de clorofórmio (pegar o nome), sendo agitado em vórtex e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. Após esse processo, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL contendo 50 uL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 500 uL de etanol 100%. As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas a -20°C durante 1,5 h. Posteriormente, o DNA foi recuperado por centrifugação a 15000 x rpm durante 10 min e o sobrenadante descartado. Foi adicionado, em seguida, 500 uL de álcool 70% seguido de centrifugação nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 40 min para secagem e, em seguida, eluídas em 30 uL de água livre de nucleases (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia).

2.8 Extração de RNA total das amostras de carrapato

Primeiramente, as amostras foram lavadas três vezes utilizando 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min para remoção do “RNAlater” (Invitrogen™, Vilnius, Lituânia). O RNA das amostras de carrapatos foi extraído utilizando um kit de purificação de RNA Invitrogen™ TRIzol™ Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo todo o processo realizado com as amostras acondicionadas no gelo.

Assim, após a lavagem com PBS, foi adicionado 1 mL de TRIzol nos tubos contendo as amostras, sendo eles agitados manualmente até a dissolução completa do tecido. As amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado 200 uL de clorofórmio. Após agitar vigorosamente por 15 seg, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 3 min e, em seguida, centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno de 2,0 mL contendo o mesmo volume

de álcool 70%. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 seg e o conteúdo transferido para colunas de sílica dispostas em tubos coletores. As colunas foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 seg, o tubo coletor foi descartado e a sílica inserida em novo tubo coletor. Foi adicionado 350 uL de Wash Buffer I em cada amostra, seguida de centrifugação nas condições descritas acima. Após esse processo, adicionou-se 40 uL de solução de DNase I (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) no centro da coluna de sílica a fim de eliminar o DNA genômico contaminante. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado novamente 350 uL de “Wash Buffer I”. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 seg, as colunas foram inseridas em novos tubos coletores, sendo adicionado 700 uL de “Wash Buffer II”. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas acima e o processo repetido duas vezes. Por fim, as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, onde foi adicionado 30 uL de “RNase Free Water” no centro de cada coluna para eluição do RNA extraído.

Após a extração, a quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

2.9 Síntese de cDNA a partir do RNA das amostras de carrapato

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando um kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Vilnius, Lituânia) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as reações foram feitas em triplicata, com um volume final de reação de 15 µL contendo: 1X “RT Buffer”, 1X “dNTP Mix”, 1X “RT Random Primer”, 1uL de “Multi Scribed Reverse Transcriptase”, 4,2 uL de “Nuclease Free Water” e 5 uL de amostra. Posteriormente, o cDNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

2.10 Detecção e quantificação de *Theileria equi* a partir das amostras de DNA total de sangue equino e do cDNA das amostras de carrapato

O DNA do sangue total dos cavalos e o cDNA das amostras de carrapatos dos grupos experimentais foram submetidos à reação de qPCR baseados na sequência *18S rRNA* de *T. equi* conforme descrito por Kim e colaboradores (2008). Sendo assim, foi empregado o par de primers Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3'), além de uma sonda fluorescente Be18SP

(5'FAM-AATTAGCGAATCGCATGGCTT-TAMRA3'), marcada na extremidade 5' com o reporter 6-carboxifluoresceína (FAM) e com o quencher 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) na extremidade 3'. As reações foram realizadas com um volume final de reação de 12 µL contendo: 1X "TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA)", 450 nM de cada primer, 250 nM de sonda e 90 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 45 ciclos a 95 °C por 20 seg, seguidos de 55 °C por 1 min. Como controle positivo, foi utilizado 90 ng de DNA total extraído do sangue de equino cronicamente infectado com *T. equi*. Como controle negativo, foi utilizado 3 µL de água livre de nuclease. Todas as reações foram realizadas em triplicata. As amostras foram consideradas positivas se o valor de Cq for menor ou igual a 40 ciclos. Os valores médios de Cq obtidos a partir das três repetições do grupo infectado foram plotadas em uma curva padrão produzida por Peckle et al. (2022) para fins de quantificação da carga parasitária das amostras.

2.11 Ensaios de expressão gênica

Para os ensaios de expressão gênica, foram selecionadas 8 amostras pertencentes a cada grupo (infectado e controle), para cada estágio evolutivo (larva, ninfa e tecidos de fêmeas ingurgitadas). Foram selecionados 6 genes relacionados às principais vias de sinalização imunológica e 3 genes codificantes para peptídeos antimicrobianos, conforme descrito na Tabela 1. Além destes, foram utilizados quatro genes de referência para posterior normalização dos níveis relativos de expressão gênica obtidos, sendo eles: *RmRIBS3A* [CV443892], *RmBactin* [AY255624], *RmGAPDH* [CK180824] e *RmMALATE* [CV455409].

Quadro 1. Genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológicas do carrapato *Rhipicephalus microplus* selecionados para análise de expressão gênica diferencial.

Abreviação do gene	Nome do gene	GenBank [número]	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Referência
<i>RmRIBS3A</i>	<i>40S ribosomal protein S3A</i>	[CV443892]	GGACGACCG ATGGCTACCT	TGAGTTGATTG GCGCACTTCT	Rosa et al. (2016)
<i>RmBactina</i>	<i>B-actina</i>	[AY255624]	CCCATCTACG AAGGTTACGC C	CGCACGATTTC ACGCTCAG	Nijhof et al. (2009)
<i>RmGAPDH</i>	<i>Gliceraldeído 3-Fosfato Dehidrogenase</i>	[CK180824]	AGTCCACCGG CGTCTTCCTCA	GTGTGGTTCAC ACCCATCACA A	Nijhof et al. (2009)

Quadro 1. Continuação.

Abreviação do gene	Nome do gene	GenBank [número]	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Referência
<i>RmMALATE</i>	<i>Malate dehydrogenase</i>	[CV455409]	AAACTGTCCC AGTACGAGTC	TTCTTGACGAA GTCCTCTCC	Kalil et al. (2017)
<i>RmTollreceptor</i>	<i>Receptor Toll</i>	[KF828744]	CATCATTCGTG TGCAGTGTG	ACCAGTTGCA ATGACGTCAC	Rosa et al. (2016)
<i>RmDorsal</i>	<i>Dorsal</i>	[KF828755]	CATATCGGGT ACATCCACAC	GGCTTGTAAG GGTGCATGTC	Capelli Peixoto et al., (2017)
<i>PGRP</i>	<i>Proteína de reconhecimento de peptideoglicano</i>	[KF828741]	TCGCAGAGAA TGCCTACTG	TTCGTGTGAG CGCCTTCTGC	Rosa et al. (2016)
<i>Relish</i>	<i>Relish</i>	[KF828760]	GCACGACAGC CAATTATTCG	TCTTGCTCAG CAGAAGAAG	Rosa et al. (2016)
<i>JAK</i>	<i>Janus Kinase</i>	[KF828771]	CAGAGGTGAT GCTAGTCATG	ATGAGCTGTG GATGAGTGAC	Rosa et al. (2016)
<i>STAT</i>	<i>Transdutor de sinal e ativador de transcrição</i>	[KF828772]	TAGTGTTCCT GGTTTGGACG	CCGTCGCAGA CTTAAACTTC	Rosa et al. (2016)
<i>Microplusina</i>	<i>Microplusina</i>	[AY233212]	CAGTGAAGCC TTCGCATCAG	CCGAAGTCGA AGCCACAAG	Capelli Peixoto et al., (2017)
<i>Ixodidina</i>	<i>Ixodidina</i>	[P83516]	CAAAATGCAG TCCCGTTACGT	CCACGACGGC AGAAGCATCC	Capelli Peixoto et al., (2017)
<i>Defensina</i>	<i>Defensina</i>	[AY233213]	GATGCCCCGTTT AACCAAGGA	TTGATTAGGC CAGCGCAGTA	Capelli-Peixoto et al., (2017)

Antes de serem empregados, cada par de primer foi submetido a uma curva de eficiência de seis pontos a fim de garantir a eficiência das reações analisadas. O ensaio de expressão gênica foi realizado em triplicata utilizando uma placa de reação de 96 poços MicroAmp® Fast em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, Singapore, Singapore). Cada reação de qPCR continha 1X “Power SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,4 µM de cada primer e 45 ng/µL de cDNA em um volume final de 12 µL. Os níveis relativos de expressão gênica no grupo controle em comparação ao grupo infectado por *T. equi*

foram normalizados com a média geométrica dos valores de Cq dos genes de referência, sendo calculados segundo o método $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.12 Análise Estatística

A análise estatística das diferenças observadas no grupo infectado e no grupo controle foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, CA, EUA). Os valores de ΔCq foram submetidos à análise estatística para investigar a expressão gênica diferencial significativa nos grupos infectados e não infectados por *T. equi*. Inicialmente, os valores de ΔCq foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Com isso, de acordo com os resultados obtidos, o grupo controle e infectado por *T. equi* foram comparados pelo teste paramétrico t de Student ou pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de $p < 0,05$ com intervalo de confiança (IC) de 95% foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Carga parasitária de *T. equi* em larvas, ninfas e tecidos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

A carga parasitária resultante da infecção por *T. equi* nas amostras de larvas foi de 198116 ± 853377 parasitos/ μ L de amostra analisada, enquanto no estágio de ninfa foi observada uma carga parasitária de 7680832 ± 75484787 parasitos/ μ L. Já em amostras de intestino das fêmeas ingurgitadas coletadas, a carga parasitária resultante foi de 5064 ± 62081 parasitos/ μ L, enquanto na glândula salivar o valor obtido foi de 5696727 ± 14700221 parasitos/ μ L.

3.2 Expressão gênica diferencial em larvas inteiras de *R. microplus*

Considerando os genes analisados em larvas inteiras, apenas o gene *proteína de reconhecimento de peptideoglicano (PGRP)* apresentou expressão diferencial significativa, sendo 4 vezes regulado negativamente no grupo infectado em relação ao controle ($p = 0,0004$; IC = 1,25 – 3,37) (Figuras 2 e 3). Os demais genes não apresentaram diferença significativa (Anexo 5).

3.3 Expressão gênica diferencial em ninfas inteiras de *R. microplus*

Dentre os genes avaliados, apenas o *janus kinase (JAK)* foi diferencialmente expresso de forma significativa, sendo 4,5 vezes menos expresso no grupo infectado em relação ao controle ($p = 0,0004$; IC = 1,11 – 3,023) (Figuras 2 e 3). Os demais não apresentaram expressão diferencial significativa (Anexo 7).

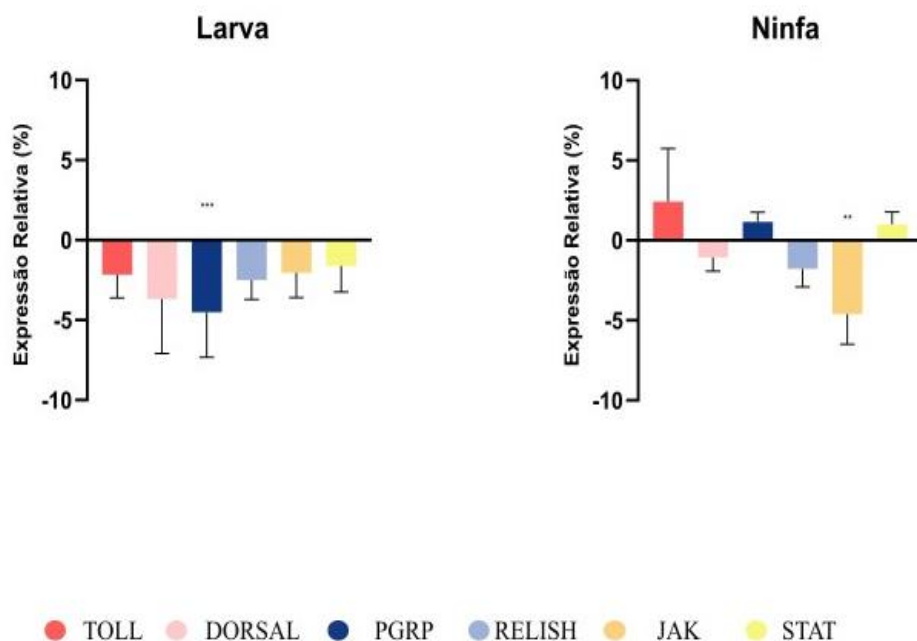


Figura 2. Expressão gênica diferencial dos genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica nos estágios de larva e ninfa de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *TOLL* = receptor Toll; *DORSAL* = fator de transcrição Dorsal; *PGRP* = proteína de reconhecimento de peptidoglicano; *RELISH* = fator de transcrição Relish; *JAK* = janus kinase; *STAT* = transdutor de sinal e ativador de transcrição.

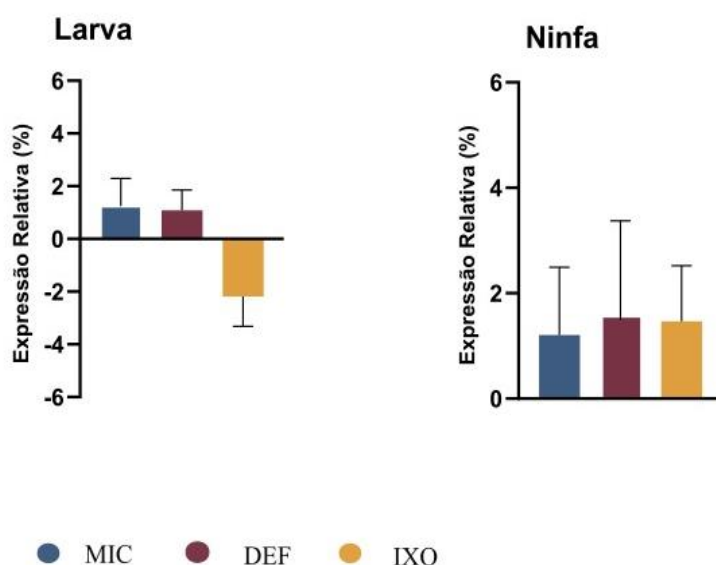


Figura 3. Expressão gênica diferencial dos genes que codificam para peptídeos antimicrobianos nos estágios de larva e ninfa de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *MIC* = microplusina; *DEF* = defensina; *IXO* = ixodidina

3.4 Expressão gênica diferencial tecido-específica em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

3.4.1 Intestino

Considerando a via de sinalização NF- κ B/Toll, o *receptor Toll* foi 9,7 vezes mais expresso no grupo infectado em relação ao controle ($p = <0,0001$; IC = -3,82 – -1,93). Da mesma forma, o gene *Dorsal*, que codifica para o fator de transcrição desta via, foi 3,6 vezes regulado positivamente no grupo infectado quando comparado ao controle ($p = 0,04$; IC = -2,50 – -0,01). Já em relação à via IMD, o gene *proteína de reconhecimento de peptídeoglicano (PGRP)*, o qual codifica para o receptor da referida via, foi 3,24 vezes mais expresso no grupo infectado ($p = <0,0001$; IC = -2,147 – -1,03), enquanto o fator de transcrição *Relish* não demonstrou expressão diferencial significativa estatisticamente. Considerando a via JAK/STAT, foi observada uma supressão do gene *transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)*, uma vez que este foi 12,5 vezes menos expresso no grupo infectado ($p = 0,0006$; IC = 2,33 – 5,59), enquanto o gene *janus kinase (JAK)* não apresentou uma expressão diferencial significativa estatisticamente (Figura 4).

Em relação aos peptídeos antimicrobianos analisados, o gene que codifica para o AMP microplusina foi intensamente expresso de forma diferencial, sendo regulado positivamente 79 vezes no grupo infectado ($p = <0,0001$; IC = -7,68 – -4,95). O gene *defensina* também se mostrou regulado positivamente no grupo infectado, porém em menor intensidade, sendo 4 vezes mais expresso neste grupo quando comparado ao controle ($p = 0,0002$; IC = -2,76 – -1,13) (Figura 5). Em contrapartida, o gene que codifica para o AMP ixodidina não apresentou expressão diferencial estatisticamente significativa (Anexo 7).

3.4.2 Glândula salivar

Levando em consideração a via NF- κ B/Toll, o gene *receptor Toll* foi 4 vezes mais expresso no grupo infectado quando comparado ao controle ($p = 0,0002$; IC = -2,46 – -1,0). De forma semelhante, o fator de transcrição *Dorsal* foi 3 vezes mais expresso no grupo infectado ($p = 0,03$; IC = -2,34 – -0,06). Já em relação à via IMD, o fator de transcrição *Relish* foi 3 vezes regulado positivamente no grupo infectado em relação ao controle ($p = 0,003$; IC = -2,26 – -0,54), enquanto o gene *proteína de reconhecimento de peptidoglicano (PGRP)* não demonstrou diferença de expressão significativa estatisticamente (Figura 4). Considerando a

via JAK/STAT, ambos os genes analisados (*JAK* e *STAT*) não demonstraram expressão diferencial significativa estatisticamente (Anexo 8).

Em relação aos AMPs, ambos os três genes analisados foram regulados positivamente (Figura 5). O gene *microplusina* foi 17 vezes regulado positivamente no grupo infectado ($p = 0,0002$; IC = -5,02 – -3,24), enquanto os genes *defensina* e *ixodidina* foram 4 ($p = 0,009$; IC = -2,69 – -0,45) e 5 ($p = 0,0002$; IC = -2,92 – - 1,14) vezes mais expressos no grupo infectado comparado ao controle, respectivamente.

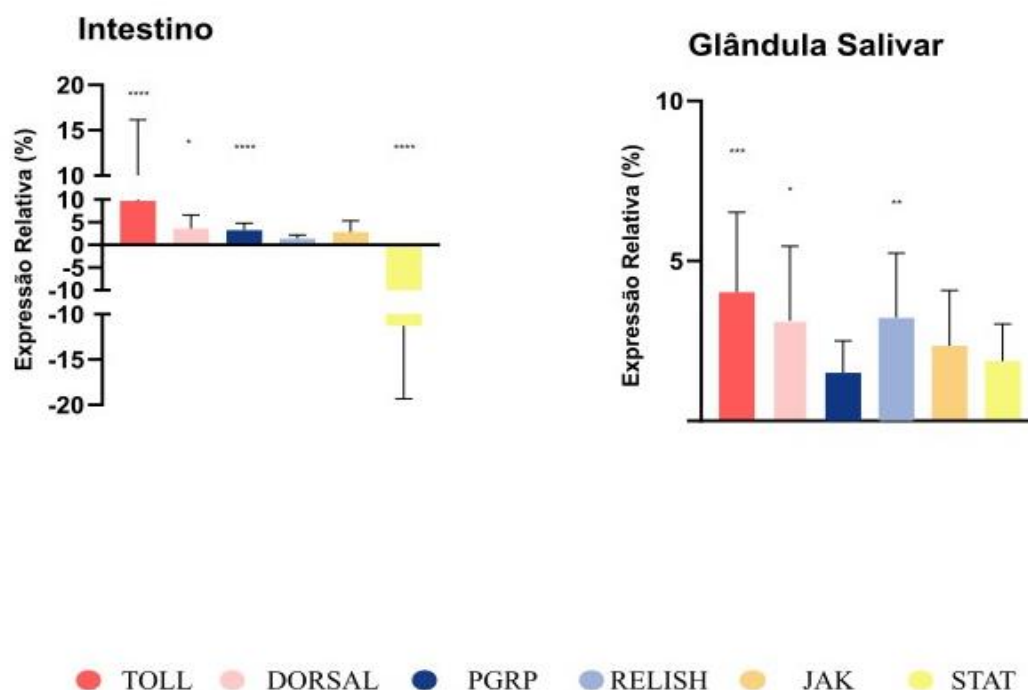


Figura 4. Expressão gênica diferencial dos genes envolvidos nas principais vias de sinalização imunológica no intestino e na glândula salivar de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. *TOLL* = receptor Toll; *DORSAL* = fator de transcrição Dorsal; *PGRP* = proteína de reconhecimento de peptidoglicano; *RELISH* = fator de transcrição Relish; *JAK* = janus kinase; *STAT* = transdutor de sinal e ativador de transcrição.

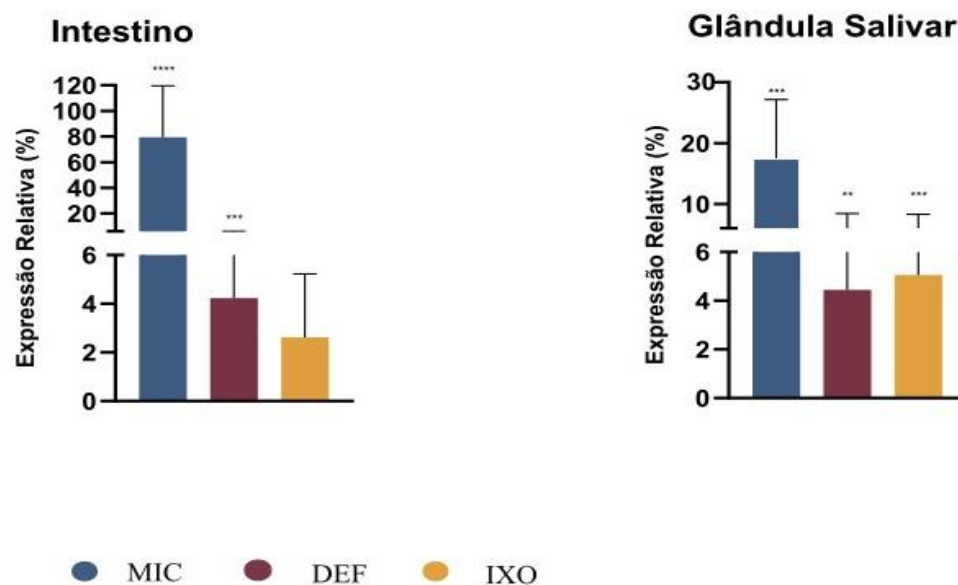


Figura 5. Expressão gênica diferencial dos genes que codificam para peptídeos antimicrobianos no intestino e na glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta à infecção por *Theileria equi*. MIC = microplusina; DEF = defensina; IXO = ixodidina

4 DISCUSSÃO

4.1 Via NF- κ B/Toll

No decorrer das décadas de estudos envolvendo a resposta imunológica de artrópodes, foi demonstrado que as vias de sinalização imunológica desempenham um papel crucial na regulação da resposta humoral destes organismos frente à infecção por diferentes patógenos (Hajduseket al., 2013; Fogaça et al., 2021). Sendo assim, foi observado que diversos componentes pertencentes à via NF- κ B/Toll são conservados entre artrópodes, incluindo carrapatos (Rosa et al., 2016).

Estudos anteriores demonstraram que a via Toll é ativada em carrapatos como resposta à infecção por diferentes microrganismos, incluindo parasitos apicomplexos. Em *Ixodes ricinus*, foi observado que tal via está envolvida no controle dos níveis de infecção do carrapato pelo parasito apicomplexo *Babesia microti*, uma vez que o silenciamento de *Cactus* (inibidor da via Toll) resultou em uma diminuição na carga parasitária presente na glândula salivar do carrapato (Jalovecka et al., 2024). Contudo, neste mesmo estudo, o silenciamento de *Cactus* concomitante ao silenciamento do fator de transcrição da via Toll (*Dorsal*), resultou em um aumento nos níveis de infecção da glândula salivar do carrapato por *B. microti*, sugerindo que a ativação da via Toll e do fator de transcrição correspondente são essenciais para controlar a infecção pelo parasito (Jalovecka et al., 2024).

Vale destacar que a síntese da molécula efetora defensina, um peptídeo antimicrobiano, foi diretamente relacionada à ativação da via Toll em diferentes artrópodes. À exemplo, em *Drosophila*, foi demonstrado que a translocação do fator de transcrição *Dorsal* para o núcleo induz a produção de defensinas (Imler & Hoffmann, 2000). O mesmo resultado foi obtido em *Aedes aegypti*, onde a ativação da via Toll resultou em um aumento na expressão do gene *Defensina* (Xi et al., 2008). Em *Ixodes ricinus*, da mesma forma, foi observado que a ativação desta via induz a expressão de uma defensina “downstream” intitulada “defIR” (Jalovecka et al., 2024).

Neste sentido, Paulino et al. (2022) descreveram um aumento na expressão do *receptor Toll* no intestino de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*; todavia, o gene *dorsal* e o gene *defensina* apesar de regulados positivamente, não apresentaram diferença significativa. No presente estudo, porém, ambos os genes foram regulados positivamente de forma significativa, sendo o *receptor Toll* 9 vezes, o gene *Dorsal* 3 vezes, e o gene *Defensina* 4 vezes

mais expresso no grupo infectado, indicando que esta via é ativada e responde à infecção por *T. equi* no intestino de *R. microplus*.

Cabe destacar que a diferença de significância estatística observada entre estes estudos pode ser justificada devido à diferença metodológica, uma vez que o trabalho de Paulino et al., (2022) foi conduzido com intestinos de fêmeas de *R. microplus* em pools, enquanto o presente trabalho foi realizado analisando órgãos de forma individual, o que pode ter influenciado nos valores de expressão relativa de genes específicos e na significância estatística da diferença obtida entre os grupos.

Além disso, no presente estudo, tanto o *receptor Toll* quanto o fator de transcrição *Dorsal* e o *AMP Defensina* foram também regulados positivamente de forma significativa na glândula salivar de *R. microplus* em resposta à *T. equi*, indicando que a via Toll é estimulada e pode exercer um papel crucial na resposta à infecção tanto no intestino quanto na glândula salivar do carrapato. Nos estágios de larva e ninfa, por sua vez, não houve expressão diferencial significativa dos componentes desta via, sugerindo que a carga de infecção por *T. equi* nos estágios iniciais de desenvolvimento do carrapato não é suficiente para ativar a via ou, ainda, que estes estágios imaturos podem não possuir competência imunológica para responder à infecção.

4.2 Via IMD

Apesar de ter sido demonstrado que diversos componentes desta via inicialmente descrita em *Drosophila* não foram observados em carrapatos (Giulia-Nuss et al., 2016; Rosa et al., 2016), diferentes estudos demonstraram que a via IMD é funcional e responde a processos infecciosos em carrapatos (Fogaça et al., 2021; O'neal et al., 2023).

A ativação da via IMD em *Drosophila*, e outras espécies de artrópodes, em resposta à infecção principalmente por bactérias gram-negativas, se dá através do reconhecimento de peptídeos glicanos (PGN) presentes na parede celular das bactérias por proteínas transmembranas de reconhecimento de PGN (PGRP-L) (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Kleino & Silverman, 2014). Contudo, as PGRPs existem em múltiplas isoformas as quais estão envolvidas não só no reconhecimento de bactérias, mas também de vírus e fungos (Ramirez et al. 2020; Li et al., 2022). Dessa forma, em diferentes espécies de carrapato, incluindo *Rhipicephalus microplus*, foram descritas variadas isoformas de PGRPs (Rosa et al., 2016).

Contudo, até onde sabemos, o papel dessas proteínas na resposta destes ectoparasitos à infecção por protozoários ainda não foi esclarecido.

No presente estudo, o gene *PGRP* foi 3 vezes regulado positivamente no intestino de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*, sugerindo que estas proteínas podem estar envolvidas também no reconhecimento do protozoário. Contudo, neste mesmo tecido, o fator de transcrição da via IMD, *Relish*, foi diferencialmente expresso apenas 1 vez, não havendo significância estatística ($p = 0,7887$), indicando um possível silenciamento da transdução do sinal pela indução na expressão de genes inibitórios da referida via, uma vez que resultado semelhante foi observado em estudos anteriores (Paulino et al., 2022).

Contudo, foi demonstrado anteriormente que o fator de transcrição *Relish* controla a infecção por *Anaplasma marginale* no intestino de machos não alimentados de *Rhipicephalus microplus* (Capelli-Peixoto et al., 2017). Neste mesmo trabalho, o silenciamento do fator *Dorsal* não impactou a expressão de *microplusina*, enquanto o silenciamento do fator *Relish* levou a uma regulação negativa do referido gene, sugerindo que tal fator de transcrição está diretamente relacionado à expressão do gene *microplusina*.

Curiosamente, no presente trabalho, o peptídeo antimicrobiano *microplusina* demonstrou uma intensa expressão diferencial, sendo 79 vezes mais expresso no intestino de *R. microplus* infectado por *T. equi* em relação ao não infectado, apesar da expressão diferencial não significativa de *Relish*. No entanto, diferentes trabalhos com artrópodes demonstraram que as vias Toll e IMD estão interligadas e atuam de forma sinérgica no estímulo à síntese e liberação de moléculas efetoras (Alavarado-Delgado et al., 2022). À exemplo, as PGRPs podem ser secretadas extracelularmente e atuar como moléculas ativadoras tanto da via IMD quanto da via Toll em *Drosophila*, onde os genes que codificam para essas proteínas foram diferencialmente expressos em infecções virais (Tsai et al., 2008; Li et al., 2022). Nesta mesma espécie de artrópode, foi demonstrado um aumento na expressão de peptídeos antimicrobianos quando a expressão de ambos os receptores foi estimulada em níveis controlados (Tanji et al., 2007).

No presente estudo, o receptor Toll, o PGRP e o fator *Dorsal* foram regulados positivamente de forma significativa no intestino de *R. microplus* infectado por *T. equi*. Com isso, o sinergismo entre as vias Toll e IMD pode ter ocasionado o aumento na expressão de *microplusina* neste tecido, corroborando estudos anteriores que sugerem o envolvimento de

diferentes vias na regulação da expressão destes peptídeos antimicrobianos (Capelli-Peixoto et al., 2017).

Contudo, em contraposição ao que foi observado no intestino, o gene *PGRP* não foi diferencialmente expresso de forma significativa na glândula salivar de *R. microplus* infectado por *T. equi*, enquanto o fator *Relish* foi 3 vezes mais expresso no grupo infectado ($p = 0,003$). Uma vez que diferentes moléculas podem desencadear a transdução do sinal na via IMD (McClure et al., 2018; O'neal et al., 2023), os resultados obtidos neste estudo indicam que esta via pode ser ativada em resposta à infecção por *T. equi* de formas distintas a depender do tecido analisado. Contudo, semelhante ao que foi observado no intestino, o gene *microplusina* foi 22 vezes regulado positivamente no grupo infectado quando comparado ao controle. Em *Amblyomma aureolatum*, a *microplusina* foi descrita como um importante elemento protetor contra a infecção por *R. rickettsii* na glândula salivar do carrapato (Martins et al., 2019).

Dessa forma, considerando que o gene *microplusina* foi intensamente expresso de forma diferencial tanto no intestino quanto na glândula salivar de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*, este resultado sugere que a *microplusina* também constitui uma molécula efetora relevante na proteção do carrapato nesta interface patógeno-vetor. Contudo, investigações futuras relacionando o silenciamento deste gene com os níveis de infecção pelo protozoário devem ser realizadas para corroborar esta hipótese.

No estágio de larva, o gene *PGRP* foi 4 vezes regulado negativamente no grupo infectado, enquanto o fator *Relish* e o AMP *microplusina* não foram diferencialmente expressos de forma significativa. O fato da regulação negativa do *PGRP* neste caso ter sido significativa sugere que esta molécula pode ter um papel relevante na persistência da infecção de *R. microplus* por *T. equi* neste estágio evolutivo ou, ainda, que este estágio não possui competência imunológica para responder à infecção; todavia, estudos adicionais necessitam ser conduzidos para melhor investigação do papel das PGRPs em larvas de *R. microplus*.

4.3 Via JAK/STAT

A via JAK/STAT, assim como a via Toll, possui a grande maioria dos seus componentes centrais conservados entre os artrópodes, inclusive carrapatos, sendo ativada e responsiva a infecções por diferentes patógenos (Giulia-Nuss et al., 2016; Rosa et al., 2016; Fogaça et al., 2021). Em ninfas de *Ixodes scapularis*, foi observado que o silenciamento do transdutor de sinal e ativador de transcrição *STAT* resultou em um aumento na carga bacteriana de *Anaplasma*

phagocytophilum no intestino e na glândula salivar deste carrapato, sugerindo que tal via está envolvida no controle da infecção pela bactéria (Liu et al., 2012). Um outro estudo envolvendo *Ixodes scapularis* demonstrou que a ativação da via JAK/STAT culmina com a produção da glicoproteína peritrofina-1, a qual faz parte da composição da matriz peritrófica no intestino do carrapato e facilita a colonização da mucosa intestinal pela bactéria *Borrelia burgdorferi* (Narasimhan et al., 2014).

Já em *Rhipicephalus microplus* infectado por *Anaplasma marginale*, a deficiência do fator *STAT* resultou em uma diminuição na expressão do AMP *ixodidina* na glândula salivar do carrapato, sugerindo que a via JAK/STAT está envolvida na regulação da síntese deste peptídeo (Capelli-Peixoto et al., 2017). De forma semelhante, foi observado no presente estudo uma supressão significativa do gene *STAT* no intestino de *R. microplus*, sendo 15 vezes menos expresso no grupo infectado. Além disso, o gene *JAK* e o gene *ixodidina* não foram expressos diferencialmente de forma significativa. Este resultado sugere que *T. equi* modula negativamente a via JAK/STAT no intestino de *R. microplus* a fim de resistir à resposta imunológica e favorecer a colonização do epitélio intestinal.

Na glândula salivar de *R. microplus*, por sua vez, a expressão diferencial de *JAK* e *STAT* obtida neste estudo não se mostrou significativa estatisticamente. Porém, o gene *ixodidina* foi 5 vezes mais expresso no grupo infectado por *T. equi* quando comparado ao grupo não infectado ($p = 0,0002$). Este resultado reforça a hipótese de Capelli-Peixoto et al. (2017), onde a expressão deste peptídeo antimicrobiano está diretamente relacionada à transdução do sinal através da via JAK/STAT uma vez que, no intestino, a supressão significativa de *STAT* resultou em uma expressão diferencial não significativa do gene *ixodidina*.

No estágio de ninfa, contudo, o gene *JAK* foi diferencialmente expresso de forma significativa, sendo 5 vezes menos expresso em *R. microplus* infectado por *T. equi*, indicando que o protozoário inibe a ativação e transdução do sinal da via JAK/STAT no estágio de ninfa. Contudo, análises adicionais envolvendo os diferentes componentes desta via necessitam ser conduzidos para investigar o papel desta via em ninfas de *R. microplus*. Além disso, nenhum dos genes pertencentes à via JAK/STAT foram diferencialmente expressos de forma significativa no estágio de larva, indicando que a infecção por *T. equi* não induz a ativação desta via nas categorias analisadas.

5 CONCLUSÕES

A via Toll é ativada e responde à infecção por *Theileria equi* no intestino e na glândula salivar de *Rhipicephalus microplus*.

A regulação positiva do gene *PGRP* no intestino de *R. microplus* infectado por *T. equi* indica que determinadas isoformas desta proteína em *R. microplus* podem estar envolvidas no reconhecimento de PAMPs presentes na superfície celular do protozoário.

As PGRPs podem atuar de forma sinérgica ao receptor Toll e intensificar a expressão do gene *microplusina* no intestino de *R. microplus*. Na glândula salivar, a expressão diferencial do fator de transcrição *Relish* em contraponto a não modulação significativa do gene *PGRP* sugere que diferentes mecanismos estão envolvidos na ativação desta via e que pode haver integração entre as diferentes vias de sinalização.

A via JAK/STAT é modulada negativamente no intestino de *R. microplus* em resposta à infecção por *T. equi*, enquanto o AMP *ixodidina* não foi diferencialmente expresso no tecido em questão. Na glândula salivar, por sua vez, onde não houve modulação significativa da via, o gene *ixodidina* foi significativamente mais expresso no grupo infectado, sugerindo que a via JAK/STAT regula a expressão deste AMP nesta interface patógeno-vetor.

O peptídeo antimicrobiano *microplusina* parece exercer um papel central na resposta imunológica do intestino e da glândula salivar de *R. microplus* frente à infecção por *T. equi*, uma vez que o gene codificante para tal AMP foi intensamente mais expresso no grupo infectado quando comparado ao controle em ambos os tecidos.

A infecção por *T. equi* não induz uma modulação geral significativa das principais vias de sinalização imunológica nos estágios iniciais de desenvolvimento do carrapato, indicando que este tecido pode não ter relevância nesta interface patógeno-vetor.

A infecção por *T. equi* induz um padrão de resposta imunológica através da transdução do sinal das diferentes vias de sinalização de forma tecido-específica em fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a resposta pró-oxidativa frente à infecção por *Theileria equi* através dos genes analisados ocorre apenas no intestino e na glândula salivar de *Rhipicephalus microplus*, onde as enzimas dual-oxidases parecem desempenhar um papel significativo em ambos os tecidos. Além disso, a infecção por *T. equi* induz também uma resposta antioxidante nestes tecidos a fim de balancear a resposta oxidativa, onde a catalase parece corresponder à principal enzima envolvida no controle do estresse gerado pelas ERO no intestino e na glândula salivar das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Na glândula salivar, por sua vez, a regulação negativa do gene que codifica para a enzima glutationa-s-transferase grupo infectado sugere que tal enzima pode ter papel fundamental na resposta antioxidante neste tecido, indicando um favorecimento da resposta pró-oxidativa a fim de controlar a infecção por *T. equi*.

Já em relação às vias de sinalização imunológicas, a infecção por *T. equi* foi capaz de induzir ativação da via Toll no intestino e na glândula salivar de *R. microplus*, culminando com um aumento na expressão de genes que codificam para os peptídeos antimicrobianos como microplusina e defensina. Além disso, a microplusina parece exercer um papel central na resposta imunológica do intestino e da glândula salivar de *R. microplus* frente à infecção por *T. equi*. uma vez que o gene codificante para tal enzima foi intensamente mais expresso no grupo infectado em ambos os tecidos.

Considerando a via IMD, o receptor desta via (PGRP) parece atuar de forma sinérgica ao receptor Toll e intensificar a expressão do gene *microplusina* no intestino de *R. microplus*. Na glândula salivar, por sua vez, a regulação positiva do fator de transcrição *Relish* em contraponto a não modulação significativa do gene *PGRP* sugere que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na ativação da via IMD em *R. microplus*.

Além disso, a infecção por *T. equi* resultou na modulação negativa da via JAK/STAT no intestino de *R. microplus*, enquanto o gene que codifica para o peptídeo antimicrobiano *ixodidina* não foi diferencialmente expresso no tecido em questão. Na glândula salivar, por sua vez, onde não houve modulação significativa da via, o gene *ixodidina* foi mais expresso no grupo infectado, sugerindo que a via JAK/STAT regula a expressão deste AMP nesta interface patógeno-vetor.

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de *R. microplus*, a infecção por *T. equi* parece não induzir significativamente uma expressão diferencial de genes envolvidos na resposta oxidativa e imunológica do carrapato.

Sendo assim, pode-se concluir que as fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* respondem à infecção por *T. equi* através de mecanismos imunológicos tecido-específicos. Neste sentido, diferentes moléculas envolvidas no metabolismo redox e nas principais vias de sinalização imunológicas demonstraram exercer um relevante papel na resposta de *R. microplus* à infecção por *T. equi*, as quais apresentam potencial para serem utilizadas como alvo em investigações futuras no intuito de desenvolver ferramentas que visam bloquear a transmissão do parasito pelo carrapato em rebanhos equídeos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, N. M. *et al.* Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. 281-790, jan. 2017.
- AGUILAR-DÍAZ, H. *et al.* Tick Immunobiology and Extracellular Traps: An Integrative Vision to Control of Vectors. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1511, nov. 2021.
- AHMED, A. M. Lipid Peroxidation and Oxidative Protein Products as Biomarkers of Oxidative Stress in the Autogenous Mosquito, *Aedes caspius*, Upon Infection with the Mosquitocidal Bacterium, *Bacillus thuringiensis kurstaki*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, n. 2, p. 525–536, 1 jan. 2012.
- AIDA, H. *et al.* A case of equine piroplasmosis in the Tokyo 2020 Olympic Games. **Journal of Equine Science**, v. 34, n. 3, p. 93–99, set. 2023.
- ALBERDI, P. *et al.* The redox metabolic pathways function to limit *Anaplasma phagocytophilum* infection and multiplication while preserving fitness in tick vector cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 13 set. 2019.
- ALLSOPP, M. T. E. P. *et al.* Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 147–152, fev. 1994.
- ALVARADO-DELGADO, A. *et al.* The IMD and Toll canonical immune pathways of *Triatoma pallidipennis* are preferentially activated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, but cross-activation also occurs. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 256, jul. 2022.
- AMOYEL, M. *et al.* JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: A *Drosophila* perspective. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 28, p. 96–103, abr. 2014.
- ANELLI, T. *et al.* Ero1 α Regulates Ca²⁺ Fluxes at the Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Interface (MAM). **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 10, p. 1077–1087, maio 2012.
- ANTUNES, S. *et al.* Functional genomics studies of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia bigemina*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 187–195, fev. 2012.
- ARMSTRONG, P. B. The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 47–52, jan. 2001.
- AXT, C. W. *et al.* Molecular and Serological Detection of Vector-Borne Pathogens Responsible for Equine Piroplasmosis in Europe between 2008 and 2021. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 816–816, abr. 2024.
- AYLLÓN, N. *et al.* 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–e1005120, 27 mar. 2015.

BADRAL, D. *et al.* Flavonoid and Galloyl Glycosides Isolated from *Saxifraga spinulosa* and Their Antioxidative and Inhibitory Activities against Species That Cause Piroplasmosis. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 9, p. 2416–2423, 23 ago. 2017.

BAPTISTA, C. *et al.* Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 242–245, abr. 2013.

BARROS-BATTESTI, D. M. *et al.* **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 2006.

BHATTARAI, K. R. *et al.* The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 2, p. 151–167, fev. 2021.

BATTSETSEG, B. *et al.* Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351–357, ago. 2002.

BIFANO, T. D. *et al.* Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* Cytochrome c Oxidase Subunit III Gene Is Associated with a Failure of *Anaplasma marginale* Transmission. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98614, 30 maio 2014.

BITTENCOURT, AVELINO JOSÉ. *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887): **INFESTAÇÕES ARTIFICIAIS, BIOLOGIA DA FASE NÃO PARASITÁRIA E PREVALÊNCIA EM CAPRINOS E EQUINOS**. 1990. 105 p. Tese (Doutorado em Parasitologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1990.

BLOCK, K. & GORIN, Y. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p. 627–637, ago. 2012.

BREITENBACH, M. & ECKL, P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 1169–1177, jun. 2015.

BUDACHETRI, K. & KARIM, S. An insight into the functional role of thioredoxin reductase, a selenoprotein, in maintaining normal native microbiota in the Gulf Coast tick (*Amblyomma maculatum*). **Insect Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 570–581, 17 jul. 2015.

BUDACHETRI, K. *et al.* Catalase is a determinant of the colonization and transovarial transmission of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick *Amblyomma maculatum*. **Insect Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 414–419, 1 abr. 2017.

BUTLER, C. M. *et al.* Prevalence of the causative agents of equine piroplasmosis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 2, p. 381–385, ago. 2012.

CADET, J. & WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, p. a012559–a012559, fev. 2013.

CAMINO, E. *et al.* Sero-molecular survey and risk factors of equine piroplasmosis in horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 4, p. 771-779, out. 2020.

CAPELLI-PEIXOTO, J. *et al.* The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 74, p. 32–39, abr. 2017.

CERAUL, S. M. *et al.* A Kunitz Protease Inhibitor from *Dermacentor variabilis*, a Vector for Spotted Fever Group Rickettsiae, Limits *Rickettsia montanensis* Invasion. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 321–329, jan. 2011.

CHEN, T.-H. *et al.* A novel p53 paralogue mediates antioxidant defense of mosquito cells to survive dengue virus replication. **Virology**, v. 519, p. 156–169, maio 2018.

CHOCHOLA, J. *et al.* Virucidal effect of myeloperoxidase on human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 5, p. 969–972, maio 1994.

COLLET, J.-F. & MESSENS, J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 8, p. 1205–16, 2010.

COSSÍO-BAYÚGAR, R. *et al.* Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 12, p. 1378–1387, 23 set. 2005.

COULTOUS, R. M. *et al.* Equine piroplasmosis status in the UK: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. **Veterinary Record**, v. 184, n. 3, p. 95–95, jan. 2019.

COULTOUS, R. M. *et al.* A risk assessment of equine piroplasmosis entry, exposure and consequences in the UK. **Equine Veterinary Journal**, v. 55, n. 2, p. 282-294, maio 2022.

CRIADO-FORNELIO, A. The “expanding universe” of piroplasms. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 337–345, fev. 2004.

CRISPELL, G. *et al.* *Rickettsia parkeri* colonization in *Amblyomma maculatum*: the role of superoxide dismutases. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 291, maio 2016.

CRUZ, C. E. *et al.* Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, jul. 2010.

DAEMON, ERIK. **Biologia da fase não parasitária de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório**. 1985. 91pp. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1985.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101252, out. 2019.

- DA SILVA, J. B. *et al.* Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 1, p. 20–25, fev. 2016.
- DA SILVEIRA, A. *et al.* Natural Infection of the South American Tapir (*Tapirus terrestris*) by *Theileria equi*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 2, p. 411–413, fev. 2017.
- De la FUENTE, J. *et al.* Perception of Ticks and Tick-Borne Diseases Worldwide. **Pathogens**, v. 12, n. 10, p. 1258–1258, out. 2023.
- DE WAAL, D. T. Equine piroplasmiasis: A review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6–14, jan. 1992.
- DODIYA, D. *et al.* Clinical Management of Equine Piroplasmiasis. **The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p.129, abril-junho 2022.
- DOSTERT, C. *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. **Nature Immunology**, v. 6, n. 9, p. 946–953, 7 ago. 2005.
- DREHER-LESNICK, S. M. *et al.* Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 445–453, 1 ago. 2006.
- DUSCHER, G. G. *et al.* Glutathione S-transferase affects permethrin detoxification in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 225–233, 16 fev. 2014.
- ELSAWY, B. S. M. *et al.* Impact of Equine and Camel Piroplasmiasis in Egypt: How Much Do We Know about the Current Situation? **Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1318–1318, nov. 2023.
- ESTEVEZ, E. *et al.* Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 8, p. 913–919, mar. 2009.
- ESTRADA-PEÑA, A. *et al.* The Known Distribution and Ecological Preferences of the Tick Subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 2-3, p. 219–235, fev. 2006.
- FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, out. 2004.
- FENG, T. *et al.* Transcriptome study reveals tick immune genes restrict *Babesia microti* infection. **Insect Science**, v. 0, p. 1-14, jun. 2024.
- FRANQUE, M. P. *et al.* Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2117–2122, out. 2009.

FOGAÇA, A. C. *et al.* Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25330–25334, set. 1999.

FOGAÇA, A. C. *et al.* Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191–200, mar. 2004.

FOGAÇA, A. C. *et al.* Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v. 27, n. 4, p. 667–674, abr. 2006.

FOGAÇA, A. C. *et al.* Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. 12, mar. 2021.

FORRESTER, S. J. *et al.* Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 16 mar. 2018.

FRANCISCHETTI, I., M. B. *et al.* The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n. 6, p. 2051, 2009.

FREITAS, D. R. J. *et al.* Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 688–694, abr. 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FRIEDHOFF, K. T. *et al.*, K. T. Haemoparasites of equines : impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 9, n. 4, p. 1187–1194, dez. 1990.

FRIEDHOFF, K. T. & SOULÉ, C. An account on equine babesioses. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 15, n. 3, p. 1191–1201, set. 1996.

FRITZ, D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1339–1342, mar. 2010.

GALINDO, R. C. & de la FUENTE, J. Transcriptomics Data Integration Reveals Jak-STAT as a Common Pathway Affected by Pathogenic Intracellular Bacteria in Natural Reservoir Hosts. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 05, n. 04, p. 108–115, jan. 2012.

GANCHIMEG, D. *et al.* Flavonoids isolated from the flowers of *Pulsatilla flavescens* and their anti-piroplasm activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 73, n. 3, p. 633–640, mar. 2019.

GANDARA, A. C. P. & OLIVEIRA, P. L. NADPH Oxidases in Arthropods. **Springer Nature eBooks**, p. 477–488, 1 jan. 2023.

GANESAN, P. I. Risk Factors Associated with Equine Piroplasmosis with Varying Clinical Manifestations. **The Indian Veterinary Journal**, v. 100, n. 7, p. 30–33, 2023.

GULIA-NUSS, M. *et al.* Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10507, fev. 2016.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre, Sulina, 103 p. 1975

GRAUSE, J. F. *et al.* Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 541–546, jun. 2013.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, jun. 2014.

GUIDI, E. *et al.* Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 71–83, out. 2014.

GUIMARÃES, A. M. *et al.* Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v. 84, n. 4, p. 323–327, 1998.

HA, E.-M. *et al.* A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. **Science**, v. 310, n. 5749, p. 847–850, 4 nov. 2005.

HAILAT, N. Q. *et al.* Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 1–2, p. 1–8, abr. 1997.

HAJDUŠEK, O. *et al.* Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 16, n. 3, 2013.

HALL, A. *et al.* Typical 2-Cys peroxiredoxins - structures, mechanisms and functions. **FEBS Journal**, v. 276, n. 9, p. 2469–2477, maio 2009.

HANDY, D. E. & LOSCALZO, J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 188, p. 146–161, 1 ago. 2022.

HAYASHI, Y. *et al.* Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. **Development**, v. 139, n. 22, p. 4162–4171, nov. 2012.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, set. 2005.

HEBERT, D. N. & MOLINARI, M. In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1377–1408, out. 2007.

HERNANDEZ, E. P. *et al.* Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 9 ago. 2018.

HERNANDEZ, E. P. *et al.* Ambivalent Roles of Oxidative Stress in Triangular Relationships among Arthropod Vectors, Pathogens and Hosts. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1254–1254, 25 jun. 2022.

HINES, S. A. *et al.* *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 33–33, jan. 2015.

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

HOFFMANN, J. A. *et al.* Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313–1318, maio 1999.

HOLBROOK, A. A. Biology of equine piroplasmiasis. PubMed, v. 155, n. 2, p. 453–4, 15 jul. 1969. J Am Vet Med Assoc., v. 15, n. 2, p. 453-454, 1968.

HOLZEROVA, E. *et al.* Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. **Brain**, v. 139, n. 2, p. 346–354, 1 dez. 2016.

HUANG, J. *et al.* *Babesia microti* thioredoxin 3 is an effective antioxidant and involved in the response to antiprotozoal drugs. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 645–653, 8 fev. 2018.

IMAI, H. & NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145–169, jan. 2003.

IMLER, J. & HOFFMANN, J. A. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 16–22, fev. 2000.

JALOVECKA, M. *et al.* Activation of the tick Toll pathway to control infection of *Ixodes ricinus* by the apicomplexan parasite *Babesia microti*. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 12, p. e1012743, 16 dez. 2024.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865–1879, set. 2006.

KAKANI, P. *et al.* *Anopheles stephensi* Dual Oxidase Silencing Activates the Thioester-Containing Protein 1 Pathway to Suppress *Plasmodium* Development. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 6, p. 496–505, 1 jan. 2019.

KALIL, S. P. *et al.* Immune-related redox metabolism of embryonic cells of the tick *Rhipicephalus microplus* (BME26) in response to infection with *Anaplasma marginale*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 613, dez. 2017.

KAMANI, J. *et al.* Morphological and molecular identification of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Nigeria, West Africa: a threat to livestock health. **Exp. Appl. Acarol**, v. 73, n. 2, p. 283–296, set. 2017.

KAWAHARA, B. *et al.* Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 109, 2007.

KAZIMÍROVÁ, M. & ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 43, aug. 2013.

KERBER, C. E. *et al.* Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 123–7, jun. 1999.

KIM, C. *et al.* Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 158–163, 2008.

KIM, T. K. *et al.* *Borrelia burgdorferi* infection modifies protein content in saliva of *Ixodes scapularis* nymphs. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, mar. 2021.

KITSOU, C. & PAL, U. *Ixodes* Immune Responses Against Lyme Disease Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 29, maio 2018.

KLAFKE, G. M. *et al.* Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus ticks: current strategies and future directions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária/Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 33, n. 2, 1 jan. 2024.

KLEINO, A. & SILVERMAN, N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 1, p. 25–35, 2014.

KLUCK, G. E. G. *et al.* A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 850–859, maio 2018.

KNOWLES, D. P. Control of babesia equi parasitemia. **Parasitology Today**, v. 12, n. 5, p. 195–198, maio 1996.

KNOWLES, D. P. *et al.* Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: implications for apicomplexan parasite surveillance. *International Journal for Parasitology*, v. 48, n. 9-10, p. 679–690, ago. 2018.

KOPÁČEK, P. *et al.* Tick innate immunity. **Adv Exp Med Biol**, v. 708, p. 137–62, jan. 2010.

KOTSYFAKIS, M. *et al.* Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9013, mar. 2015.

KOTÁL, J. *et al.* Modulation of host immunity by tick saliva. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 58–68, out. 2015.

KUMAR, S. *et al.* In-vivo Therapeutic Efficacy Trial with Artemisinin Derivative, Buparvaquone and Imidocarb Dipropionate against *Babesia equi* Infection in Donkeys. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 11, p. 1171–1177, jan. 2003.

KUMAR, S. *et al.* A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 327, n. 5973, p. 1644–1648, 26 mar. 2010.

LAI, R. *et al.* A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 12, p. 1447–1449, jul. 2004.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181–189, mar. 2004.

LAUS, F. *et al.* Clinical investigation on Theileria equi and Babesia caballi infections in Italian donkeys. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, abr. 2015.

LAVERAN, A. Contribution al'etude du *Piroplasma equi*. **CR Seances Soc Biol Paris**, v. 53, p. 385±386, 1901.

LEMAITRE, B. & HOFFMANN, J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 697–743, abr. 2007.

LENNICKE, C. & COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, v. 81, n. 18, p. 3691–3707, set. 2021.

LETO, T. L. & GEISZT, M. Role of Nox Family NADPH Oxidases in Host Defense. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1549–1561, set. 2006.

LEWIS, B. D. *et al.* Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? : research communication. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 90–91, jul. 1999.

LI, J. *et al.* Antiviral function of peptidoglycan recognition protein in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Science**, v. 30, n. 4, p. 1092–1104, 5 dez. 2022.

LIU, L. *et al.* *Ixodes scapularis* JAK-STAT Pathway Regulates Tick Antimicrobial Peptides, Thereby Controlling the Agent of Human Granulocytic Anaplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 8, p. 1233–1241, 2 ago. 2012.

LU, J. & HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75–87, jan. 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, dez. 2001.

MACHADO, A. *et al.* Truncation of amidated fragment 33–61 of bovine α -hemoglobin: Effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v. 88, n. 3, p. 413–426, jan. 2007.

MAITI, S. K. *et al.* A CASE REPORT ON EQUINE PIROPLASMOSIS IN A THOROUGHBRED HORSE FROM DURG, CHHATTISGARH AND ITS THERAPEUTIC MANAGEMENT, **Haryana Vet**, v. 60, p. 114-116, 2021.

MAJI, C. *et al.* Lumefantrine and o-choline – Parasite metabolism specific drug molecules inhibited in vitro growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in MASP culture system. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 3, p. 568–574, jan. 2019.

MALEKIFARD, F. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. **Veterinary Research Forum**, v. 5, n. 2, p. 129-133, jun. 2014.

MANSFIELD, K. L. *et al.* Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, fev. 2017.

MARINHO, H. S. *et al.* Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. **Redox Biology**, v. 2, p. 535–562, 2014.

MARQUES, R. *et al.* Climate change implications for the distribution of the babesiosis and anaplasmosis tick vector, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Research**, v. 51, n. 1, jun. 2020.

MARTIN, R. Equine piroplasmosis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 5, p. 308–309, maio 1999.

MARTINS, L. A. *et al.* The Transcriptome of the Salivary Glands of *Amblyomma aureolatum* Reveals the Antimicrobial Peptide Microplusin as an Important Factor for the Tick Protection Against *Rickettsia rickettsii* Infection. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 3 maio 2019.

MARTINS, L. A. *et al.* Ixochymostatin, a trypsin inhibitor-like (TIL) protein from *Ixodes scapularis*, inhibits chymase and impairs vascular permeability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 284, n. 1, p. 137949–137949, jan. 2025.

MASCIARELLI, S. & SITIA, R. Building and operating an antibody factory: Redox control during B to plasma cell terminal differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 578–588, abr. 2008.

MAZARI, A. M. A. *et al.* The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 688–688, 18 abr. 2023.

McCLURE, E. E. *et al.* p47 licenses activation of the immune deficiency pathway in the tick *Ixodes scapularis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 1, p. 205–210, dez. 2018.

MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467–475, 6 abr. 1998.

MENDOZA, F. J. *et al.* New insights in the diagnosis and treatment of equine piroplasmosis: pitfalls, idiosyncrasies, and myths. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, ago. 2024.

MIYOSHI, T. *et al.* A Kunitz-type proteinase inhibitor from the midgut of the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its endogenous target serine proteinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 170, n. 2, p. 112–115, dez. 2009.

MOLTMANN, U. G. *et al.* Ultrastructural Study on the Development of *Babesia equi* (Coccidia: Piroplasmia) in the Salivary Glands of its Vector Ticks1. **The Journal of Protozoology**, v. 30, n. 2, p. 218–225, maio 1983.

MORETTI, A. *et al.* Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 346–350, jun. 2010.

MÜLLER, J. *et al.* Repurposing of antiparasitic drugs: the hydroxy-naphthoquinone buparvaquone inhibits vertical transmission in the pregnant neosporosis mouse model. **Veterinary Research**, v. 47, n. 32, fev. 2016.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, dez. 2008.

NAIR, P. *et al.* Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 163, n. 1, p. 37–42, set. 2012.

NAKAJIMA, Y. *et al.* Antibacterial Hemoglobin Fragments from the Midgut of the Soft Tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 78–81, 1 jan. 2003.

NAKAMURA, H. *et al.* REDOX REGULATION OF CELLULAR ACTIVATION. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 351–369, abr. 1997.

NANDI, A. *et al.* Esterase and glutathione S-transferase levels associated with synthetic pyrethroid resistance in *Hyalomma anatolicum* and *Rhipicephalus microplus* ticks from Punjab, India. **Experimental and Applied Acarology**, v. 66, n. 1, p. 141–157, 5 fev. 2015.

NARASIMHAN, S. *et al.* A Tick Antioxidant Facilitates the Lyme Disease Agent's Successful Migration from the Mammalian Host to the Arthropod Vector. **Cell Host & Microbe**, v. 2, n. 1, p. 7–18, jul. 2007.

NARASIMHAN, S. *et al.* Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 1, p. 58–71, jan. 2014.

NAVA, S. *et al.* Assessment of habitat suitability for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in temperate areas. **Research in Veterinary Science**, v. 150, p. 10–21, dez. 2022.

NAVARRO-YEPES, J. *et al.* Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 66–85, jul. 2014.

NEYEN, C. *et al.* Tissue- and Ligand-Specific Sensing of Gram-Negative Infection in *Drosophila* by PGRP-LC Isoforms and PGRP-LE. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1886–1897, 6 jul. 2012.

NICARETTA, J. E. *et al.* *Rhipicephalus microplus* seasonal dynamic in a Cerrado biome, Brazil: An update data considering the global warming. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 109506, ago. 2021.

NIJHOF, A. M. *et al.* Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 112, 2009.

NUGRAHA, A. B. *et al.* Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box against piroplasm parasites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 10, p. 84–90, ago. 2019.

NUTTALL, G. H. F. & STRICKLAND, C. On the Occurrence of two Species of Parasites in Equine “Piroplasmosis” or “Biliary Fever.” **Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 65–96, fev. 1912.

NYANGIWE, N. & HORAK, I. G. Goats as alternative hosts of cattle ticks. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 74, n. 1, set. 2007.

OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, out. 2001.

OLIVEIRA, J. H. M. *et al.* Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005525, 5 abr. 2017.

O’NEAL, A. J. *et al.* Croquemort elicits activation of the immune deficiency pathway in ticks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 20, p. e2208673120, maio 2023.

ONYICHE, T. E. *et al.* A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 10, maio 2019.

PALMER, W. J. & JIGGINS, F. M. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 8, p. 2111–2129, abr. 2015.

PASOLINI, M. P. *et al.* Inflammatory Myopathy in Horses With Chronic Piroplasmosis. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 1, p. 133–143, jul. 2017.

PAULINO, P. G. *et al.* Differential Expression of Immune Genes in the *Rhipicephalus microplus* Gut in Response to *Theileria equi* Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1478–1478, dez. 2022.

- PECKLE, M. *et al.* Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2017–2025, mar. 2013.
- PECKLE, M. *et al.* Dynamics of *Theileria equi* Infection in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during the Parasitic Phase in a Chronically Infected Horse. *Pathogens*, v. 11, n. 5, p. 525, maio 2022.
- PELC, R. S. *et al.* Defending the fort: a role for defensin-2 in limiting *Rickettsia montanensis* infection of *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 457–465, 29 abr. 2014.
- PEREIRA, L. S. *et al.* Production of Reactive Oxygen Species by Hemocytes from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 66–72, out. 2001.
- PHIPPS, L. P. & OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 154, n. 13, p. 406–408, mar. 2004.
- PIANTEDOSI *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 578–582, sep. 2014.
- QABLAN, M. A. *et al.* Quest for the piroplasms in camels: Identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. *Veterinary parasitology*, v. 186, n. 3–4, p. 456–460, maio 2012.
- RAHAL, A. *et al.* Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.
- RAMIREZ, J. L. *et al.* Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) Modulates Mosquito Resistance to Fungal Entomopathogens in a Fungal-Strain Specific Manner. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 22 jan. 2020.
- RANA, V. S. *et al.* Dome1–JAK–STAT signaling between parasite and host integrates vector immunity and development. *Science*, v. 379, n. 6628, p. 6628, jan. 2023.
- RIZK, M. A. *et al.* Discovering the in vitro potent inhibitors against *Babesia* and *Theileria* parasites by repurposing the Malaria Box: A review. **Veterinary Parasitology**, v. 274, p. 108895, out. 2019.
- RIZZOLI, A. *et al.* Parasites and wildlife in a changing world: The vector-host- pathogen interaction as a learning case. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 394–401, ago. 2019.
- ROSA, R. D. *et al.* Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 1–14, jun. 2016.
- ROSA, A. C. *et al.* Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1844, 25 mar. 2021.

ROSCHKE, K. L. *et al.* Arthropods Under Pressure: Stress Responses and Immunity at the Pathogen-Vector Interface. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 629777, 15 fev. 2021.

ROSCHKE, K. L. *et al.* PERK-mediated antioxidant response is key for pathogen persistence in ticks. **MSphere**, v. 8, n. 5, 24 out. 2023.

ROTHSCHILD, C. M. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 7, p. 497–508, jul. 2013.

RUDENKO, N. *et al.* Differential Expression of *Ixodes ricinus* Tick Genes Induced by Blood Feeding or *Borrelia burgdorferi* Infection. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 1, p. 36–41, jan. 2005.

RUDENKO, N. *et al.* Gene organization of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 4, p. 501–507, ago. 2007.

RUSSELL, T. A. *et al.* Imd pathway-specific immune assays reveal NF- κ B stimulation by viral RNA PAMPs in *Aedes aegypti* Aag2 cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0008524, 16 fev. 2021.

SABADIN, G. A. *et al.* Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. **Vaccine**, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 19 out. 2017.

SABADIN, G. A. *et al.* Control of Redox Homeostasis in Tick Blood Feeding. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 27 jul. 2019.

SABADIN, G. A. *et al.* An insight into the functional role of antioxidant and detoxification enzymes in adult *Rhipicephalus microplus* female ticks. **Parasitology International**, v. 81, p. 102274–102274, 19 dez. 2021.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

SCHEIN, E. *et al.* *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmed Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 223–7, dez. 1981.

SCOLES, G. A. & UETI, M. W. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 561–580, jan. 2015.

SEARS, K. *et al.* Imidocarb Dipropionate Lacks Efficacy against *Theileria haneyi* and Fails to Consistently Clear *Theileria equi* in Horses Co-Infected with *T. haneyi*. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1035–1035, dez. 2020.

SEVERO, M. S. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase XIAP Restricts *Anaplasma phagocytophilum* Colonization of *Ixodes scapularis* Ticks. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 11, p. 1830–1840, jul. 2013.

SHAW, D. K. *et al.* Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. **Nature Communications**, v. 14, n. 8, p. 14401, fev. 2017.

SHIN, M. *et al.* Subpopulation of Macrophage-Like Plasmatocytes Attenuates Systemic Growth via JAK/STAT in the *Drosophila* Fat Body. **Frontiers in Immunology**, v. 31, n. 11, jan. 2020.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, abr. 2017.

SIES, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 852, set. 2020.

SIES, H. & JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, mar. 2020.

SIES, H. *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 499–515, fev. 2022.

SILVA, F. D. *et al.* Structure and Mode of Action of Microplusin, a Copper II-chelating Antimicrobial Peptide from the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34735–34746, dez. 2009.

SILVA, F. D. *et al.* Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 324, n. 1, p. 64–72, set. 2011.

SILVA, M. G. *et al.* Assessment of Draxxin® (tulathromycin) as an inhibitor of in vitro growth of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Theileria equi*. **International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 265–270, 1 ago. 2018.

SILVERMAN, N. *et al.* Immune Activation of NF- κ B and JNK Requires *Drosophila* TAK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48928–48934, dez. 2003.

ŠIMO, L. *et al.* The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 22 jun. 2017.

SINGH, N. *et al.* Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. 70, out. 2017.

SMITH, A. A. & PAL, U. Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*: perspectives from genome information. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 22, n. 4, ago. 2014.

SMITH, A. A. *et al.* Cross-Species Interferon Signaling Boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 1, p. 91–98, jul. 2016.

SOARES, J. F. *et al.* Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 37, n. 5, p. 1495–1497, out. 2007.

SONENSHINE, D. E. & HYNES, W. L. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 13, p. 7046, maio 2008.

SONENSHINE, D. E. & MACALUSO, K. R. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 390, set. 2017.

SUMBRIA, D. *et al.* Equine Piroplasmosis: Current status. **Veterinaria**, v. 2, n. 1, p. 9-14, jan. 2014.

SUNYAKUMTHORN, P. *et al.* Gene Expression of Tissue-Specific Molecules in Ex vivo *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) During Rickettsial Exposure. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1089–1096, 1 set. 2013.

SVENSSON, M. J. & LARSSON, J. Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila*. **Hereditas**, v. 144, n. 1, p. 25–32, 22 fev. 2007.

SZCZOTKO, M. *et al.* Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 160, p. 105231–105231, jul. 2024.

SYKIOTIS, G. P. & BOHMANN, D. Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 14, n. 1, p. 76–85, jan. 2008.

TAMZALI, Y. Equine piroplasmosis: An updated review. **Equine Veterinary Education**, v. 25, n. 11, p. 590–598, out. 2013.

TANJI, T. *et al.* Toll and IMD Pathways Synergistically Activate an Innate Immune Response in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 12, p. 4578–4588, 16 abr. 2007.

TEW, K. D. *et al.* The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 299–313, jul. 2011.

TIROSH-LEVY, S. *et al.* Twenty Years of Equine Piroplasmosis Research: Global Distribution, Molecular Diagnosis, and Phylogeny. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 926, nov. 2020.

TSAI, C. W. *et al.* *Drosophila melanogaster* Mounts a Unique Immune Response to the Rhabdovirus Sigma virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 3251–3256, 15 maio 2008.

UETI, M. W. *et al.* Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755-3759, 2005.

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

VALANNE, S. *et al.* The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 649–656, jan. 2011.

VILLAR, S. F. *et al.* The multifaceted nature of peroxiredoxins in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 76, p. 102355, out. 2023.

WEIDINGER, A. & KOZLOV, A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472–484, abr. 2015.

WISE, L. N. *et al.* Review of Equine Piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334–1346, ago. 2013.

WOOD, Z. A. *et al.* Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650–653, abr. 2003.

WU, Y. *et al.* In Vitro Pharmacodynamics and Bactericidal Mechanism of Fungal Defensin-Derived Peptides NZX and P2 against *Streptococcus agalactiae*. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 881–881, 22 abr. 2022.

XI, Z. *et al.* The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 7, p. e1000098, jul. 2008.

XIE, Y. *et al.* GPX4 in cell death, autophagy, and disease. **Autophagy**, v. 19, n. 10, p. 2621–2638, 4 jun. 2023.

XUAN, J. *et al.* Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, p. 100954, mar. 2023.

YANG, X. *et al.* A Dityrosine Network Mediated by Dual Oxidase and Peroxidase Influences the Persistence of Lyme Disease Pathogens within the Vector. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 18, p. 12813–12822, 2 maio 2014.

ZAPF, E. & SCHEIN, E. New findings in the development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks *Hyalomma* species. **Parasitology Research**, v. 80, n. 7, p. 543–548, jan. 1994.

ZAUGG, J. L. & LANE, V. M. Evaluations of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (*Babesia equi*). **Am J Vet Res.**, v. 50, n. 5, p. 782–785, maio 1989.

ZELKO, I. N. *et al.* Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free radical biology & medicine**, v. 33, n. 3, p. 337–49, 2002.

ZHANG, L. & GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. 14–19, jan. 2016

ZHONG, L. *et al.* Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 5854–5859, maio 2000.

ZITO, E. ERO1: A protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 83, p. 299–304, 1 jun. 2015.

ZOBBA, R. *et al.* Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301–308, maio 2008.

ZUMAYA-ESTRADA, F. A. *et al.* Comparative genomics analysis of triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 48, jan. 2018.

8 ANEXOS

Anexo I - Expressão diferencial relativa dos genes envolvidos no metabolismo redox de *Rhipicephalus microplus* no estágio de larva em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>CuZnSOD</i>	-2,20	0,1098	-0,2053 - 1,809
<i>DUOX-1</i>	-2,06	0,1187	0,26 – 1,53
<i>DUOX-2</i>	-2,11	0,496	0,002 – 1,81
<i>ERO1</i>	-5,62	0,0008	1,57– 3,24
<i>CAT</i>	1,18	0,2598	-0,60 - - 2,08
<i>GPX</i>	1,02	0.4602	-0,84 – 1,77
<i>GST-1</i>	2,35	0,03	-2,08 – -0,08
<i>PHGPX</i>	1,39	0,8538	-0,81 – 2,11
<i>PRX</i>	-1,91	0,0126	0,40 – 2,80
<i>TRX</i>	-1,41	0,5269	-0,31 – 2,32
<i>TRXR</i>	-2,16	0,2825	-2,40 – 0,66

Anexo II - Expressão diferencial relativa dos genes envolvidos no metabolismo redox de *Rhipicephalus microplus* no estágio de ninfa em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>CuZnSOD</i>	1,17	0,44	-1,157 - 2,519
<i>DUOX-1</i>	-1,64	0,1195	-0,1337 - 1,045
<i>DUOX-2</i>	1,29	0,7663	-3,058 - 0,6113
<i>ERO1</i>	-2,07	0,6739	-1,191 - 1,788
<i>CAT</i>	1,79	0,3414	-0,5080 - 1,371
<i>GPX</i>	1,62	0,4930	-2,505 - 0,7634
<i>GST-I</i>	1,50	0,3895	-3,002 - 1,849
<i>PHGPX</i>	-5,32	<0,0001	1,674 - 3,025
<i>PRX</i>	1,45	0,5705	-0,7518 - 1,311
<i>TRX</i>	1,22	0,3951	-0,4787 - 1,142
<i>TRXR</i>	1,31	0,7256	-0,5323 - 1,238

Anexo III - Expressão diferencial relativa dos genes envolvidos no metabolismo redox do intestino de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>CuZnSOD</i>	9,72	<0,0001	-3,68 - -2,50
<i>DUOX-1</i>	3,14	0,004	-1,96 - -0,44
<i>DUOX-2</i>	6,47	0,0002	- 3,25 - - 1,31
<i>ERO1</i>	7,89	<0,0001	-3,77 - -2,13
<i>CAT</i>	35,46	<0,0001	-3,77 - -2,13
<i>GPX</i>	-7,87	<0,0001	2,97 – 6,51
<i>GST-1</i>	-7,08	0,0019	2,31 – 3,13
<i>PHGPX</i>	-7,50	0,0003	1,25 – -3,34
<i>PRX</i>	-3,06	0,104	0,90 – 2,20
<i>TRX</i>	-1,58	0,5737	-0,78 – 2,011
<i>TRXR</i>	-2,47	0,3343	-2,94 – 0,91

Anexo IV - Expressão diferencial relativa dos genes envolvidos no metabolismo redox da glândula salivar de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>CuZnSOD</i>	2,51	0,1882	-2,22 – 0,47
<i>DUOX-1</i>	6,54	<0,0001	-3,28 – -1,41
<i>DUOX-2</i>	3,62	0,0368	-3,18 - -0,12
<i>ERO1</i>	2,34	0,5374	-1,60 – 0,87
<i>CAT</i>	5,24	<0,0001	-2,97 - - 1,48
<i>GPX</i>	1,32	0,7754	-1,48 – 1,13
<i>GST-1</i>	-18,36	<0,0001	1,74 – 5,53
<i>PHGPX</i>	2,20	0,0766	-1,78 – 0,10
<i>PRX</i>	2,17	0,252	-1,69 – 0,48
<i>TRX</i>	1,09	0,655	-0,79 – 1,22
<i>TRXR</i>	-3,55	0,003	-2,37 – -0,57

Anexo V. Expressão diferencial de genes de vias imunológicas em larvas inteiras de *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i>-valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>Receptor Toll</i>	-2,16	0,0856	-0,1268 - 1,715
<i>Dorsal</i>	-2,47	0,0695	-0,13 – 3,05
<i>PGRP</i>	-4,51	0,0004	1,235 - 3,371
<i>Relish</i>	-2,46	0,08	-0,5968 - 3,256
<i>JAK</i>	-2,06	0,1605	-2,23 – 0,16
<i>STAT</i>	-1,79	0,1485	-0,4692 - 2,801
<i>Microplusina</i>	1,28	0,5533	-1,70 – 0,95
<i>Defensina</i>	1,08	0,54	-0,79 - 1,45
<i>Ixodidina</i>	-2,29	0,1355	0,60 – 3,99

Anexo VI - Expressão diferencial de genes de vias imunológicas em ninfas inteiras de *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i>-valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>Receptor Toll</i>	1,39	0,7747	-0,4787 - 1,142
<i>Dorsal</i>	-1,39	0,2611	-0,6979 - 2,377
<i>PGRP</i>	1,16	0,9932	-2,147 - - 1,03
<i>Relish</i>	-1,70	0,075	-0,4787 - 1,142
<i>JAK</i>	-4,55	0,0004	1,11 - 3,023
<i>STAT</i>	1,01	0,3439	-0,4787 - 1,142
<i>Microplusina</i>	1,20	0,2345	-1,45 - 2,789
<i>Defensina</i>	1,49	0,4512	-1,151 - 2,453
<i>Ixodidina</i>	1,46	0,8797	-1,284 - 1,112

Anexo VII - Expressão diferencial de genes de vias imunológicas no intestino de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i>-valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>Receptor Toll</i>	9,76	<0,0001	-3,82 - -1,93
<i>Dorsal</i>	3,61	<0,0001	-3,28 – -1,41
<i>PGRP</i>	3,24	<0,0001	-2,147 - - 1,03
<i>Relish</i>	1,36	0,7887	-2,72 – 1,99
<i>JAK</i>	2,87	0,0843	-2,23 – 0,16
<i>STAT</i>	-15,53	0,0006	2,33 – 5,59
<i>Microplusina</i>	79,41	<0,0001	-7,68 – -4,95
<i>Defensina</i>	4,22	0,0002	-2,76 - - 1,13
<i>Ixodidina</i>	2,62	0,1304	-2,37 – 0,10

Anexo VIII - Expressão diferencial de genes de vias imunológicas na glândula salivar das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* *Rhipicephalus microplus* em resposta a infecção por *Theileria equi*.

Gene	Nível de Expressão	<i>p</i> -valor	Intervalo de confiança 95% (IC)
<i>Receptor Toll</i>	4,02	0,0002	-2,46 - -1,0
<i>Dorsal</i>	3,15	0,0399	-2,34 - -0,06
<i>PGRP</i>	1,50	0,6289	-1,57 – 0,98
<i>Relish</i>	3,22	0,003	-2,26 - - 0,54
<i>JAK</i>	2,34	0,0885	-1,98 – 0,15
<i>STAT</i>	-1,87	0,2905	-0,58 – 1,80
<i>Microplusina</i>	22,25	0,0002	-5,02 - -3,24
<i>Defensina</i>	4,45	0,009	-2,69 - -0,45
<i>Ixodidina</i>	5,05	0,0002	-2,92 - - 1,14