

VIAS METABÓLICAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA DE BOVINOS CARACU AO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

Lucas Teixeira **Silva**¹; Natalya Gardezani **Abduch**²; Henrique Gonçalves **Reolon**³; Ana Cláudia de **Freitas**⁴; Claudia Cristina Paro de **Paz**⁵; Nedenia Bonvino **Stafuzza**⁶

Nº 24706

RESUMO – A crescente preocupação com a resistência dos carrapatos aos acaricidas químicos, aliada à demanda por produtos de origem animal sem resíduos (produção sustentável) pautada no bem-estar animal, vem tornando a utilização de raças bovinas naturalmente resistentes ao carrapato uma opção cada vez mais viável. Esse estudo teve como objetivo identificar as respostas biológicas que contribuem para a resistência ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em uma raça taurina adaptada ao clima tropical, por meio de análise proteômica do plasma sanguíneo. Duzentas e doze vacas Caracu foram avaliadas quanto à infestação natural por *R. microplus* por meio de contagens diretas de teleógenas. Amostras de plasma dos animais que apresentaram maiores ($n=8$, susceptíveis) e menores ($n=8$, resistentes) contagens de teleógenas foram analisadas por espectrometria de massa de alta resolução. As proteínas diferencialmente reguladas entre os grupos foram submetidas a análise funcional com a ferramenta DAVID, a qual revelou a participação dessas proteínas em 19 processos biológicos, 14 funções moleculares e 12 vias metabólicas, dentre os quais destacam-se aqueles relacionados com homeostasia, sistemas de complemento e coagulação, proliferação e migração celular, lipídios e lipoproteínas, transcrição, receptores necrófagos e sinalização Hippo. Os resultados obtidos no presente estudo auxiliam na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na resistência dos bovinos Caracu ao carrapato, o que permite ampliar o conhecimento sobre como raças adaptadas respondem à infestação por carrapatos e auxiliar no desenvolvimento de estratégias para mitigar os prejuízos causados pelo *R. microplus*.

Palavras-chaves: enriquecimento funcional, espectrometria de massa de alta resolução, homeostasia, proliferação e migração celular, proteômica, raça adaptada ao clima tropical.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, UNIPAM, Patos de Minas-MG; lucasteixeira.s1911@gmail.com.

2 Colaboradora: Bolsista CAPES, Doutoranda em Genética, FMRP/USP, Ribeirão Preto-SP.

3 Colaborador: Bolsista CAPES, Mestrando em Ciência Animal, UNESP, Jaboticabal-SP.

4 Colaboradora: Pesquisadora da EPAMIG, Patos de Minas-MG.

5 Colaboradora: Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP.

6 Orientadora: Jovem Pesquisadora do Instituto de Zootecnia, Sertãozinho-SP; nedeniabbs@gmail.com.

ABSTRACT – *The growing concern regarding the tick resistance to chemical acaricides, combined with the demand for sustainable livestock production based on animal welfare, have increased the viability of naturally tick-resistant cattle breeds. Thus, this study aimed to identify the biological responses that contribute to resistance to the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a tropically adapted beef cattle breed, through proteomic analysis of blood plasma. Two hundred and twelve Caracu cows were evaluated under natural tick infestation through direct tick counts. Plasma samples from animals that had higher (n=8, susceptible) and lower (n=8, resistant) tick counts were analyzed by high-resolution mass spectrometry. The differentially regulated proteins between the groups were used to perform the functional analysis by DAVID tool, which revealed the participation of these proteins in 19 biological processes, 14 molecular functions and 12 pathways, in which we highlighted those related to hemostasis, complement and coagulation systems, cell proliferation and migration, lipids and lipoproteins, transcription, scavenger receptors, and Hippo signaling. The results obtained in the present study improve our understand about the biological mechanisms involved in the resistance of a tropically adapted beef cattle breed to tick infestation, which allows expand our knowledge about how adapted breeds respond to tick infestation and contributes to develop strategies to mitigate the damage caused by *R. microplus*.*

Keywords: cell proliferation and migration, functional enrichment, hemostasis, high-resolution mass spectrometry, proteomics, tropically adapted breed.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem posição de destaque na economia mundial, uma vez que o país é o maior exportador de carne bovina. Diante desse cenário, a bovinocultura vem se modificando em todo o mundo, visando atender as exigências qualitativas e quantitativas do mercado consumidor, cuja a saúde e o bem-estar dos animais também devem ser constantemente monitorados, visando o crescimento da cadeia e a mitigação de doenças e infecções que impactam a produção (TURNER et al., 2022).

As infecções parasitárias apresentam impacto negativo na bovinocultura, cujo o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* apresenta papel de destaque. O carrapato tem seu ciclo de vida parasitário completo (larva, ninfa e adulto) em apenas 21 dias, onde se alimenta e se desenvolve em um único hospedeiro, seguindo com oviposição, incubação e fase larval em ambiente extrínseco (WANG et al., 2017). A infestação por carrapatos pode causar elevados prejuízos econômicos devido a lesões de pele que desvalorizam o couro, a perda de peso que resulta na redução da produção de leite e carne, além de problemas de saúde como a anemia e a transmissão de bactérias (*Anaplasma*

spp.) e protozoários (*Babesia spp.*) que são agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina, uma doença que podem causar a morte dos animais (CERQUEIRA et al., 2022).

No território brasileiro, o monitoramento e o controle de carrapatos têm se mostrado pouco eficazes, uma vez que a aquisição de resistência aos princípios ativos está em ascensão, pois os manejos executados repetidamente com o mesmo princípio ativo aliados à aplicações em doses inferiores às recomendadas pelo fabricante, resulta na pressão seletiva das populações de carrapatos (PEREIRA et al., 2022). Porém, a utilização do controle químico tem se tornado não sustentável uma vez que há a necessidade frequente do desenvolvimento de novos acaricidas devido à aquisição de resistência dos carrapatos, além da contaminação do ambiente pelo mau uso desses produtos químicos (OBAID et al., 2022). Aliado a esses fatores, apenas cerca de 5% dos carrapatos se encontram nos animais, enquanto que o restante da população se encontra no ambiente, na fase denominada de vida livre ou não parasitária, o que facilita a reinfestação (PEREIRA et al., 2022).

Nos últimos anos, a crescente preocupação com a resistência dos carrapatos aos acaricidas químicos, aliada ao aumento na demanda de produtos de origem animal sem resíduos (produção sustentável) pautada no bem-estar animal vem tornando a utilização de raças bovinas naturalmente resistentes ao carrapato uma opção cada vez mais viável. Assim, a identificação e ampla utilização de raças naturalmente resistentes ao carrapato tem se tornado uma realidade (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2018), uma vez que a resistência dos bovinos aos carrapatos é influenciada por fatores fenotípicos, genotípicos e comportamentais (PIPER et al., 2009). A raça Caracu (*Bos taurus taurus*), que se formou no Brasil por meio de cruzamentos descontrolados entre bovinos trazidos na época da colonização, passou por um intenso processo de seleção natural devido à escassez de alimentos, às dificuldades do clima tropical e à grande quantidade de endo e ectoparasitas (MCMANUS et al., 2010). Esse processo de intenso contato com carrapatos provavelmente contribuíram para a resistência ao *R. microplus* observada atualmente nessa raça bovina adaptada ao clima tropical (MAIORANO et al., 2019a; 2019b; ABDUCH et al., 2024).

Vários estudos surgiram nas últimas décadas com o intuito de detectar biomarcadores para resistência ao carrapato (RAZA et al., 2021; RAZA et al., 2023). No entanto, estudos são necessários para compreender as variáveis que impactam a resistência aos carrapatos, especificamente na escala proteômica, uma vez que fornece uma visão ampla sobre os mecanismos biológicos do hospedeiro envolvidos na resposta à infestação por carrapatos (RAZA et al., 2023), uma vez que os RNAs não codificantes participam em todas as fases da interação carrapato-hospedeiro, subvertendo as respostas do hospedeiro aos carrapatos (BENSAOUD et al., 2019). Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi explorar as respostas biológicas envolvidas na resistência de bovinos Caracu ao *R. microplus*, por meio de análise proteômica do plasma sanguíneo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia (nº 292-19) foi realizado no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, do Instituto de Zootecnia, localizado em Sertãozinho, SP. Foram avaliadas 212 fêmeas Caracu criadas em sistema de pastejo rotacionado (*Brachiaria sp.*) e suplementadas com sal mineral. A infestação natural por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi avaliada por meio da contagem direta de teleógenas (fêmeas de 4 a 8 cm) no lado direito do animal (WHARTON e UTECH, 1970). As contagens de teleógenas foram realizadas com os animais no tronco de contenção, os quais foram submetidos a oito avaliações durante o período de 18 meses (novembro de 2021 a maio de 2023), com intervalo de 60 dias entre as avaliações.

Amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA-K₃, seguida de centrifugação a 3.000 ×g por 15 minutos para separação e armazenamento do plasma a -80°C até sua utilização. As amostras de sangue dos oito animais que apresentaram mais carrapatos (susceptíveis) e dos oito animais que apresentaram menos carrapatos (resistentes) foram submetidas à análise proteômica por espectrometria de massa de alta resolução. A determinação da concentração total de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), com o kit Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra foi analisada separadamente em triplicata, cuja absorbância foi lida a 595 nm no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA) e a massa total de proteína presente em cada amostra foi quantificada. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliar o perfil proteico. Cerca de 20 µg de cada amostra foi ressuspensa em XT Sample Buffer 1X (Bio-Rad, EUA) contendo 20 µg de ditioneitol (DTT) (GE Healthcare Life Sciences, EUA) para reduzir as ligações dissulfeto das proteínas. Após incubação a 100°C por 5 minutos, as amostras foram alquiladas com 100 µg de iodoacetamida (IAA) (Sigma-Aldrich, EUA) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Foram utilizados géis Tris-Glicina 12% Novex™ (Invitrogen, EUA) para eletroforese a 40V por 30 minutos, seguido por 70V por 2 horas. Os géis foram então corados com Coomassie GelCode™ Blue (Thermo Scientific, EUA) e os spots proteicos foram excisados, de acordo com as recomendações do fabricante.

Cerca de 50 µg de cada amostra foi preparada para as análises de cromatografia líquida e espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) que consistiu em três etapas principais: i) redução e alquilação de proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina, e iii) dessalinização das amostras. As pontes de dissulfeto das proteínas presentes em cada amostra foram reduzidas pela adição de DTT (1 mg de DTT/mg de proteína), seguido de incubação por 2 horas. Em seguida, foi adicionado o agente alquilante IAA (3 mg IAA/mg proteína), seguido de incubação por 1 hora. Cada amostra foi então diluída 5X em 0,1 M de bicarbonato de amônio (pH ≥ 8,0) para atingir o volume

final de 500 µL, seguida da adição de 1 µg de tripsina e incubação a 37°C por 16 horas. As amostras foram ainda dessalinizadas por meio da coluna 1cc OASIS HLB Cartridge (Waters, EUA), de acordo com as indicações do fabricante.

Um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan, EUA) acoplado a um sistema de cromatografia em nanofluxo (LC-MS/MS) foi utilizado para a análise de 1 µg de cada amostra. A separação por cromatografia líquida foi realizada em coluna de 25 cm (Pico frit 75µm ID, New Objective) acondicionada com Magic C18, com gradiente linear de 5 a 40% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico durante 60 minutos e fluxo de 250 nL/min. Os espectros foram adquiridos em modo dependente de dados em intervalos de 400 a 1800 m/z, e os cinco mais abundantes íons de cada espectro MS foram selecionados para análise MS/MS. Os parâmetros do espectrômetro de massa foram: tensão capilar de 2,2 KV, temperatura capilar de 200°C, resolução de 100.000 e valor alvo de FT de 2.000.000.

Os dados obtidos foram processados com o algoritmo Comet v. 2019 (ENG et al., 2013) utilizando o banco de dados UniProt v. 2023 (<https://www.uniprot.org/>) para a identificação das proteínas presentes em cada amostra. A identificação e quantificação dos peptídeos foi obtida com os algoritmos Peptide Prophet (KELLER et al., 2002) e XPRESS (HAN et al., 2001), respectivamente (FDR ≤ 0,05). Os peptídeos e suas intensidades foram agrupados para obtenção da intensidade de cada proteína por meio de um script em R (R Core Team, 2021). A análise comparativa e quantitativa entre os grupos foi realizada utilizando o número de correspondências do espectro peptídico observado por peptídeo, o qual estima a abundância. Proteínas com $\log_2^{fold\ change\ ratio}$ acima de 2 e abaixo de 0,5 foram consideradas diferencialmente abundantes ($t > 0,05$).

A análise de enriquecimento funcional foi realizada utilizando a ferramenta DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) com os bancos de dados Gene Ontology (GO) e KEGG para auxiliar na interpretação das funções das proteínas diferencialmente reguladas, considerando os processos biológicos, funções moleculares e vias metabólicas que essas proteínas participam ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 14.034 proteínas nas amostras de plasma analisadas. Após o controle de qualidade, 34 e 172 proteínas foram detectadas exclusivamente nas amostras de plasma de animais resistentes e susceptíveis aos carrapatos, respectivamente. Além disso, 152 proteínas foram identificadas como diferencialmente reguladas entre os dois grupos, entre as quais 51 e 101 proteínas apresentaram maior e menor abundância no plasma de animais susceptíveis em relação ao plasma de animais resistentes.

As proteínas diferencialmente reguladas entre os grupos foram submetidas a análise de enriquecimento funcional, a qual revelou a participação dessas proteínas em 19 processos biológicos, 14 funções moleculares e 12 vias metabólicas significativas (Figura 1), dentre os quais

destacam-se aqueles relacionados com hemostasia, sistemas de complemento e coagulação, proliferação e migração celular, lipídios e lipoproteínas, receptores necrófagos e sinalização Hippo.

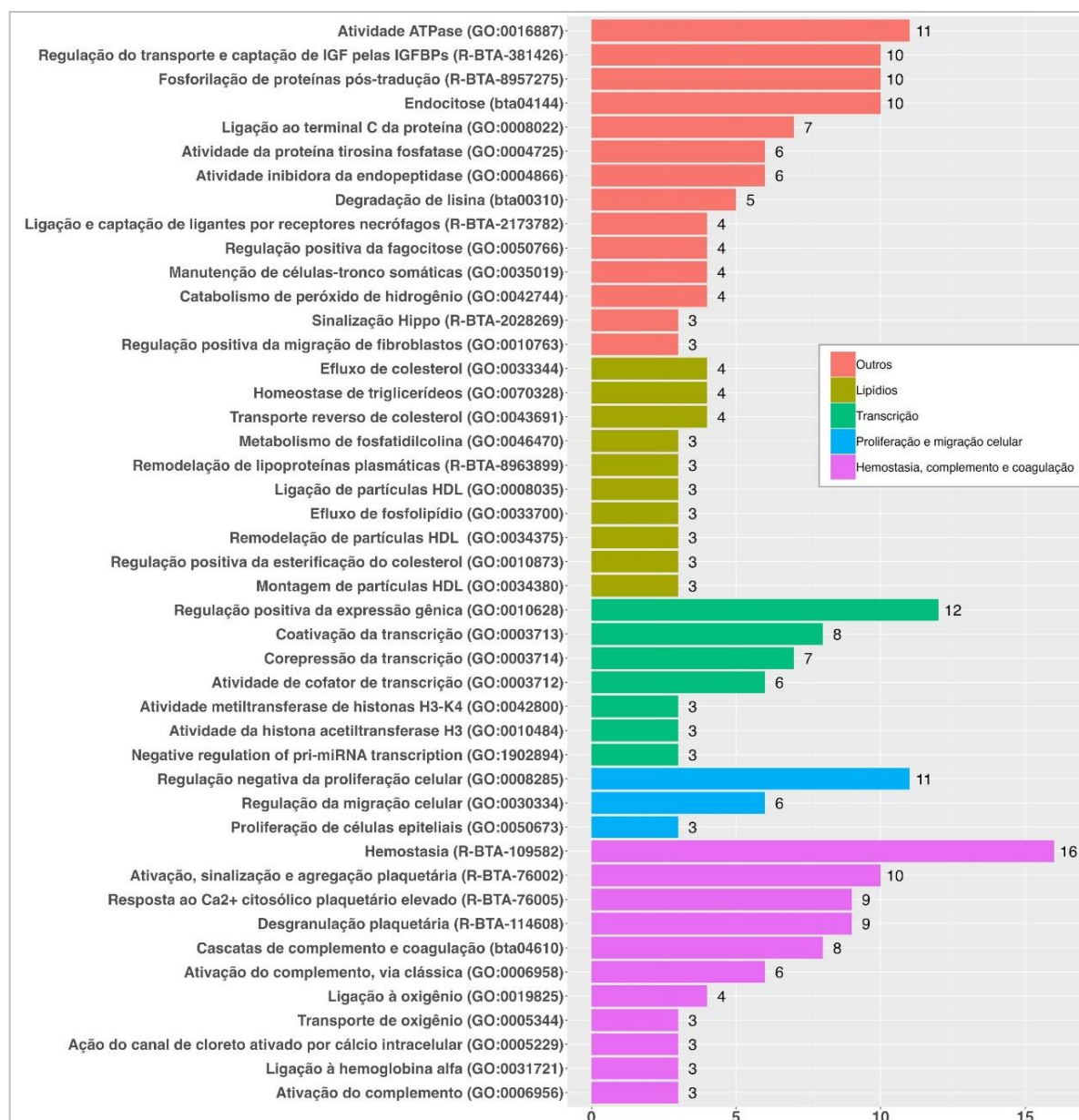


Figura 1. Processos biológicos, funções moleculares e vias metabólicas significativas ($p < 0,05$) e os respectivos números e proteínas diferencialmente reguladas entre os animais resistentes e susceptíveis ao carrapato que contribuem com esses termos significativos.

3.1. Hemostasia, sistema de coagulação e sistema complemento

A hemostasia é um mecanismo fisiológico responsável pela regulação, prevenção e interrupção de sangramento após a lesão dos vasos sanguíneos, o qual envolve complexas interações entre receptores que atuam em conjunto no bloqueio das lesões vasculares (DORGALALEH et al., 2018). Os fatores hemostáticos interagem direta e indiretamente com os sistemas de coagulação e complemento para prover tanto a homeostase quanto respostas protetoras

à inflamação e ao dano tecidual (ONCUL e AFSHAR-KHARGHAN, 2020). Após a lesão vascular causada pela introdução do aparelho bucal do carrapato no hospedeiro, o sistema de hemostasia é ativado de forma rápida e controlada, iniciando-se com a vasoconstrição, formação de coágulos sanguíneos e ação de fatores anticoagulantes, o que culmina na obstrução de lesões no sistema vascular e manutenção da integridade dos vasos sanguíneos (HO-TIN-NOÉ et al., 2018).

Existem importantes etapas na hemostasia, sendo a primeira delas o transporte de oxigênio por meio das hemácias para os tecidos lesionados, além da vasoconstrição, que consiste na contração de vasos sanguíneos e células musculares lisas no interior dos vasos, responsáveis por reduzir o fluxo sanguíneo na área afetada (BARSHEIN et al., 2007). A formação do tampão plaquetário, denominado de hemostasia primária, ocorre pela adesão das plaquetas sanguíneas circulantes nas áreas lesionadas aderindo-se ao subendotélio, formando um tampão temporário, além de proteínas liberadas pelos grânulos das plaquetas ativadas no processo que auxiliam na cicatrização que, por meio de um selante, interrompem o sangramento (DORGALALEH et al., 2018). A hemostasia secundária envolve uma cascata de reações químicas que leva a conversão de fibrinogênio em fibrina, transformando o sangue líquido em coágulo, o que contribui com o tampão plaquetário e com as proteínas de coagulação (DORGALALEH et al., 2018).

O sistema de coagulação tem como principal objetivo evitar perdas excessivas de sangue em casos de lesões, por meio de diversas reações químicas que resultam na formação do coágulo. Os bovinos resistentes à infestação por carrapatos apresentam maiores números de células inflamatórias no local de fixação do carrapato em relação aos animais susceptíveis, os quais apresentam coagulação mais lenta devido a expressão de eosinófilos e basófilos (CARVALHO et al., 2014). Além disso, a estabilidade dos fatores de coagulação influencia diretamente a gravidade da infestação e a capacidade do hospedeiro em lidar com os efeitos adversos como os anticoagulantes presentes na saliva dos carrapatos (SCHÖN, 2022).

O sistema complemento atua na resposta imune inata e adaptativa dos organismos, o qual é composto por diversas proteínas, receptores e reguladores (MERLE et al., 2015). Tal sistema pode ser ativado em resposta a infestações por carrapatos mediante o contato da saliva do parasita com a pele do hospedeiro, que modulam o sistema imune e induzem reações que contribuem limitando o acesso do parasita à alimentação (CARVALHO et al., 2014). Estudos têm demonstrado que a infestação por carrapatos altera a quantidade de diversas proteínas do sistema complemento no soro de bovinos resistentes ao carrapato (RAZA et al., 2021; RAZA et al., 2023), as quais contribuem na resposta do hospedeiro contra a infestação por carrapatos. Tais proteínas têm ação direta no local de fixação do carrapato, o que leva a falhas no ingurgitamento em estágios iniciais (CARVALHO et al., 2014). Além disso, durante a infestação por *R. microplus*, o sistema complemento do hospedeiro pode ser inativado por moléculas salivares do carrapato, prejudicando a produção de mediadores inflamatórios (SILVA et al., 2016). Portanto, embora o sistema de coagulação e o sistema complemento sejam distintos, eles se complementam e são essenciais na resistência dos animais

mediante a infestação por carrapatos, os quais auxiliam a promover a homeostase no hospedeiro e combater a infestação.

3.2. Proliferação e migração celular

A proliferação e a migração de células para um local inflamatório é um aspecto crucial da imunidade do hospedeiro, uma vez que células imunológicas e proteínas-chave reconhecem danos à pele causados pelos carrapatos que se alimentam e secretam proteínas que aumentam o recrutamento de efetores imunológicos para os locais das picadas para prover resposta inflamatória, hemostasia, reparo tecidual e cicatrização (ALI et al., 2022). No entanto, moléculas salivares dos carrapatos são secretadas no local da picada e influenciam as respostas imunológicas e hemostáticas do hospedeiro, modulando a proliferação e migração de leucócitos, queratinócitos e células endoteliais (RODRIGUES et al., 2018). Assim, a cicatrização de feridas no hospedeiro é retardada, bem como a hemostasia e as respostas imunes (inatas e adaptativas) são perturbadas, o que leva ao sucesso da fixação e desenvolvimento das larvas dos carrapatos.

Como descrito por Moré et al. (2019), em um estudo de transcriptoma de biópsias de pele em bovinos Braford resistentes e suscetíveis à infestação por carrapatos, a proliferação e a migração celular são respostas celulares que auxiliam no combate à infestação por carrapatos observadas para todos os tipos de células imunológicas nos bovinos resistentes, representadas principalmente por fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e outros fatores biológicos. Além disso, na cicatrização das feridas, ocorre produção e migração de fibroblastos e queratinócitos para a produção de matriz extracelular e colágeno para reparação, o que restaura o tecido danificado e reduz a possibilidade de infecções secundárias e a atração de carrapatos para o local (KONGSUWAN et al., 2010).

3.3. Lipídios e lipoproteínas

Os lipídios são moléculas orgânicas transportadas via circulação sanguínea para os tecidos periféricos por meio de lipoproteínas, os quais desempenham diversos papéis importantes no organismo como armazenamento de energia, formação de membranas celulares, isolantes térmicos, produção de hormônios, cofatores enzimáticos e absorção de vitaminas lipossolúveis (TINTUT e DEMER, 2014). Embora a ação dos lipídios e das lipoproteínas na resistência ao carrapato ainda não esteja completamente elucidada, a resposta imunológica pró-inflamatória do hospedeiro é mediada por lipídios, a qual influencia diretamente a capacidade do animal em combater a infestação e restaurar a homeostase (VLASOVA e SAIF, 2021).

3.4. Receptores necrófagos

Os receptores necrófagos são receptores de reconhecimento de padrões associados à membrana, cujas principais funções estão relacionadas à interações hospedeiro-patógeno, à homeostase, à sinalização de inflamação, à imunidade inata e adaptativa (TABAN et al., 2022). Os receptores necrófagos atuam na geração de respostas imunes contra vasto repertório de ligantes por meio de mecanismos como endocitose, fagocitose e adesão (TABAN et al., 2022). Kabamoto et al. (2002) mostraram o importante papel dos receptores necrófagos no aumento da imunidade no combate ao carrapato em roedores.

3.5. Sinalização Hippo

A sinalização Hippo consiste em uma rede regulatória de cascata quinase, coativadores de transcrição e moléculas de ligação ao DNA (MENG et al., 2016) que orquestram a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, que por sua vez regulam a homeostase, bem como o crescimento, reparo e remodelação dos tecidos (ZHONG et al., 2024). A sinalização Hipoo também contribui para a angiogênese, vasculogênese e linfangiogênese (KOBAYASHI et al., 2023) além de atuar na modulação da resposta imunológica e da inflamação, que protegem o tecido hospedeiro de lesões e contribuem para o processo de reparo tecidual no local da picada (MIA e SINGH, 2022).

4. CONCLUSÃO

As vias metabólicas, funções moleculares e processos biológicos identificados nesse trabalho, a partir de proteínas diferencialmente reguladas entre animais resistentes e susceptíveis aos carrapatos, auxiliam na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na resistência dos bovinos Caracu ao carrapato *R. microplus*, o que permite ampliar o conhecimento sobre como raças adaptadas respondem à infestação por carrapatos e auxiliar no desenvolvimento de estratégias para mitigar os danos causados pelo *R. microplus*.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC (#61784/2023-2), bolsas de produtividade em pesquisa ((#302230/2022-0 and #302914/2022-6) e auxílio financeiro (#407134/2021-2) concedidos. À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2018/19216-7) e bolsas concedidas (#2019/10438-0, #2019/17251-2 e #2020/03699-9).

6. REFERÊNCIAS

- ABDUCH, N. G.; REOLON, H. G.; LIGORI, V. A.; SILVA, R. M. O.; VERÍSSIMO, C. J.; PAZ, C. C. P.; STAFUZZA, N. B. Resistance to natural tick infestation varies with age and coat and hair traits in a tropically adapted beef cattle breed. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 50, 101017, 2024.
- ALI, A.; ZEB, I.; ALOUFFI, A.; ZAHID, H.; ALMUTAIRI, M. M.; ALSHAMMARI, F. A.; ALROUJI, M.; TERMIGNONI, C.; VAZ JR, I. D. S.; TANAKA, T. Host immune responses to salivary components - A critical facet of tick-host interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 809052, 2022.

BARSHTEIN, G.; BEN-AMI, R.; YEDGAR, S. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 5, p. 743-752, 2007.

BENSAOUD, C.; HACKENBERG, M.; KOTSYFAKIS, M. Noncoding RNAs in parasite-vector-host interactions. **Trends in Parasitology**, v. 35, p. 715-724, 2019.

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

CERQUEIRA, A. P. M.; SANTOS, M. C.; DOS SANTOS JÚNIOR, M. C.; BOTURA, M.B. Molecular targets for the development of new acaricides against *Rhipicephalus microplus*: a review. **Parasitology**, v. 149, p. 1019-1026, 2022.

DORGALALEH, A.; DANESHI, M.; RASHIDPANAH, J.; ROSHANI YASAGHI, E. An overview of hemostasis. **Congenital Bleeding Disorders**, v. 1, p. 3-26, 2018.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, p. 22–24, 2013.

HAN, D. K.; ENG, J.; ZHOU, H.; AEBERSOLD, R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 946–951, 2001.

KABAMOTO, S.; BHAGAT, N. A.; SUZUKI, H.; YOU, M.; KAMIO, T.; TSUJI, N.; CLAVERIA, F. G.; NAGASAWA, H.; IGARASHI, I.; TOYODA, Y.; FUJISAKI, K. Comparison of macrophage scavenger receptor-A knockout mice with wild type ones in the immune response against repeated infestation with *Haemaphysalis longicornis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 355-359, 2002.

KELLER, A.; NESVIZHSHKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5383–5392, 2002.

KOBAYASHI, S.; COX, A. G.; HARVEY, K. F.; HOGAN, B. M. Vasculature is getting Hip(po): Hippo signaling in vascular development and disease. **Developmental Cell**, v. 58, p. 2627-2640, 2023.

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

MAIORANO, A. M.; MOTA, T. S.; VERDUGO, A. C.; FARIA, R. A. S.; SILVA, B. P. M.; OLIVEIRA, M. C. S.; CYRILLO, J. N. S. G.; SILVA, J. A. V. Comparative study of cattle tick resistance using generalized linear mixed models. **Brazilian Journal of Biometrics**, v. 37, p. 41-55, 2019a.

MAIORANO, A. M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA, H. N.; CYRILLO, J. N. S. G.; MERCADANTE, M. E. Z.; SILVA, J. A. V. Resistance to the tick *Rhipicephalus microplus* and *Babesia bovis* infection levels in beef heifers raised in an endemic area of Sao Paulo state, Brazil. **Animal Production Science**, v. 59, p. 938-944, 2019b.

MCMANUS, C.; RIBEIRO, R.; SEIXAS, L.; MELO, C.A. A raça Caracu. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268423328_A_Raca_Caracu>. Acesso em: 30 abr. 2024.

MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K. L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes & Development**, v. 30, p. 1-17, 2016.

MERLE, N. S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENIA, L. T. Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 257, 2015.

MIA, M. M.; SINGH, M. K. Emerging roles of the Hippo signaling pathway in modulating immune response and inflammation-driven tissue repair and remodeling. **The FEBS Journal**, v. 289, p. 4061-4081, 2022.

MORÉ, D. D.; CARDOSO, F. F.; MUDADU, M. A.; MALAGÓ-JR, W.; GULIAS-GOMES, C. C.; SOLLERO, B. P.; IBELLI, A. M. G.; COUTINHO, L. L.; REGITANO, C. A. Network analysis uncovers putative genes affecting resistance to tick infestation in Braford cattle skin. **BMC Genomics**, v. 20, 998, 2019.

OBAID, M. K.; ISLAM, N.; ALOUFFI, A.; KHAN, A. Z.; DA SILVA VAZ JR, I.; TANAKA, T.; ALI, A. Acaricides resistance in ticks: Selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 941831, 2022.

ONCUL, S.; AFSHAR-KHARGHAN, V. The interaction between the complement system and hemostatic factors. **Current Opinion in Hematology**, v. 27, p. 341-352, 2020.

HO-TIN-NOÉ, B.; BOULAFALI, Y.; CAMERER, E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. **American Society of Hematology**, v. 131, p. 277-288, 2018.

PEREIRA, D. F. S.; RIBEIRO, H. S.; GONÇALVES, A. A. M.; DA SILVA, A. V.; LAIR, D. F.; DE OLIVEIRA, D. S.; BOAS, D. F. V.; CONRADO, I. D. S. S.; LEITE, J. C.; BARATA, L. M.; REIS, P. C. C.; MARIANO, R. M. D. S.; SANTOS, T. A. P.; COUTINHO, D. C. O.; GONTIJO, N. F.; ARAUJO, R. N.; GALDINO, A. S.; PAES, P. R. O.; MELO, M. M.; NAGEM, R. A. P.; DUTRA, W. O.; SILVEIRA-LEMO, D. D.; RODRIGUES, D. S.; GIUNCHETTI, R. C. *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 13, 101828, 2022.

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

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 5 jan. 2023.

RAZA, A.; SCHULZ, B. L.; NOUWENS, A.; JACKSON, L. A.; PIPER, E. K.; JAMES, P.; JONSSON, N. N.; TABOR, A. E. Serum proteomes of Santa Gertrudis cattle before and after infestation with *Rhipicephalus australis* ticks. **Parasite Immunology**, v. 43, e12836, 2021.

RAZA, A.; SCHULZ, B.; NOUWENS, A.; NASEEM, M. N.; KAMRAN, M.; VALDIVIESO, E. F. M.; KERR, E. D.; CONSTANTINOIU, C.; JONSSON, N. N.; JAMES, P.; TABOR, A. E. Application of quantitative proteomics to discover biomarkers for tick resistance in cattle. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 1091066, 2023.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018.

SCHÖN, M. P. The tick and I: Parasite-host interactions between ticks and humans. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 20, p. 818-853, 2022.

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

TABAN, Q.; MUMTAZ, P. T.; MASOODI, K. Z.; HAQ, E.; AHMAD, S. M. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. **Cell Communication and Signaling**, v. 20, 2, 2022.

TINTUT, Y.; DEMER, L. L. Effects of bioactive lipids and lipoproteins on bone. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, p. 53-59, 2014.

TURNER, S. P.; CANOZZI, M. E. A.; FERGUSON, D. Welfare of beef cattle in extensive systems. **Animal Welfare**, v. 23, p. 125-163, 2023.



VLASOVA, A. N.; SAIF, L. J. Bovine immunology: Implications for dairy cattle. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 643206, 2021.

WANG, H.-H.; CORSON, M. S.; GRANT, W. E.; TEEL, P. D. Quantitative models of *Rhipicephalus (Boophilus)* ticks: historical review and synthesis. **Ecosphere**, Washington, v. 8, e01942, 2017.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Australian Journal of Entomology**, v. 9, p. 171-182, 1970.

ZHONG, Z.; JIAO, Z.; YU, F. X. The Hippo signaling pathway in development and regeneration. **Cell Reports**, v. 43, 113926, 2024.