

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Perfil laboratorial longitudinal de bezerros com anaplasrose
experimental**

**Belo Horizonte
2018**

Isabela Oliveira Melo

Perfil laboratorial longitudinal de bezerros com anaplasmoses experimental

Dissertação apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2018

Melo, Isabela Oliveira, 1991.
M528p Perfil laboratorial longitudinal de bezerros com anaplasmosse experimental / Isabela Oliveira Melo – 2018.

85p.: il.

Orientador: Antônio Ultimo de Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Bovino - Doenças – Teses - 2- Bezerro – Doenças – Teses – 3 – Anaplasmosse- Teses

Escola de

I - Carvalho, Antônio Ultimo de – II – Universidade Federal de Minas Gerais,
Veterinária – III – Título.

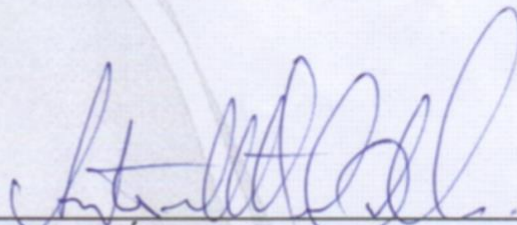
CDD – 636.0894

FOLHA DE APROVAÇÃO

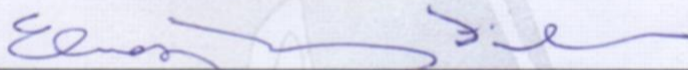
ISABELA OLIVEIRA MELO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINARIA.

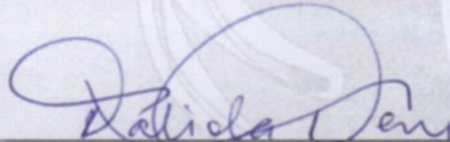
Aprovada em 08 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



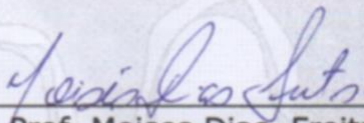
Prof. Antônio Último de Carvalho
Presidente - Orientador



Prof. Elias Jorge Facury Filho
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Moises Dias Freitas
Universidade Federal da Bahia - UFBA



Dedico este trabalho aos meus pais,
Pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades maravilhosas proporcionadas, por cuidar de mim com tanto carinho e amor.

Ao meu pai, Silvestre pelo incentivo desde criança, pelo amor incondicional, por todo carinho e ensinamentos, por ser um exemplo de profissional e de caráter.

À minha mãe, Márcia pelo apoio, pelo suporte, pelo cuidado, pelo carinho, pelo amor incondicional e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Olívia e Pedro, pelo companheirismo, pelo apoio e amor.

Ao meu amor, Paulo Henrique pelo apoio, carinho, paciência, amor e companheirismo.

Aos membros da família Oliveira e Melo pelo incentivo.

Aos meus avós, Dulce e Vicente pelo amor, carinho e orgulho de me ter como neta.

Ao meu orientador, professor Antônio Último e ao co-orientador professor Elias Facury, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por serem um exemplo como profissionais e como pessoas. Muito obrigada por todo o incentivo!

Aos amigos da Família Ruminantes, em especial, Filipe, José, Layanne, Julia, João, Leandro, Matheus, Rodrigo, Daiane, Guilherme, Gustavo, Joelma, Douglas, Naiara, Rafael, Ronaldo e Thiago.

As companheiras de experimento Letícia e Ayla pelo respeito, amizade, companheirismo e aprendizado.

Aos professores Fabíola Paes Leme, Rodrigo Meneses, Júlia Angélica Gonçalves e Paulo Paes, Nancy pelos ensinamentos e colaboração. Em especial, a professora Fabíola e o professor Rodrigo, pela orientação, paciência, disponibilidade, seriedade e contribuição para este trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, que contribuíram e se dedicaram para o desenvolvimento desse trabalho, em especial Thaís, Gustavo, Laís, Luana, Markus, Antônio, Daniel, Bernardo, Vitória e Wesley. Muito obrigada por cada apoio e seriedade com a pesquisa.

Aos amigos da Patologia Clínica que tantas vezes me ajudaram e pela amizade, em especial ao Marco Tulio, Priscila, Manuela, Maria Gabriela, Lai, Thiago e Luiza.

Ao funcionário Pedrinho, pelo cuidado com os animais, pela disposição, pelo bom humor e pelo companheirismo.

Aos velhos amigos, pela compreensão da ausência em diversos momentos em especial a Hadassa, Renata, Mariana e Dayanna.

Aos amigos da veterinária que mesmo depois de todos formados são companheiros para a vida toda, em especial a Ana Fraiha, Lucas Braga, Joilson, Raphael Mattoso, Tayanne, Thais, Willian, Fernanda, Celina, Bruna, Manuela e Luiza.

À Escola de Veterinária da UFMG, aos funcionários e professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Ao colegiado de pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos animais por todo o aprendizado, em especial aos bezerros que participaram deste experimento. Espero que os frutos desse trabalho sirvam em benefício de muitos outros animais.

“Não é o crítico que conta; não o homem que aponta como o homem forte tropeça, ou onde o executor de ações poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está realmente na arena, cuja face está manchada pela poeira, suor e sangue; que se esforça valentemente; que erra, que “quase chega lá” repetidamente, porque não há nenhum esforço sem erro ou falha;

Mas quem realmente se esforça para fazer as obras, quem conhece grande entusiasmo, e grande devoção; que se consome numa causa digna; que, no melhor dos casos, conhece no final o triunfo das grandes realizações e que, na pior das hipóteses, se falhar, pelo menos falhará tendo ousado muito, de modo a que o seu lugar nunca estará com aquelas almas frias e tímidas que não conhecem a vitória ou a derrota.”

Theodore Roosevelt

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	16
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUÇÃO	16
4. OBJETIVOS	18
4.1. Geral	18
4.2. Específico	18
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
5.1. <i>Anaplasma marginale</i>	19
5.1.1. Distribuição, epidemiologia e fatores de risco	19
5.1.2. Transmissão e ciclo biológico	20
5.1.3. Patogenia e manifestações clínicas.....	23
5.2. Parâmetros Hematológicos	25
5.2.2. Leucograma	27
5.3. Homeostase dos líquidos corporais e eletrólitos.....	28
5.4. Equilíbrio ácido-base e fisiologia da regulação do pH corporal	30
5.5. Parâmetros bioquímicos	33
5.5.1. Glicose	33
5.5.2. Lactato	34
5.5.3. Ureia e Creatinina.....	35
5.5.4. Proteína total sérica, albumina e fibrinogênio	36
6. MATERIAL E MÉTODOS	37
6.1. Aprovação pelo comitê de ética.....	37
6.2. Local e período experimental	37
6.3. Animais experimentais	37
6.4. Grupos experimentais	39
6.5. Inóculos de <i>Anaplasma marginale</i>	40
6.6. Protocolo experimental.....	40
6.7. Coleta de amostras.....	40
6.8. Armazenamento e processamento laboratorial.....	42
6.9. Análise estatística:	43

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
7.1. Período pré patente, patente e convalescente	43
7.2. Temperatura.....	45
7.3. Riquetsemia	49
7.4. Eritrograma.....	51
7.5. Leucograma	58
7.6. Equilíbrio Eletrolítico	61
7.7. Equilíbrio Ácido-básico.....	62
7.8. Lactato	66
7.9. Uréia e creatinina.....	66
7.10. Glicose	68
7.11. Proteína plasmática total, albumina e fibrinogênio	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
9. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da <i>A. marginale</i> no hospedeiro bovino e em carrapatos.....	22
Figura 2. Instalações das baias coletivas e do sistema tie stall onde os animais foram alocados.	39
Figura 3. Instalações tipo free stall na fazenda onde os nascimentos dos bezerros ocorriam, localizada no município de Inhaúma-MG.	38
Figura 4. Inoculação na dose de 2 ml contendo 10 ⁸ hemácias parasitadas com <i>A. marginale</i> UFMG1 por via intravenosa.	39
Figura 5. Linha do tempo das coletas para hemograma e bioquímica	41
Figura 6. Linha do tempo das coletas para hemogasometria.....	42
Figura 7. Dinâmica da média e desvio padrão da temperatura retal de bezerros do grupo inoculado com <i>A. marginale</i> (GI) e do grupo controle (GC) durante o período pré patente (PPP).. ..	47
Figura 8. Dinâmica da média da temperatura retal do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).. ..	47
Figura 9. Dinâmica da média e desvio padrão da temperatura retal e do Hematócrito do grupo inoculado. (GI) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	49
Figura 10. Dinâmica da riquetsemia média e desvio padrão do grupo inoculado com <i>A. marginale</i> e do grupo controle (GC) durante o período pré inoculação e período pré patente (PPP)	50
Figura 11. Dinâmica da riquetsemia média e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).. ..	50
Figura 12. Dinâmica do hematócrito e da riquetsemia média do grupo inoculado durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).....	51
Figura 13. Dinâmica da média e desvio padrão do volume globular (VG) do GI com <i>A. marginale</i> (UFMG1) e GC durante o período pré inoculação e pré patente (PPP) em bezerros com idade entre 90 a 120 dias.	52
Figura 14. Dinâmica do volume globular (VG) médio e desvio padrão de bezerros com 90 a 120 dias de vida do grupo inoculado com <i>A. marginale</i> UFMG1 (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (pat) e período convalescente (cov).....	53
Figura 15. Dinâmica da contagem de hemácias média e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).....	54
Figura 16. Dinâmica do volume corpuscular médio (VCM) e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).....	55
Figura 17. Dinâmica da média e desvio padrão da hemoglobina do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período pré inoculação e pré patente (PPP) em bezerros com idade entre 90 a 120 dias.....	56

Figura 18. Dinâmica da média e desvio padrão das concentrações da hemoglobina do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).....	57
Figura 19. Dinâmica das médias e desvio padrão das concentrações de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	57
Figura 20. Dinâmica da média e desvio padrão da contagem de leucócitos totais do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%)..	59
Figura 21. Dinâmica da média e desvio padrão das células mistas do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).	59
Figura 22 Dinâmica da média e desvio padrão dos neutrófilos segmentados do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	60
Figura 23 Dinâmica da média e desvio padrão da neutrófilos segmentados do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	60
Figura 24. Dinâmica da médis e intervalo de confiança do pH sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	63
Figura 25. Dinâmica da média e intervalo de confiança da pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO ₂) sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	64
Figura 26. Dinâmica das concentrações de bicarbonato (HCO ₃ ⁻) sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	65
Figura 27. Dinâmica das concentrações da uréia sérica em bezerros com 90 a 120 dias de vida do grupo inoculado com <i>A. marginale</i> -UFMG1 (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%).....	68
Figura 28. Dinâmica das médis e intervalo de confiança das concentrações de glicose sanguínea do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	69
Figura 29. Dinâmica das concentrações médias e intervalo de confiança da albumina sérica do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	71
Figura 30. Dinâmica das concentrações de proteína sérica total do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média (M) e desvio padrão da temperatura retal (Temp.) durante o período de patência e período de convalescência dos bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> e do grupo controle.....	48
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão (DP) da riquetsemia durante o período de patência (pat) e período de convalescência (cov) de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG1 de <i>Anaplasma marginale</i>	49
Tabela 3. Média (M) e desvio padrão dos Volume globular (VG)), contagem médias de hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> e dos bezerros do grupo controle.....	52
Tabela 4. Média (M) e desvio padrão dos leucócitos totais (WBC), linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$ e %) e células mistas ($10^3/\mu\text{L}$ e %) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> e dos bezerros do grupo controle.....	58
Tabela 5. Média (M) e desvio padrão das concentrações séricas de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloretos (Cl^-) e cálcio ionizado (Ca^{++}) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> e dos bezerros do grupo controle.....	61
Tabela 6. Concentrações médias e desvio padrão (DP) de pH, da pressão de gás carbônico (PaCO_2), de dióxido de carbono total (TCO_2), bicarbonato (HCO_3^-) sanguíneos durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> e bezerros do grupo controle.....	63
Tabela 7. Concentrações médias (M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas de lactato (Lact) durante o período de patência(Pat) e período convalescência (Cov) de bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> (GI) e dos bezerros do grupo controle(GC).	66
Tabela 8. Concentrações médias(M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas da uréia e creatinina (CRT) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%)de bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> (GI) e bezerros do grupo controle(GC).	67
Tabela 9. Concentrações médias(M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas de glicose durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) de bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> (GI) e de bezerros do grupo controle (GC).....	68
Tabela 10. Concentrações médias (M) e desvio padrão (DP) das concentrações sanguíneas de proteína sérica total, albumina (Alb) e fibrinogênio (Fib) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) de bezerros inoculados com <i>A. marginale</i> (GI) e grupo controle(GC).	70

LISTA QUADROS

Quadro 1. Alteração dos componentes primários do equilíbrio ácido-base e suas respostas compensatórias.....	33
Quadro 2. Valores de referência do estado ácido-base, eletrólitos e bioquímica séricos em bovinos adultos.	37
Quadro 3. Valores médios do período (em dias) após a inoculação que os animais apresentaram o início da riquetsemia, queda (PP) do VG (80, 60, 40% pat) e recuperação (CV) do VG (60 e 80% cov) e o tempo em dias do PPP, PP, CV de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG1 de Anaplasma marginale.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

80% pat	80% de patência
80% cov	80% de convalescência
60% pat	60% de patência
60% cov	60% de convalescência
40% pat	40% de patência
%	porcentagem
Alb	Albumina
ADH	hormônio antidiurético
ALT	alanina aminotransferase
Anion Gap – AG	diferença Aniônica
AST	aspartato aminotransferase
BE	excesso de Bases
Ca ⁺⁺	Concentração do cálcio ionizado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular
média	
Cl ⁻	Cloreto
CRT	Creatinina
CV	Período convalescente
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	hormônio eritropoietina
Fib	Fibrinogênio
GC	grupo controle
GGT	gama glutamil transpeptidase
GI	grupo inoculado
HCO ₃ ⁻	pressão de bicabornato
HGB	hemoglobina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IM	intramuscular
IV	via intravenosa
K ⁺	concentração de potássio
LEC	líquido extracelular
LIC	líquido intracelular
Na ⁺	concentração de sódio
nPCR	testes moleculares de nested PCR
NaCl 0,9%	solução salina
PaCO ₂	pressão parcial de gás carbônico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PP	período patente
PPP	período pré patente
PT	Proteína total sérica
PTH	Paratormônio

PV	Peso vivo
RBC	Contagem total de hemácias
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
TCO ₂	pressão do dióxido de carbono total
TR	temperatura retal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG1	Cepa de <i>A. marginale</i> com apêndice
UFMG2	Cepa de <i>A. marginale</i> sem apêndice
UFMG3	Cepa de <i>A. marginale</i>
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular
WBC	Contagem de leucócitos totais

RESUMO

A sobrevivência dos animais acometidos com *Anaplasma marginale* depende de sua capacidade de manter o equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-base. Objetivou-se avaliar o comportamento do perfil hidroeletrólítico e ácido-base durante a fase de patência e convalescência de bezerros inoculados com *A. marginale*. Foram utilizados 12 bezerros machos, com idade de 3 a 4 meses. Os animais foram divididos em grupo inoculado (n=6) com 10⁸ hemácias parasitadas com isolado de UFMG1 de *A. marginale*, por via intravenosa (IV) e grupo controle (n=6). Os animais foram avaliados nos períodos pré patente e no período patente quando o volume globular(VG) reduziu para 80, 60 e 40% do VG basal. A avaliação foi realizada também no período convalescente quando o VG recuperou para 60 e 80 % do VG basal. Foram avaliados o hemograma, o perfil ácido-base, eletrolítico e bioquímico. Para testar as diferenças entre os grupos, ajustou-se um modelo de regressão de efeitos mistos utilizando software estatístico R com nível de significância de 0,05 ($P \leq 0,05$). Durante a fase de patência da anaplasmose ocorreu anemia grave, resultando em alcalose respiratória, com aumento do pH sanguíneo e redução da pressão de gás carbonico. A anaplasmose não influenciou o perfil hidroeletrólítico durante a fase de patência e convalescência.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*; bovinos; equilíbrio; energético; gasometria; hematologia, minerais; pH

ABSTRACT

The survival of animals infected by *Anaplasma marginale* depends on its capacity to maintain the hydroelectrolytic and acid-base equilibrium. The objective of this work was to evaluate the behavior of the hydroelectrolytic and acid-base profile during the phases of patency and convalescence in calves affected by anaplasmosis. In this experiment, 12 male calves were used, aged between 3 and 4 months. The animals were divided into two groups: One inoculated (n=6) with 10⁸ erythrocytes containing the isolate UFMG1 of *A. marginale*, administered intravenously (IV) and the control group (n=6). The animals were evaluated in the pre-patency and patency period when the packed cell volume (PCV) decreased to 80, 60 and 40% of the baseline value. The evaluation was also performed in the convalescence period in which the VG recovered to 60 and 80% of the baseline value. The hemogram, acid-base, hydroelectrolytic and biochemical profile were evaluated. To test the differences between groups, a model of mix effects was adjusted using a statistical software R with a level of significance of 0,05 ($p \leq 0,05$). During the phase of patency, a severe anemia happen leading to respiratory alkalosis, with increased blood pH and reduction of PCO₂. The anaplasmosis had no influence in the hydroelectrolytic profile in neither patency nor convalescence phase.

Key words: *Anaplasma marginale*; balance; cattle; energetic; gasometry; hematology, minerals; pH

INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina é uma doença infecciosa causada por uma riquetsia intraeritrocitária, a *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). A anaplasmosse ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, mas também é relatada em algumas regiões temperadas (OIE, 2016). Essa doença é associada à grandes perdas na bovinocultura devido ao baixo ganho de peso, a redução na produção de leite, ao aborto, aos custos dos tratamentos e a mortalidade dos animais. Na América Latina as perdas econômicas anuais causadas pela anaplasmosse variam de US\$ 800 a 875 milhões (Kocan et al., 2003).

Na América do Sul essa riquetsia é transmitida pelo carrapato monoxênico *Rhipicephalus microplus*, por insetos hematófagos, por fômites contaminados e pela transmissão vertical (Guglielmone, 1995; Kocan et al., 2003; Gonçalves et al., 2005). Os principais sinais clínicos da doença consistem em anemia, icterícia, pirexia, fadiga, lacrimejamento, anorexia, perda de peso e aumento da frequência cardíaca e respiratória dos animais acometidos (Ristic, 1981; Vidotto e Marana, 1999; Coelho, 2007).

O curso da doença pode ser dividido didaticamente em quatro fases. A primeira fase consiste no período pré patente, que decorre entre a penetração da riquetsia até a primeira observação de hemácias parasitadas nos esfregaços sanguíneos. A duração dessa fase varia de 20 a 40 dias. Após este período, inicia-se o período de patência (segunda fase) que se estende até o momento em que é observado os menores valores de hematócrito do animal, essa fase tem duração média de 15 dias (Vidotto e Marana, 1999). A terceira fase é o período de convalescência, que é a fase de recuperação do animal e tem duração de dois meses. Na quarta fase, o animal torna-se portador assintomático e tem níveis baixos de riquetsemia que podem ser observados por meses ou anos (Coelho, 2007).

Coelho (2007) demonstrou que existe correlação negativa entre a riquetsemia e o hematócrito do animal infectado. No entanto, é esperado anemia progressiva devido a riquetsemia e consequente destruição extravascular dos eritrócitos no baço e na medula óssea (Thrall, 2004).

Na progressão da enfermidade observa-se que o número de células eliminadas pode ser maior do que o número de células infectadas. Ocorre fagocitose de eritrócitos infectados e não infectados devido a presença de imunoglobulinas que estimulam a destruição imunomediada dos eritrócitos não parasitados pelas células do sistema mononuclear fagocitário (Ristic et al., 1972). Isto sugere que a opsonofagocitose pode tanto limitar a propagação da riquetsia, quanto contribuir para a anemia grave que caracteriza a doença (Jain, 1986; Melendez, 2005).

As alterações decorridas da destruição maciça de hemácias e da redução da capacidade de transporte de O₂ e CO₂ causa à hipóxia tecidual. O que pode resultar em produção de ácido láctico e liberação de produtos originados da lise celular. Por conseguinte, provocam alterações no equilíbrio eletrolítico e ácido-base (Coelho, 2007; Prieto-Callejero et al., 2012, Kamal e Hussam, 2013).

A sobrevivência do animal depende da capacidade de resposta fisiológica compensatória que o indivíduo desenvolve para regular o desequilíbrio ácido-base e a anemia (Allen e Kutler, 1981).

Nesse contexto, o estudo do perfil ácido-base e hidroeletrólítico durante as fases das manifestações clínicas da doença (patência) e na recuperação do animal (convalescência) é de suma importância para determinar o prognóstico dos animais acometidos. Além disso, serve como base teórica para posteriores pesquisas que visem avaliar novas terapias de suporte para minimizar a gravidade das alterações clínicas causadas em bezerros com anaplasnose.

OBJETIVOS

1.1. Geral

Avaliar o comportamento do perfil hidroeletrólítico e ácido-base durante a fase de patência e convalescência em bezerros inoculados com *A. marginale*.

1.2. Específico

Avaliar nas diferentes fases da anaplasnose induzida por inoculação experimental em bezerros, os seguintes parâmetros sanguíneos:

- ✓ Hemograma;
- ✓ pH;
- ✓ Pressão de gás carbônico;
- ✓ Dioxido de carbono total;
- ✓ Bicarbonato de sódio;
- ✓ Sódio;
- ✓ Potássio;
- ✓ Glicose;
- ✓ Cálcio ionizado;
- ✓ Lactato;
- ✓ Íon Cloreto;
- ✓ Proteína total;
- ✓ Albumina;
- ✓ Fibrinogênio;
- ✓ Uréia;
- ✓ Creatinina.

REVISÃO DE LITERATURA

1.3. *Anaplasma marginale*

A anaplasose bovina foi primariamente descrita por Arnold Theiler em 1910, na África do Sul. Theiler (1910) inicialmente reconheceu “pontos marginais” no interior dos eritrócitos de lâminas coradas, causando uma doença específica em bovinos. Em 1911 esse pesquisador observou o mesmo corpúsculo no centro do eritrócito e o identificou como *A. centrale*, sendo uma variação menos patogênica do *A. marginale* (Theiler, 1911).

Theiler atribuiu o nome científico *A. marginale* baseando-se nas características de sua coloração e localização. Dessa forma, “*Anaplasma*” foi referido a ausência de citoplasma e “*marginale*” indicando a localização periférica no interior da hemácia (Theiler, 1910).

Os organismos atribuídos à ordem das Rickettsiales foram reclassificados com base nas análises genéticas (Dumler et al., 2001), e após essa reclassificação a *Anaplasma marginale* passou a fazer parte da família Anaplasmataceae. A *Anaplasma marginale* é uma bactéria intra-eritrocitária, que é encontrada exclusivamente em vacúolos ligados à membrana do citoplasma da célula hospedeira. Além disso, são bactérias que se multiplicam em organismos vertebrados e invertebrados (Dumler et al., 2001; Kocan et al., 2010).

Esses vacúolos parasitóforos são vistos em microscopia óptica e apresentam-se morfológicamente como corpúsculos de inclusão densos, com coloração roxo-azulados, homogêneos, com formato esférico medindo de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro. Esses corpúsculos são compostos por uma a oito subunidades denominadas de corpúsculos iniciais. Esses corpúsculos são visíveis na microscopia eletrônica e medem de 0,3 µm a 0,4 µm de diâmetro e representam as unidades infectantes (Wanduragala e Ristic, 1993; Ribeiro e Passos, 2002).

1.3.1. Distribuição, epidemiologia e fatores de risco

A anaplasose ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, mas também é relatado em algumas regiões temperadas (OIE, 2015). Essa doença é endêmica na África, na Ásia, na Europa (países do mediterrâneo), no sul dos Estados Unidos e na maioria dos países da América Central e do Sul, com exceção das áreas de deserto e de elevadas altitudes (Guglielmone, 1995; Kocan et al., 2003).

Nos próximos anos, é esperado mudanças na distribuição mundial da anaplasose devido ao aquecimento global e a influência do movimento dos animais livres que hospedam o carrapato infectado (Kocan et al., 2010). No período dos anos 2000 a 2009 a anaplasose foi diagnosticada em rebanhos bovinos de várias regiões do Canadá, porém antes dessa época este país era considerado livre da doença (Howden et al., 2010). Com isso, aumentou a preocupação com a forma de transmissão de agentes infecciosos entre animais de vida livre e da pecuária doméstica, sobretudo em áreas onde os animais domésticos têm contato com os animais selvagens (Chomel et al., 1994; Kocan et al., 2010).

A anaplasmoze bovina encontra-se na lista da *Office International des Epizooties* (OIE, 2017) devido ao impacto significativo na saúde dos animais domésticos e pela alta ocorrência e gravidade dos sinais clínicos, incluindo perdas diretas de produção e de mortalidade.

A doença clínica é mais elucidada em bovinos, porém outros ruminantes como búfalos, bisões, antílopes e cervos podem se infectar persistentemente com *A. marginale* (Kocan et al., 2003).

Cada região pode ser classificada de forma epidemiológica, como área de estabilidade ou instabilidade enzoótica (Jonsson et al., 2008). Utilizando como modelo a babesiose, mas que pode ser válido para anaplasmoze, Mahoney e Ross (1972) descreveram estabilidade enzoótica como uma condição em que ocorre uma alta incidência de animais infectados, mas raramente há a doença clínica (Mahoney e Ross, 1972). Essa situação costuma ocorrer quando a quantidade de vetores são numerosos e os animais possuem a idade de até 9 meses de idade. Uma vez que nessa fase os bezerros conseguem eliminar a doença e ao mesmo tempo desenvolver uma resposta imunológica. Por outro lado, a instabilidade enzoótica ocorre quando há pouca exposição dos bezerros nos primeiros meses de vida aos vetores e conseqüentemente a maioria dos animais se infectam após os 9 meses. Com isso, torna-se frequente a observação de quadros clínicos graves da doença e os altos índices de mortalidade (Mahoney e Ross, 1972; Madruga et al., 1985).

Os estudos sorológicos são importantes para determinar o risco da doença por caracterização epidemiológica do rebanho. A soroprevalência em países das Américas apresenta grande variedade, o que leva a formação de regiões de estabilidade e instabilidade enzoóticas (Kocan et al., 2003). No Brasil, Ribeiro e Reis (1981) verificaram alta prevalência da anaplasmoze em quatro regiões de Minas Gerais: no Alto Paranaíba, na Zona Metalúrgica, no Sul de Minas e no Triângulo Mineiro. Souza *et al.* (2000) também observaram alta prevalência no Norte Fluminense (Rio de Janeiro). Na região do semiárido da Bahia, Barros *et al.* (2005) verificaram alta prevalência de animais sorologicamente positivos. Na região de Araguaína no Tocantins verificou-se 89,9% de animais positivos (Trindade et al., 2011). No sul do país, Andrade et al. (2001) também demonstraram que 92,94% dos animais eram soropositivos na região de Londrina, no estado do Paraná. No entanto, na região Noroeste e Centro oeste do Paraná, Marana et al. (2009) relataram prevalência menor (58,74%) dos animais reagentes à *A. marginale*. Esse quadro sugere instabilidade enzoótica. Além disso, a condição de instabilidade enzoótica foi observada nas regiões climáticas árida, semiárida, de transição semiárida e subsumida do Sergipe (Oliveira et al., 1992). Possivelmente a baixa prevalência nessas áreas se deve às condições adversas de temperatura e umidade que podem afetar o ciclo de vida dos vetores.

1.3.2. Transmissão e ciclo biológico

Existem três formas de transmissão do *Anaplasma marginale* para o hospedeiro suscetível, sendo elas a mecânica, a vertical e a biológica.

A transmissão mecânica ocorre através da transferência de hemácias infectadas para os bovinos susceptíveis sem que haja multiplicação do *A. marginale* no vetor. Essa transmissão ocorre pela picada de insetos hematófagos ou por meio de fômites contaminados com sangue, tais como as agulhas, os brincos, as argolas nasais, os materiais cirúrgicos e os tatuadores (Kocan et al., 2003; Aubry e Geale, 2011). Tem sido relatado que a principal via de transmissão mecânica da anaplasmose é feita por insetos hematófagos como os dípteros do gênero *Tabanus* e *Stomoxys* e os mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* (Ewing, 1981; Foil, 1989). Essa transmissão é a principal via de disseminação da riquetsia em regiões da África, da América Central e da América do Sul. Uma vez que, nesses locais não há carrapatos transmissores da anaplasmose (Ewing, 1981; Foil, 1989) ou são regiões em que o *Rhipicephalus microplus* não parece ser o principal vetor (Figuerola et al., 1998; Coronado, 2001).

Na transmissão vertical o *Anaplasma marginale* pode ser transmitido da vaca infectada para o feto via placenta durante a gestação (Aubry e Geale, 2011). A imunossupressão transitória de vacas no periparto possivelmente é uma das causas que favorecem essa forma de transmissão (Silva e Fonseca, 2014). Em áreas endêmicas no estado de Minas Gerais a transmissão vertical apresentou frequência de 10% em bezerros neonatos (Meneses, 2013). Portanto, essa transmissão pode contribuir para a epidemiologia da anaplasmose em algumas regiões (Kocan et al., 2003).

A transmissão biológica ocorre através dos carrapatos, após a ingestão de eritrócitos infectados pela riquetsia. Mais de 20 espécies de carrapatos são elucidadas como vetores biológicos de *A. marginale* no mundo. Os principais gêneros de carrapatos envolvidos na transmissão biológica são o *Rhipicephalus* spp., o *Dermacentor* spp. e o *Ixodes ricinus*, enquanto que o *Amblyomma* spp. demonstrou não estar envolvido na transmissão. (revisado por Kocan et al., 2004). O *Rhipicephalus microplus* é considerado a espécie transmissora de *A. marginale* no Brasil (Guglielmone, 1995; Ribeiro e Lima, 1996).

A transmissão biológica pode ocorrer por três vias, a transestadial, a intraestadial e a transovariana. Na via transestadial, a transmissão do *A. marginale* ocorre entre os estágios de desenvolvimento do carrapato, ou seja, quando a ninfa cai do hospedeiro se transforma em adulto e vai para outro hospedeiro. Na via intraestadial a transmissão do *A. marginale* ocorre no estágio de desenvolvimento em que o aracnídeo está. Além desses, há a transmissão transovariana, que consiste na passagem do *A. marginale* presente na teleógena para sua prole, porém essa via de transmissão tem pouca relevância (Stich et al., 1989; Ribeiro et al., 1996). A transmissão intraestadial apresenta-se como uma importante via do *A. marginale*, uma vez que os principais carrapatos que transmitem a anaplasmose possuem um único hospedeiro (monóxenos) como o *R. microplus* e *Dermacentor albipictus*. Nesse sentido, os machos adultos possuem relevância uma vez que eles transitam entre os animais do rebanho mesmo sem ocorrer a mudanças de fase (Kocan et al., 2003).

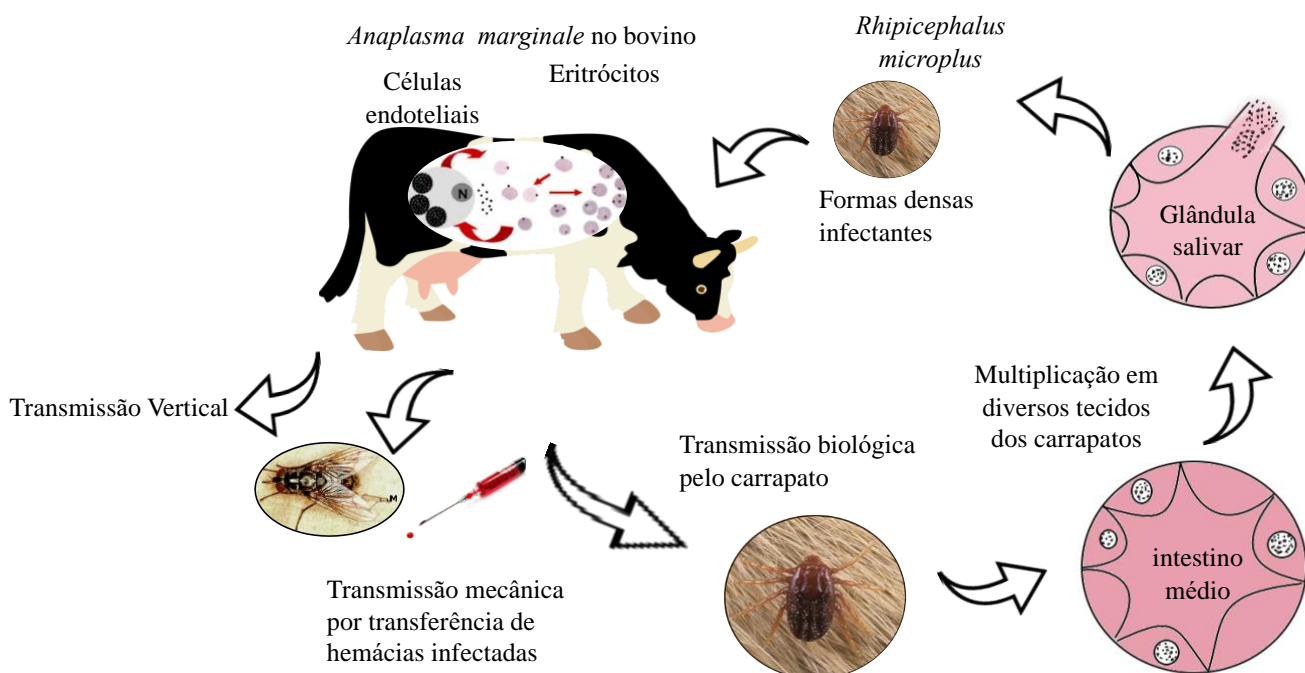
O ciclo biológico de desenvolvimento do *A. marginale* inicia-se quando o carrapato ingere as hemácias infectadas (Fig. 1). Em seguida, essas hemácias alcançam o lúmen intestinal do vetor, onde inicia-se a infecção nas células do intestino. Em seguida, ocorre a multiplicação da riquetsia em muitos outros tecidos do carrapato, incluindo as glândulas

salivares. Estas glândulas, são os locais onde a riquetsia é excretada e transmitida para os hospedeiros durante a alimentação do artrópode (Kocan et al., 2003).

No carrapato primariamente aparecem a forma reticulada (vegetativa) de *A. marginale*. Essas se dividem por fissão binária formando grandes colônias, que podem conter centenas de indivíduos. Posteriormente ocorre mudança da forma reticulada para a forma densa (infectante). Esta é a forma considerada infectante e que pode sobreviver no meio extracelular no hospedeiro por um tempo limitado (Kocan et al., 2003).

As formas densas ao entrarem nos bovinos, penetram as hemácias em um processo chamado rofecitose. Esse processo consiste na invaginação da membrana plasmática das hemácias formando um vacúolo parasitóforo. No interior desses vacúolos, ocorre multiplicação dos corpúsculos iniciais através da fissão binária. Em seguida, os corpúsculos deixam a hemácia por um processo chamado rofecitose reversa, sem provocar ruptura da membrana celular. Enfim, inicia-se um novo ciclo de replicação ao penetrar em outra hemácia. Essa transferência entre as hemácias pode ocorrer através de pontes intercelulares (Ribeiro e Passos, 2002).

Figura 1. Ciclo biológico da *A. marginale* no hospedeiro bovino e em carrapatos.



Fonte: Adaptação de Kocan *et al.* (2003) e Rodríguez *et al.* (2009).

O *A. marginale* é descrito como uma riquetsia intraeritrocitária obrigatória, ou seja, as hemácias são os únicos locais de infecção em bovinos (Kocan et al., 2010). No entanto, alguns pesquisadores elucidaram que as células endoteliais podem ser um outro local da replicação da riquetsia *in vitro* (Munderloh et al., 2004) e *in vivo* (Carreño et al., 2007).

1.3.3. Patogenia e manifestações clínicas

O desenvolvimento da doença pode ser dividido didaticamente em quatro fases (Richey, 1993). A primeira fase é o período pré patente (PPP), que decorre entre a penetração da riquetsia até a primeira observação dos esfregaços sanguíneos com as hemácias parasitadas, esse período tem duração média de 20 a 60 dias (Vidotto e Marana, 1999; Kocan et al., 2003).

A partir da visualização das primeiras hemácias infectadas, segue o período de patência (PP) que se estende até o momento em que se observam os menores valores de hematócrito do animal parasitado. Essa fase possui duração média de 15 dias (Vidotto e Marana, 1999). Nesse momento, ocorrem sucessivos ciclos de invasão e de replicação do *A. marginale*, e os eritrócitos infectados aumentam de forma exponencial (Kocan et al., 2003). Posteriormente os eritrócitos infectados e não infectados são fagocitados pelas células retículo endoteliais esplênicas. Isso resulta no desenvolvimento de anemia branda a grave, e icterícia sem hemoglobinemia e sem hemoglobinúria (Kocan et al., 2003).

Após o término do PP, segue o período de convalescência que se resume na recuperação do animal, e pode ter duração de 2 meses. Neste momento ocorre o reestabelecimento do volume globular e a resolução dos sinais clínicos (Kocan et al., 2003).

Por fim, o animal se torna persistentemente infectado (portador), ou seja, a infecção aguda e a sintomatologia clínica são resolvidas. Contudo, os animais permanecem persistentemente infectados e com baixos níveis de riquetsemia, esses valores variam de 10^2 a 10^7 eritrócitos infectados/mL sanguíneo. (Coelho, 2007; Brown, 2012). Esses valores demonstram que em ambas as infecções são caracterizadas por cargas de antígenos relativamente altas (Brown, 2012). Portanto, os bovinos portadores têm imunidade vitalícia e são resistentes às doenças clínicas ao serem desafiados. No entanto, os bovinos infectados persistentemente servem como reservatórios.

O animal pode manifestar diversas síndromes clínicas da doença, dentre elas as formas: super aguda, aguda e sub clínica (Vidotto e Marana, 2001). As síndromes superagudas são raras, porém na maioria dos casos resulta em morte rápida do animal. A forma branda da doença manifesta-se em animais com até um ano de vida, porém com o passar do tempo torna-se mais severa. Nesse contexto, os bovinos com mais de três anos de vida e sem contato prévio com o agente infeccioso geralmente apresentam a síndrome super aguda a fatal (Ristic, 1968). Os mecanismos que atribuem maior resistência aos bovinos jovens ainda não são bem compreendidos. Algumas hipóteses sugerem que essa resistência se deve a presença de anticorpos colostrais, a maior eritropoiese da medula óssea, a rápida resposta celular e a presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos (Ribeiro e Passos, 2002).

Além disso, a severidade da doença está intimamente associada ao nível e a duração da infecção, que por sua vez, está relacionada à taxa de multiplicação do microrganismo e à habilidade do hospedeiro em debelar a infecção através de sua resposta imune (Waner et al., 2010). Outro ponto importante a ser considerado é a remoção do baço, que torna os bezerros totalmente susceptíveis à infecção. A anaplasmose em bezerros

esplenectomizado são frequentemente mais severas do que a observada em bovinos mais velhos (Kocan et al., 2003).

A forma aguda é caracterizada por uma riquetsemia ascendente em que o *A. marginale* pode atingir 10⁹ hemácias infectadas/mL (PCR quantitativo) e o volume globular (VG) pode reduzir de 30 a 50% do valor normal (Brown, 2012).

Os principais sinais clínicos da forma aguda consistem no desenvolvimento de anemia discreta a intensa, com mucosas hipocoradas, icterícia sem hemoglobinemia e sem hemoglobinúria. Além disso pode ocorrer febre, depressão, anorexia, desidratação, fraqueza, aborto e diminuição da produção de leite (Coelho, 2007; Waner et al., 2010). A intensa hemocaterese causada pela retirada das hemácias infectadas faz com que a bile possa se apresentar espessa, grumosa, de cor amarelada e os tecidos ictericos (Souza et al., 2000). Além disso a intensa anemia pode acarretar em hipóxia e os animais apresentarem taquipnéia e taquicardia (Coelho, 2007; Lasmar, 2010).

Na fase inicial da doença, as alterações clínicas dos animais com anaplasmoses são discretas e só se evidenciam quando a anemia é intensa. No entanto, a temperatura retal demonstrou ser um bom parâmetro de monitoramento dos animais, possibilitando o diagnóstico precoce e o momento ideal para o tratamento antecedendo o momento de queda do VG (Coelho, 2007).

Há evidências que durante a infecção pelo *Anaplasma marginale*, a quantidade de eritrócitos retirados da circulação pode sobrepôr a quantidade de hemácias infectadas (Schroeder and Ristic 1968; Giardina et al., 1993; Coelho, 2007). Isso ocorre em consequência da fagocitose dos eritrócitos infectados e não infectados, devido a presença de imunoglobulinas. Estas são as responsáveis por estimularem a destruição imunomediada dos eritrócitos pelas células do sistema monocítico fagocitário (Ristic et al., 1972; Kieser et al., 1990; Brown e Barbet, 2016). As hemácias alteradas pela infecção induzem uma resposta imune humoral que ao passar pelo sistema monocítico fagocitário são retiradas da circulação a uma taxa de 8 a 10 vezes maior que o normal (Rodríguez et al., 2000). Deste modo, torna-se evidente que riquetsemia não explica completamente a anemia observada e que outros fatores podem estar associados ao desencadeamento do processo de eritrofagocitose (Giardina et al., 1993).

Diversas hipóteses têm sido levantadas para justificar essa destruição imunomediada. Alguns pesquisadores sugerem que a fagocitose ocorre por danos na membrana celular devido ao estresse oxidativo causado pelo metabolismo de *A. marginale* (Nazifi et al., 2008; De et al., 2012). Outra hipótese foi elucidada por Giardina *et al.* (1993) que afirmaram ter encontrado proteínas bacterianas na superfície das hemácias. Por fim, alguns cientistas sugerem que devido ao pequeno tamanho dos corpúsculos, os eritrócitos infectados com apenas um microrganismo são geralmente perdidos pela inspeção na microscopia óptica (Meléndez, 2005).

Em todos os casos é perceptível que a opsonização e a fagocitose pode tanto limitar a propagação da riquetsia quanto contribuir para a anemia grave que caracteriza a doença (Weiss e Wardrop, 2010).

1.4. Parâmetros Hematológicos

A hematologia é importante no diagnóstico e no prognóstico de várias enfermidades que acometem os rebanhos e que repercutem na produção dos animais (Marçal, 1989).

O sangue é o meio pelo qual o organismo transporta as substâncias e os elementos necessários à vida. O sangue é formado por plasma e por três tipos de células: os leucócitos, as hemácias ou eritrócitos e plaquetas (Garcia- Navarro, 2005).

1.4.1. Eritrograma

A principal função do eritrócito é transportar a hemoglobina, que por sua vez carrega o oxigênio para os tecidos (Thrall et al., 2012). Toda a energia gasta nos eritrócitos é para otimizar o fornecimento de energia para os tecidos. Esses gastos são principalmente para a manutenção do formato celular, da estrutura da membrana, das funções enzimáticas e da redução do ferro na hemoglobina (Weiss e Wardrop, 2010). As hemácias são células anucleadas e que possuem a forma de disco bicôncavo com pouca palidez central. A principal diferença das hemácias dos bovinos são a não formação de rouleaux e ao tamanho da célula (Weiss e Wardrop, 2010). A vida média da hemácia bovina pode variar entre 70 e 120 dias nos animais jovens e pode chegar a 160 dias no animal adulto (Kaneko, 1970).

A produção de eritrócitos é regulada pelo hormônio eritropoietina (EPO). Este é produzido principalmente por fibroblastos intersticiais peritubulares do rim em animais adultos. Além disso uma pequena quantidade de EPO é produzida no fígado durante a anemia (Weiss e Wardrop, 2010).

A baixa tensão de oxigênio no tecido induz a expressão do gene da EPO. Quando o indivíduo está com hipóxia grave, a produção de EPO é aumentada até 1.000 vezes (Weiss e Wardrop, 2010). Sob um estímulo anêmico como a perda de sangue, a hemólise ou a gravidez, ocorre aumento da produção de eritrócitos, esse aumento é referido como eritropoiese de estresse. Em bovinos sob esses estímulos ocorre a liberação de eritrócitos imaturos na circulação, esses eritrócitos são chamados de pontilhados biofílicos ou reticulócitos de estresse (Thrall et al., 2012; Harvey, 2012).

Aproximadamente quatro dias são necessários para que o animal anêmico aumente os reticulócitos sanguíneos (Harvey, 2012).

Os principais parâmetros avaliados no eritrograma são: o hematócrito, a contagem total de hemácias (RBC), a concentração de hemoglobina (HGB), o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O hematócrito ou volume globular (VG) é a escolha para a triagem dos animais, pois a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina são genericamente proporcionais ao VG do indivíduo. Além disso, o VG possui uma alta acurácia. O valor do VG é a proporção de hemácias no sangue total e é indicado em porcentagem. Desta forma, o VG é um indicador da anemia, do grau de desidratação, e de forma indireta indica a capacidade de transporte de O₂. Ademais, a coloração do plasma permite ser um indicativo de icterícia, de hemólise e de lipemia. O principal fator que causa o aumento do VG é a desidratação. Enquanto que as principais causas da redução do VG são as

anemias, que podem ser causadas por hemólise, por hemorragia, por não responsividade medular ou por deficiência de Fe (Schalm's, 2010; Thrall et al., 2012). Os valores normais de hematócrito variam entre 24 e 46% nos bovinos (Radostits, OTTO M. et al., 2007).

A molécula de hemoglobina (HGB) ocupa um papel central na fisiologia através da ligação, transporte e entrega de oxigênio aos tecidos. A hemoglobina é sintetizada juntamente com o desenvolvimento dos eritrócitos. Quando as hemácias envelhecem ocorre hemólise extravascular, onde essas são fagocitadas por macrófagos esplênicos. A HGB é catabolizada no interior do macrófago, onde é liberada e clivada em uma fração protética (globina) e em uma fração heme. A globina é incorporada ao conjunto de proteínas plasmáticas. Por outro lado, a fração heme passa por sucessivas clivagens até a formação de ferro. O ferro é oxidado na forma férrica (Fe^{+3}), e é liberado e transportado como transferrina para ser armazenamento como hemossiderina ou ferritina no fígado e medula óssea para posterior reutilização. Quando ocorre hemólise intravascular, a HGB é liberada para a circulação em sua forma livre. Essa HGB é rapidamente eliminada por vários mecanismos. O mais importante é a ligação de HGB livre à haptoglobina, seguida da depuração do complexo pelos macrófagos. Quando há excesso de hemólise intravascular, de tal forma que a capacidade de ligação da haptoglobina plasmática é excedida, a HGB pode ser eliminada através de filtração glomerular. Neste caso, a hemoglobinúria pode ocorrer, ou as células tubulares renais proximais podem catabolizar essa hemoglobina (Weiss e Wardrop, 2010; Kerr, 2002).

A presença do corpúsculo de Heinz e a lipemia podem interferir e podem resultar em valores falsamente aumentados (Harvey, 2012). Além disso, a hemólise pode aumentar a concentrações da hemoglobina total e da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os valores de referência da hemoglobina para os bovinos variam entre 8 a 15 g/dL (Radostits, OTTO M. et al., 2007).

A determinação da concentração das hemácias (RBC) apresenta um elevado grau de erro e por isso deve ser interpretada em conjunto com os outros parâmetros. Sua principal função é a determinação dos índices eritrocitários (Kerr, 2002).

1.4.2. Índices hematimétricos

O volume corpuscular médio (VCM) se refere ao tamanho das hemácias e seu cálculo é baseado na razão do VG pelo RBC. Quando o VCM apresenta dentro dos limites dos valores normais para a espécie, o indivíduo é classificado como normocítico. Quando está acima dos valores de referência é considerado macrocítico. Essa alteração geralmente está relacionada com as hemácias imaturas na circulação. Caso os valores estejam abaixo dos limites de referência é considerado microcítico, e nesses casos a causa mais comum é a deficiência de ferro (Kerr, 2002; Schalm's, 2010; Thrall et al., 2012). Os valores de referência para os bovinos adultos encontram-se entre 40 a 60 fL (Weiss e Wardrop, 2010)

A hemoglobina corpuscular média (CHCM) é a concentração média de HB em um dado volume de hemácias. Ela é calculada pela razão da HB pelo VG. Esse índice possui elevada acurácia por não ser dependente do RBC. O animal é classificado como normocrômico quando os valores estão dentro dos limites normais para a espécie. Quando

o animal apresenta CHCM menor que os valores de referência, ele é classificado como hipocrômico. Essa anormalidade pode ocorrer quando há aumento de hemácias imaturas na circulação, uma vez que essas ainda não alcançaram a concentração máxima de hemoglobina. A hipercromia não ocorre fisiologicamente. O aumento do CHCM está associado a hemólise e resulta na liberação de hemoglobina para o plasma. Além disso, esse aumento pode ser devido a interferência da leitura da HB por icterícia, lipemia, metarrubricitos, corpúsculo de Heinz e outros (Kerr, 2002; Weiss e Wardrop, 2010). Nos bovinos adultos os valores de referência para CHCM estão entre 30 a 36 g/dL (Weiss e Wardrop, 2010).

O VCM e o CHCM são os dois índices mais utilizados na medicina veterinária, porém devem estar associados aos valores de RBC, da HB e do VG (Kerr, 2002).

1.4.3. Leucograma

A interpretação das respostas dos leucócitos permite um diagnóstico, monitoramento e prognóstico de doenças. Nos bovinos a contagem de leucócitos totais (WBC) podem variar pouco, mesmo em infecções que causam inflamações agudas. Por isso torna-se importante a contagem diferencial para auxiliar no diagnóstico das doenças inflamatórias. (Thrall et al., 2012) Além disso, pode ocorrer o aumento e a diminuição de diferentes tipos celulares simultaneamente e isso faz com que a contagem total permaneça inalterada (Schalm's, 2010).

Os leucócitos são divididos em polimorfonucleares (granulócitos) e em mononucleares. As células polimorfonucleares são compostas pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e as células mononucleares são representadas pelos linfócitos e monócitos. Essas células são produzidas e maturadas na medula óssea. Uma exceção são os linfócitos, que originam de uma célula pluripotente da medula óssea e sofrem a maturação e proliferação em outros tecidos linfoides (Kaneko et al., 2008; Schalm's, 2010).

Quando comparado às outras espécies, os bovinos possuem a menor relação de neutrófilos/ linfócitos. Além disso, os bovinos têm um pico de leucocitose menor quando são submetidos a estresse ou à doença, apesar de apresentarem uma resposta inflamatória. Além disso, os bovinos apresentam uma baixa reserva de neutrófilos na medula óssea (Harvey, 2012).

A linfocitose (aumento de linfócitos na circulação) ocorre comumente nas infecções virais. Em contrapartida, a linfopenia (redução dos linfócitos circulantes) pode ocorrer em animais submetidos ao estresse (Scott e Stockham, 2011).

Os neutrófilos segmentados maduros são o segundo tipo de célula de defesa mais presente na circulação dos bovinos. Enquanto que os neutrófilos bastonetes são raros em bovinos. A neutrofilia pode ocorrer em infecções graves como as inflamações umbilicais, a peritonite, a mastite e a metrites em bovinos (Radostits, O M et al., 2006). Enquanto que a neutropenia é frequentemente observada em ruminantes devido ao consumo de neutrófilos em doenças inflamatórias severas. A neutropenia geralmente começa a se resolver após 48 horas, enquanto a medula óssea libera os neutrófilos imaturos. As

neutropenias que continuam além de 3 - 4 dias indicam que a granulopoiese está reprimida ou inadequada para atender a demanda de neutrófilos (Weiss e Wardrop, 2010).

Os eosinófilos podem aumentar na circulação na presença de parasitas. Já os basófilos são de ocorrência rara (Scott e Stockham, 2011). Os monócitos variam de tamanho e são considerados os maiores leucócitos circulantes. Este tipo celular tende a diminuir em processos inflamatórios agudos e se elevam quando a doença se torna crônica (Weiss e Wardrop, 2010).

1.5. Homeostase dos líquidos corporais e eletrólitos

Para um ótimo funcionamento fisiológico e bioquímico de todo organismo o volume, a composição iônica e o pH dos líquidos corpóreos mantem-se dentro de limites estreitos (Cunningham, 2008; Kaneko et al., 2008).

A água é o composto mais abundante nos organismos, e é o solvente universal da maioria das soluções biológicas. Os mamíferos contêm entre 60 a 80% de água em sua composição, e sua quantidade varia conforme a idade e a quantidade de gordura corporal do indivíduo. Em animais domésticos adultos a água equivale a 60% do peso corporal (Amaral, 1985). Enquanto que nos animais lactantes o teor de água é superior a 75% do peso corporal. A água corporal total está distribuída em dois grandes “compartimentos”, com base nas diferentes concentrações dos dois principais cátions, o sódio (Na^+) e o potássio (K^+). Os dois compartimentos principais são o líquido extracelular (LEC) e o líquido intracelular (LIC) (Randall, 1976; Kaneko et al., 2008).

O LEC consiste em todo o conteúdo fluido fora das células, e é composto pelo plasma, pelo líquido intersticial e pelos fluidos transcelulares. O LEC corresponde de 15% a 30% do peso corporal (Di Bartola, 2000). Esse compartimento é diretamente dependente da concentração do Na^+ . Enquanto que o LIC representa o conteúdo fluido no interior das células e sua quantidade corresponde de 35% a 40% do peso corporal. Esse compartimento é dependente da concentração do K^+ (Di Bartola, 2000).

A osmose é o movimento da água através de uma membrana semipermeável, quando estão presentes solutos que não podem passar através da membrana, ou seja, é conduzida por diferenças na pressão osmótica. As membranas plasmáticas são mais permeáveis à água do que à maioria das outras pequenas moléculas, íons e macromoléculas (Nelson e Cox, 2008). Portanto, a água é livremente difusível entre o LIC e o LEC. Com isso as alterações na osmolaridade são rapidamente refletidas no volume dos dois compartimentos (Kaneko et al., 2008).

Para que não ocorra variações dos volumes nos dois compartimentos o LIC e o LEC devem estar em homeostase. Os eletrólitos são os principais responsáveis por manter a osmolaridade nos dois compartimentos. A homeostase é o equilíbrio entre os cátions (eletrólitos com carga positiva) e os ânions (eletrólitos com carga negativa) (Kellum, 2005).

O principal cátion presente no LEC é o Na^+ , e os ânions mais importantes são o cloreto (Cl^-) e o íon carbonato (HCO_3^-). No LIC o cátion elementar é o K^+ e os ânions

predominantes são os fosfatos e as proteínas (Di Bartola, 2000). Outros eletrólitos estão distribuídos nos líquidos corporais, porém apresentam menor significância clínica (Wellman et al., 2007).

O sistema renina-angiotensina-hormônio antidiurético (ADH) e o péptido natriurético atrial (ANP) desempenham um importante papel na regulação da osmolaridade dos fluidos corporais. A concentração do Na^+ é o principal determinante da osmolaridade plasmática, pois está intimamente ligado a esse sistema. Isso ocorre porque o Na^+ é o íon mais abundante no LEC, e neste contém aproximadamente 50% a 75% do Na^+ corporal (Kaneko et al., 2008). Além disso, o Na^+ é essencial para o desenvolvimento do potencial de membrana, sendo que este é de fundamental importância para as várias funções celulares, tais como as contrações musculares e cardíacas, e a transmissão de impulsos nervosos. A manutenção da concentração do Na^+ corporal é controlada pela ingestão e pela excreção (Di Bartola, 2000).

As membranas celulares são permeáveis ao Na^+ e ao K^+ , no entanto ocorre compensação pela ação da enzima Na^+/K^+ adenosinotribose-fosfatase (bomba de Na^+/K^+ ATPase), que retira o Na^+ e introduz o K^+ no interior das células gastando energia (Cunningham, 2008; Kaneko et al., 2008)

As alterações na concentração do Na^+ sérico resultam na hipernatremia ou hiponatremia. A hiponatremia dificilmente está associada a deficiência dietética de sódio. A depleção de sódio quase invariavelmente está associada a perdas excessivas de fluido contendo o Na^+ . Isso ocorre frequentemente como resultado de perdas gastrointestinais através de vômitos ou diarreias. Além disso, as perdas excessivas podem ocorrer devido a maior excreção renal em doenças renais ou como resultado de terapia diurética. Por outro lado, as afecções gastrointestinais que causam vômito e diarreia, estão comumente associadas aos casos de hiponatremia (Kaneko et al., 2008; Byers et al., 2014)

Assim como o Na^+ , o Cl^- é o ânion mais abundante no LEC, e além disso o Cl^- representa aproximadamente dois terços dos ânions do plasma. Geralmente o Cl^- é encontrado nos alimentos associado ao Na^+ ou ao K^+ . A absorção, a distribuição e a excreção do Cl^- ocorrem de forma passiva, respeitando os gradientes elétricos originados pelo transporte ativo do Na^+ (Cunningham, 2004; Kaneko et al., 2008). O Cl^- é importante tanto para manter a osmolaridade, quanto para participar ativamente no equilíbrio ácido-base (Kaneko et al., 2008). As alterações da cloremia muitas vezes estão presentes nas alterações da natremia. Além disso, a redução da ingestão de água levando a desidratação, por mais moderada que seja, pode resultar em alterações bruscas na concentração do Na^+ e na sua relação com o Cl^- .

A hiperclorêmia muitas vezes está associada a acidose metabólica (Di Bartola, 2000) e a hipoclorêmia geralmente está associada a alcalose metabólica. A redução de Cl^- ocorre devido à perda excessiva ou sequestro de fluidos ricos desse eletrólito. Em bovinos, é recorrente em casos de deslocamentos de abomaso e quando ocorre obstruções intestinais, especialmente nas proximidades do duodeno ou piloro, os quais resultam em sequestro das secreções abomasais, ricas em cloretos (Smith, 2006).

O K^+ é o eletrólito regulador da pressão osmótica do LIC. Aproximadamente 98% do K^+ disponível encontra-se no interior das células, sendo sua distribuição associada ao Na^+ ,

pela (bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase) (Kaneko et al., 2008). O K^+ é importante em diversas funções bioquímicas, tais como a transmissões dos impulsos nervosos, as contrações musculares e fazem parte do metabolismo de carboidratos (Kaneko et al., 2008).

A concentração de K^+ no plasma depende da ingestão, da absorção no trato gastrointestinal (GI) e da excreção desse mineral pelos rins. A principal fonte de K^+ para os ruminantes está nas forragens que fazem parte da composição da dieta. Por isso os bovinos têm os mecanismos de excreção renal de K^+ bem desenvolvidos, para eliminar o excesso desse mineral do organismo. Quando a ingestão de alimentos é interrompida, os mecanismos excretórios nem sempre respondem rapidamente, e com isso os bovinos com anorexia parcial ou total apresentam hipocalemia moderada. Outras anormalidades como a diarreia podem exacerbar a perda de K^+ . Alguns dos corticosteróides podem levar a hipocalemia (por exemplo, o acetato de isoflupredona) devido ao aumento da excreção de K^+ nos rins. Os medicamentos diuréticos como a furosemida também podem reduzir a quantidade de K^+ (Sattler e Fecteau, 2014).

O equilíbrio ácido-base tem um efeito significativo na distribuição de K^+ entre o LIC e o LEC. Na acidose metabólica pode ocorrer o movimento do K^+ do LIC para o LEC resultando em hipercalemia, e a alcalose metabólica causa movimento inverso do K^+ , resultando em “hipocalemia relativa” (Sattler e Fecteau, 2014).

Cálcio

Cerca de 50% do cálcio (Ca) plasmático está ligado a proteínas como a albumina, e 42% a 48% do Ca está na forma ionizada (Ca^{++}). A concentração de Ca^{++} está relacionada com a porção biologicamente ativa do Ca no sangue. Quando ocorre acidemia a porção do Ca^{++} no sangue é mais próxima de 48%. Em condições alcalemia o Ca^{++} está mais perto de 42%. Os 3 a 7% remanescentes de Ca no sangue é ligado a ânions solúveis, como o citrato, o fosfato, o bicarbonato e o sulfato. Em casos de hipoalbuminemia pode ocorrer redução do teor de Ca total, porém o Ca^{++} não altera sua proporção sanguínea (Goff, 2014).

A homeostase do Ca é controlada basicamente pelo paratormônio (PTH) produzido pelas glândulas paratireoides. Essas glândulas são sensíveis ao declínio da concentração do Ca sanguíneo. As células paratireoides podem determinar a concentração de Ca^{++} de modo que, quando reduz o Ca^{++} no fluido extracelular abaixo da concentração necessária, o PTH é secretado em grandes quantidades. As células alvo primárias do PTH são osteoblastos ósseos e osteócitos, bem como as células epiteliais tubulares renais (Goff, 2014),

O PTH possui três principais ações para a elevação do Ca. A primeira ação é aumentar a reabsorção renal de Ca^{++} a partir dos fluidos tubulares renais proximais. O segundo é a reabsorção do Ca presente no osso através da atividade dos osteoclastos. E a terceira é absorção dietética do Ca, dependente da vitamina D (Goff, 2014).

1.6. Equilíbrio ácido-base e fisiologia da regulação do pH corporal

Um dos fatores mais importantes na preservação do metabolismo celular é a quantidade de hidrogênio livre. As pequenas variações da concentração do hidrogênio podem

acarretar em alterações na velocidade das reações químicas das células, acelerando algumas e retardando outras. Essas alterações são capazes de modificar profundamente o metabolismo celular, a ponto de inibir inteiramente certas funções. Além disso, as alterações extremas podem determinar a morte celular (Amaral, 1985; Nelson e Cox, 2008; Kaneko et al., 2008).

As cargas máximas de hidrogênio (H⁺) ocorrem durante o transporte do dióxido de carbono para os pulmões. Quando o pulmão elimina dióxido de carbono com a mesma rapidez que o organismo o produz, não se observa um nítido ganho de íons de hidrogênio pelo organismo. Além disso, os íons de hidrogênio podem ser produzidos pelo metabolismo proteico que produz o ácido sulfúrico, pelo metabolismo lipídico que produz o ácido fosfórico e pela oxidação incompleta da glicose à ácido láctico (Cunningham, 2008).

A concentração de íon de hidrogênios e as hidroxilas na água é de 1×10^{-7} mol/L. O potencial químico dos íons de hidrogênio é conhecido como a acidez e é expresso em unidade de pH. O pH é o logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio (Cunningham, 2008) e pode ser representada pela formula abaixo (Nelson e Cox, 2008):

$$pH = \frac{1}{[H^+]} = -\log[H^+]$$

A água possui uma concentração de íons de hidroxila igual a um pH 7,0. A faixa de pH normal do sangue venoso dos bovinos varia de 7,31 a 7,42, sendo os valores inferiores a esta variação indícios de acidose, e para valores superiores a alcalose (Kaneko et al., 2008).

A regulação do pH inclui os tampões extracelulares, os tampões intracelulares e os ossos. Os tampões extracelulares incluem os pares de tampões de bicarbonato (HCO₃⁻ / H₂CO₃) e fosfato (HPO₄⁻ / H₂PO₄⁻), bem como as proteínas plasmáticas (Kaneko et al., 2008).

Os tampões intracelulares possuem cinco vezes mais potencial de tamponamento do que os tampões extracelulares. Nestes incluem a proteína, os fosfatos orgânicos e os inorgânicos, e na célula vermelha inclui a hemoglobina. Além disso, a troca de cátions que envolve o movimento intracelular do íon de H⁺ em troca do K⁺, e em menor importância o Na⁺ (Cunningham, 2008).

O carbonato presente nos ossos também fornece uma grande reserva tampão, porém é negligenciada muitas vezes. Embora seja difícil de medir com precisão, estima-se que o carbonato ósseo possa contribuir com até 40% da capacidade tampão de uma carga ácida aguda (Kaneko et al., 2008).

A hemoglobina e o bicarbonato são os tampões sanguíneos mais importantes. A hemoglobina é um importante tampão sanguíneo por ser abundante e por ter um potencial de dissociação próximo ao do pH sanguíneo. O potencial da constante de dissociação (pKa) da hemoglobina altera-se com o grau de oxigenação. A desoxiemoglobina provê

mais capacidade de tamponamento por ter uma pKa (7,93) mais próxima a sanguínea (Cunningham, 2008).

O tampão fosfato possui pH ideal (6,8), porém sua baixa concentração sanguínea torna o sistema menos importante (Cunningham, 2008).

O sistema tampão HCO_3^- - H_2CO_3 é importante devido à sua grande quantidade no sangue (24 mEq/L), que o torna rapidamente disponível para o tamponamento. Além disso, como os rins regulam a concentração de HCO_3^- e os pulmões podem regular a concentração de H_2CO_3 , isso torna o sistema aberto, ou seja, tanto a concentração de bases e de ácidos podem ser reguladas. Esse sistema é de extrema importância na clínica, uma vez que os seus componentes podem ser mensurados rapidamente em laboratório para o diagnóstico, e para a correção da acidose ou da alcalose metabólica (Cunningham, 2008).

A concentração de H_2CO_3 em solução é diretamente proporcional à tensão de dióxido de carbono (PaCO_2), visto que, uma molécula de H_2CO_3 está em equilíbrio com 340 moléculas de CO_2 .

A primeira defesa contra a alteração do pH sanguíneo é feita pelos tampões, porém os pulmões e os rins é que devem corrigir a carga do íon H^+ . Portanto, equação de Henderson-Hasselbalch pode ser escrita como (Cunningham, 2008):

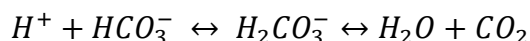
$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{função renal}}{\text{ventilação}}$$

O modelo tradicional do estudo do equilíbrio ácido base fundamenta-se na equação de Henderson-Hasselbalch, que relaciona diretamente as concentrações de bicarbonato e ácido carbônico no plasma em relação ao pH sanguíneo (Kaneko et al., 2008). A avaliação clássica dos distúrbios ácido-base utiliza os seguintes parâmetros: pH, pressão de gás carbônico (pCO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e o excesso de base e ânion gap (Barbosa et al., 2006).

A pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2) no sangue é regulada pela ventilação pulmonar. As principais causas de hiperventilação incluem os distúrbios no sistema nervoso central, a dor, o medo, a hipóxia, as doenças pulmonares e a redução do pH (Eicker, 1990).

No momento em que o gás carbônico (CO_2) está sendo transportado junto a hemoglobina para ser liberado, parte do CO_2 se difunde e combina-se com a água (H_2O) para formar o ácido carbônico (H_2CO_3). Essa reação no interior da hemácia ocorre 250 vezes mais rápido do que no plasma, devido à grande quantidade da anidrase carbônica no seu interior. O H^+ formado é tamponado pelos grupos funcionais de hemoglobina (sem alterações no pH). O bicarbonato (HCO_3^-) formado se difunde para o plasma a fim de restabelecer o equilíbrio da concentração do HCO_3^- . Para compensar a neutralidade

elétrica há um desvio de cloro para dentro das hemácias. A medida que ocorre a descarga de dióxido de hidrogênio, ocorrem as reações inversas (Gomes, 1997).



Outro mecanismo que o organismo possui para debelar os desequilíbrios ácido-base envolve o sistema renal. Os rins são responsáveis por conservar os íons bicarbonato. Grande quantidade de bicarbonato é filtrado nos glomérulos renais e absorvido nos túbulos renais. (Cunningham, 2008). Além disso, ocorre secreção dos íons H⁺ pelas células tubulares renais. Os ácidos fixos excretados na urina reagem com os tampões presentes na mesma. A ação dos tampões urinários, a amônia, evitando quedas bruscas do pH urinário (Cunningham, 2008).

O bicarbonato pode ser mensurado como padrão ou sérico. O excesso de base (EB) é a quantidade necessária para restaurar o estado ácido-base normal no líquido extracelular, sendo descrita em mEq. Enquanto os distúrbios respiratórios são avaliados pela variação da PaCO₂, os distúrbios metabólicos são avaliados pela EB. As compensações dos distúrbios ácido-base também são previstas pelo EB (Rocco, 2003).

Os valores negativos indicam uma deficiência de bases, caracterizando um quadro de acidose clínica devido à redução de HCO₃⁻ e, nos casos de valores positivos sugerem alcalose metabólica (Kaneko et al., 2008).

Quadro 1. Alteração dos componentes primários do equilíbrio ácido-base e suas respostas compensatórias

pH	PaCO ₂	HCO ₃ ⁻	Desvio de base	Alteração
7,4	40mmHg	24 mEq/L	0	Normalidade
↑	↓	↓	0 ou -	Alcalose respiratória
↑	↑	↑	+	Alcalose metabólica
↓	↑	↑	0	Acidose respiratória
↓	↓	↓	-	Acidose metabólica
↓	↑	↓	-	Acidose mista respiratória e metabólica
↑	↓	↑	+	Alcalose mista respiratória e metabólica
7,4	↑	↑	+	Distúrbio misto acidose alcalose
7,4	↓	↓	-	Distúrbio misto alcalose acidose

Adaptado de Bookallil (2018)

1.7. Parâmetros bioquímicos

1.7.1. Glicose

A glicose é considerada a principal forma de energia utilizada no sistema nervoso central sendo a primeira fonte de energia para os tecidos (Radostits, et al., 2007). Nos ruminantes

a principal fonte de glicose sanguínea é por meio da gliconeogênese a partir do ácido propiônico. A glicose sanguínea deriva da absorção intestinal e da produção hepática (Thrall et al., 2012).

A glicose necessita manter quantidades mínimas para ser usada pelos tecidos prioritários, como o sistema nervoso central. Com isso, a glicose sanguínea pode ser proveniente de uma ou mais fontes, dependendo do estado metabólico que o animal se encontra. Logo, após a absorção intestinal a glicose é transportada para o fígado e os músculos, que são os principais locais da gliconeogênese. Por isso, mesmo em períodos de jejum os níveis de glicose são mantidos devido a mobilização dos carboidratos, a glicogenólise hepática, a lipólise e a gliconeogênese. No caso de redução da alimentação por períodos prolongados, a lipólise e até mesmo a proteólise tornam-se mais importantes (Kerr, 2002).

1.7.2. Lactato

O lactato é o produto final da degradação da glicose na ausência de oxigênio. Todos os tecidos podem produzir ácido láctico e pirúvico a partir da glicose (Luft, 2001). Em condições normais os maiores produtores de lactato são a musculatura esquelética, o cérebro, o coração, a pele, o trato gastrointestinal e as hemácias (Allen e Holm, 2008). Além disso, todos os tecidos estão aptos a utilizarem o ácido láctico para produzir o acetil-CoA via piruvato desidrogenase, com exceção dos eritrócitos. A enzima lactato desidrogenase está localizada no citosol e é reponsável por catalisar o piruvato em lactato (Luft, 2001).

A glicólise é um processo anaeróbio que ocorre no citoplasma das células e que resulta na produção de piruvato. A glicólise é a primeira etapa do metabolismo da glicose. Sob condições aeróbias, o piruvato difunde-se nas mitocôndrias da célula por meio do ciclo de Krebs, produzindo mais energia para o metabolismo celular. Em células que não contêm mitocôndria, como os eritrócitos, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Esse metabólito difunde-se para fora da célula e é transportado para outros tecidos capazes de usá-lo para produzir energia (Allen e Holm, 2008).

Durante os períodos de hipóxia, os tecidos são obrigados a usar a glicólise como única fonte de produção de energia. Embora essa via resulte em menor produção de energia, ela pode ocorrer em uma taxa muito mais rápida do que o metabolismo aeróbio. Os níveis de lactato intracelular aumentam e o lactato atravessa a membrana celular e chega ao sangue, e isso resulta em aumento da concentração do lactato na corrente sanguínea. Assim, ocorre a formação de lactato com o íon de hidrogênio livre (Allen e Holm, 2008).

As possíveis causas da acidose láctica são a hipóxia tecidual, o aumento da produção de insulina e o consumo agudo de glicose (Cavinato e Abad, 2009; Luft, 2001). Essa hipóxia tecidual resulta de problemas pulmonares, circulatórios e na hemoglobina (Cavinato e Abad, 2009; Luft, 2001). A taxa de produção do lactato pode aumentar 50 vezes se a glicose ou glicogênio forem necessários para gerar ATP na ausência do oxigênio (Luft, 2001).

A hiperlactatemia é descrita como a elevação na concentração de lactato, enquanto que a acidose láctica é o aumento da concentração de lactato acompanhada por uma diminuição no pH sanguíneo. Em humanos a acidose láctica tem sido descrita como um fator de risco em pacientes críticos, podendo acarretar morte (Gunnerson et al., 2006).

Em ruminantes algumas patologias podem resultar em acidose láctica, dentre elas as mais comuns são a acidose láctica rumenal e o “*rumenal drinker*”. A acidose láctica rumenal está associada ao consumo de grandes quantidades de concentrados pelos ruminantes, principalmente em situações em que há mudança brusca de uma dieta com mais fibra para uma dieta com elevados níveis de alimentos altamente fermentáveis (Smith, 2009).

O “*rumenal drinker*” ocorre possivelmente devido a falha da goteira esofágica ou devido ao refluxo abomasal. Conseqüentemente ocorre a deposição do leite para o rúmen ao invés do abomaso. Com isso, ocorre fermentação aneróbia do leite no rúmen por meio das bactérias ruminais, resultando em produção de ácido láctico (Smith, 2009).

1.7.3. Ureia e Creatinina

A ureia sérica e a creatinina estão associadas à urinálise e constituem os principais indicadores da função renal. Tanto a ureia quanto a creatinina são subprodutos do metabolismo do nitrogênio. Esses dois metabólitos são excretados pelos rins, e à medida que a taxa de filtração glomerular reduz, suas concentrações plasmáticas aumentam (Thrall et al., 2012).

A ureia é sintetizada no fígado em quantidades proporcionais à concentração da amônia proveniente do catabolismo dos aminoácidos e da reciclagem da amônia no rúmen (Kaneko et al., 2008). A ureia é formada no fígado e transportada via plasma para os rins, onde é excretada pela urina. Esta ureia “em trânsito” é o que será medido em uma amostra de plasma ou soro. Os principais fatores que podem causar o aumento da ureia sanguínea são os elevados níveis de proteína na dieta, a inclusão de proteína de má qualidade e os níveis deficientes de carboidrato na dieta (Kerr, 2002).

A ureia é filtrada pelos glomérulos livremente e aproximadamente 50% da ureia é reabsorvida passivamente pelos túbulos proximais, e cerca de 10% é reabsorvido em um processo ativo nos túbulos coletores. A proporção de ureia reabsorvida varia com a velocidade do fluxo sanguíneo pelos túbulos. Quanto mais lento for o fluxo, mais ureia será a reabsorvida. É por esta razão que as concentrações séricas estão desproporcionalmente mais elevadas que as de creatinina em animais desidratados (Thrall et al., 2012).

A creatinina, assim como a ureia, é um produto de resíduos nitrogenados deslocando-se para os rins, porém é um produto da degradação da creatina. Esta substância é produzida pelo fígado a partir de aminoácidos. A creatinina circula no plasma antes de ser captada pela musculatura esquelética, onde é estocada como energia na forma de fosfocreatina. Ocorre um catabolismo lento constante da creatina a uma taxa que é diretamente proporcional à massa muscular do indivíduo, de forma que há uma entrada constante de creatinina no plasma que não é afetada por qualquer alteração na atividade muscular ou

danos musculares. Assim, mudanças na concentração de creatinina plasmática são para todos os efeitos inteiramente devido as alterações na excreção de creatinina, ou seja, refletem a função renal. Dessa forma, a creatinina é um melhor indicador da taxa de filtração glomerular do que a ureia (Kerr, 2002).

1.7.4. Proteína total sérica, albumina e fibrinogênio

A proteína é o componente mais abundante do plasma. As principais funções da proteína no sangue são na coagulação do sangue (fibrinogênio), nas defesas do hospedeiro contra agentes patogênicos (imunoglobulinas, complemento), no transporte de metabolitos (transferrina, albumina), na regulação do metabolismo celular (hormônios), e na manutenção da pressão osmótica (albumina). Os fatores intrínsecos que influenciam as proteínas plasmáticas são a idade, a prenhez e a lactação (Kaneko et al., 2008).

A hipoproteïnemia pode ser observada nas anemias hemorrágicas, diarreia, carência nutricional, parasitismo intestinal grave, hepatopatias ou doença renal grave. A hiperproteïnemia pode ocorrer em casos de desidratação, respostas inflamatórias e dentre outros (Kaneko et al., 2008).

Uma das principais funções da albumina é manter a pressão osmótica. Embora a albumina seja apenas 50% da massa proteica total na circulação, ela é responsável por 80% da pressão osmótica colóide. Outra função importante da albumina é no auxílio do transporte de substâncias que são pouco solúveis em meios aquosos. Portanto, os ácidos graxos, o colesterol, a bilirrubina, o óxido nítrico e os íons metálicos circulam ligados à albumina. Além desses metabólitos, uma grande variedade de composto farmacológicos se ligam à albumina. A albumina também tem um papel importante como antioxidante. A albumina é uma proteína de fase aguda negativa e sua concentração cai gradualmente durante as doenças infecciosas e inflamatórias (Kaneko et al., 2008; Kerr, 2002).

O fibrinogênio constitui aproximadamente 5% da proteína plasmática total, sendo considerado uma proteína de fase aguda para bovinos. (Kaneko et al., 2008).

Quadro 2. Valores de referência do estado ácido-base, eletrólitos e bioquímica séricos em bovinos adultos.

Parâmetros	Bovinos	
	Radostits <i>et al.</i> (2007)	Kaneko <i>et al.</i> (2008)
Na ⁺ (mEq/L)	132-152	132-152
Cl ⁻ (mEq/L)	95-110	97-111
K ⁺ (mEq/L)	3,9-5,8	3,9-5,8
Ca ⁺⁺ ionizado (mEq/L)	1,2-1,6	-
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	20-30	20-30
PaCO ₂ (mm/Hg)	34-45	35-44
pH	7,35-7,50	7,32-7,44
Lactato (mg/dL)	5-20	5-20
Glicose (mg/dL)	47-75	45-75
Creatinina (mg/dL)	1-2	1-2
Ureia (mmol/L)	6-27	20-30
Proteína total (mg/dL)	5,7-8,1	6,7-7,4
Albumina (g/L)	2,1-3,6	3,03-3,55
Fibrinogênio (mg/dL)	200-700	300-700

MATERIAL E MÉTODOS

1.8. Aprovação pelo comitê de ética

As atividades desenvolvidas na pesquisa pertencem ao projeto submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob protocolo de n.º 55/2017 com validade até 07 de maio de 2022.

1.9. Local e período experimental

As atividades de coleta do experimento foram desenvolvidas no mês de março a maio de 2017. O experimento foi realizado no setor de Clínica de Ruminantes do Hospital Veterinário da EV/UFMG em Belo Horizonte – MG.

Realizou-se as análises laboratoriais no Laboratório de apoio à pesquisa (Lapeq) da EV/UFMG. Os testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreram no Laboratório de Protozoologia Veterinária e no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

1.10. Animais experimentais

Foram utilizados 12 bezerros machos, mestiços das raças Holandês e Gir, com idade entre 3 e 4 meses de vida, provenientes de uma fazenda de exploração leiteira intensiva. Os bezerros nasceram em um galpão do tipo *free stall* (Fig. 2), sem contato com carrapatos. Realizou-se a administração de quatro litros de colostro oriundo de banco de armazenamento da própria fazenda. Além disso, foi feita a cura de umbigo com iodo 10% duas vezes ao dia, durante 3 dias. Os animais, aos dois dias de vida, foram transferidos

para a EV-UFGM, onde permaneceram alojados em um galpão telado e dentro de baias coletivas (máximo 4 animais por baia) com cama de maravalha até a cicatrização completa do umbigo. Posteriormente, os animais foram confinados em um sistema *tie stall* (Fig. 3).

A alimentação consistiu em 8 litros de sucedâneo lácteo/dia. Inicialmente os bezerros foram alimentados na mamadeira e posteriormente no balde, nas concentrações recomendadas pelo fabricante¹, sendo dividida em duas refeições (às 08:00h e às 15:00h). Ademais, o concentrado composto por milho e soja (com 18% de proteína bruta) foi introduzido gradualmente na dieta até o consumo se estabilizar em 2 kg/dia após o desaleitamento. O feno e a água foram fornecidos *ad libitum*. Além disso, forneceu-se 20g/dia de suplemento mineral.

Aos três dias de vida e, aos 60 dias de vida, foram coletadas amostras de sangue em tubos com anticoagulante (EDTA), para determinar a ausência de *A. marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, por testes moleculares de *nested* PCR (nPCR), segundo Silveira *et al.* (2013). O diagnóstico negativo no teste, em ambos os momentos, implicou na inclusão do animal no experimento.

Administrou-se, quinzenalmente, no dorso dos bezerros, ectoparasiticida do tipo *pour on* a base de cipermetrina², no volume de 1 ml para cada 10 kg de peso vivo. As janelas, as portas e as telas do galpão também foram banhadas com iscas mosquicidas a base de imidacloprid³.

Ao final do experimento os animais foram para a fazenda da EV/ UFGM, localizada no município de Igarapé.



Figura 2. Instalações tipo free stall na fazenda onde os nascimentos dos bezerros ocorriam, localizada no município de Inhaúma-MG.

¹ Sprayfo LifeStart - Trouw Nutrition

² Colosso® – Ouro Fino

³ Agita®10 WG – Novartis Animal Health



Figura 3. Instalações das baias coletivas e do sistema *tie stall* onde os animais foram alocados.

1.11. Grupos experimentais

Os bezerros (n=12) com idades entre 90 a 120 dias foram blocados, conforme a idade, em dois grupos experimentais (Fig. 4):

- Grupo inoculado(GI): bezerros inoculados (n=6) com 2 ml do inóculo contendo 10^8 hemácias parasitadas com isolado de UFMG1 de *A. marginale*, por via intravenosa (IV);
- Grupo controle(GC): bezerros (n=6) com aplicação de solução salina (NaCl 0,9%) no mesmo volume do GI.

Para cada animal inoculado especificadamente, foi selecionado um animal não inoculado, da mesma idade, para servir como controle negativo. Assim, a medida que foram feitas as coletas de acordo com a redução do hematócrito do animal inoculado, o animal controle específico para o inoculado também era submetido a coleta.



Figura 4. Inoculação na dose de 2 ml contendo 10^8 hemácias parasitadas com *A. marginale* UFMG1 por via intravenosa.

1.12. Inóculos de *Anaplasma marginale*

O inóculo utilizado corresponde ao isolado identificado como UFMG1 no GenBank (número EU676176). Este isolado é oriundo do estado de Minas Gerais foi obtido a partir do sangue de um bezerro naturalmente infectado em Pará de Minas (Ribeiro et al., 1997), possuindo morfologicamente um apêndice e apresentando baixa virulência (Bastos et al., 2010).

A amostra foi previamente replicada *in vivo* em bezerros esplenectomizados e negativos pela técnica de PCR para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*. O sangue desses animais com alta riquetsemia estava congelado em nitrogênio líquido, utilizando o DMSO como crioprotetor, e armazenado no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG até o momento da inoculação nos animais.

O mesmo inóculo foi utilizado em diversos experimentos no setor da Clínica de ruminantes da UFMG demonstrando ser um bom inóculo para experimentação animal (Coelho, 2007; Bastos et al., 2010; Lasmar, 2012 ; Mendonça, 2015;)

1.13. Protocolo experimental

O experimento iniciou quando os animais apresentaram pesquisa de anticorpos anti-*A. marginale* negativa pelo teste de reação de imunofluorescência (RIFI), seguindo-se o protocolo laboratorial conforme Silveira (2012), demonstrando o fim dos anticorpos passivos. Para validação, foram coletadas amostras de sangue aos 45 e aos 60 dias de idade.

Considerou-se dia zero (D.-7), aquele no qual todos os bezerros foram negativos no teste de RIFI para anticorpos anti- *A. marginale*. A inoculação de *A. marginale* foi realizada no dia sete (D.0), com idade provável dos animais entre 60 - 75 dias de idade.

Foram realizadas diariamente a observação da saúde dos animais e com a devida anotação dos dados no caso de alguma alteração clínica imprevista. Além disso, a medição das temperaturas retais dos bezerros era realizada diariamente pela manhã. A temperatura ambiental e a umidade também foram monitoradas e registradas diariamente.

Quando o volume globular alcançou 40% do valor normal do indivíduo, medicou-se o animal com enrofloxacina na dose de 7,5 mg/kg de PV, por via intramuscular em dose única (Facury Filho et al., 2012). Quando necessário, também foi realizado a transfusão sanguínea e o tratamento de suporte dos animais através de fluidoterapia enteral ou intravenosa, visando a correção dos desequilíbrios hidroeletrolítico e ácido-base.

1.14. Coleta de amostras

No período pré-inoculação foram coletadas amostras de fezes para o controle parasitológico e de sangue através da venopunção a vácuo da veia jugular para a realização do hemograma (M-4).

Após a inoculação de *A. marginale* (D0), no período prepatente, foram coletadas amostras sanguíneas a cada 72 horas para avaliar a evolução da riquetsemia e do volume globular (VG). Além disso, nos momentos (M) M1 a M21, foram realizadas coletas de amostras de sangue da veia jugular em tubos com e sem anticoagulante (EDTA) e em tubos com heparina para a realização do hemograma e das provas bioquímicas

A partir da identificação de *A. marginale* em esfregaço sanguíneo, período de patência, foi realizado o monitoramento do VG a cada 48 horas e, após o início da queda, a cada 24 horas. Durante este período, foram realizadas coletas de amostras de sangue para a realização do hemograma e das provas bioquímicas quando o VG reduziu para 80% (Pat 80%), para 60% (Pat 60%) e para 40% (Pat 40%) do valor normal de cada bezerro, obtido a partir da média aritmética dos valores de VG dos dias M-4, M-1 e D0. Durante o período de convalescência as coletas foram realizadas quando o VG recuperou para 60% (Cov 60%) e 80% (Cov 80%) do valor normal do indivíduo.(Fig. 5)

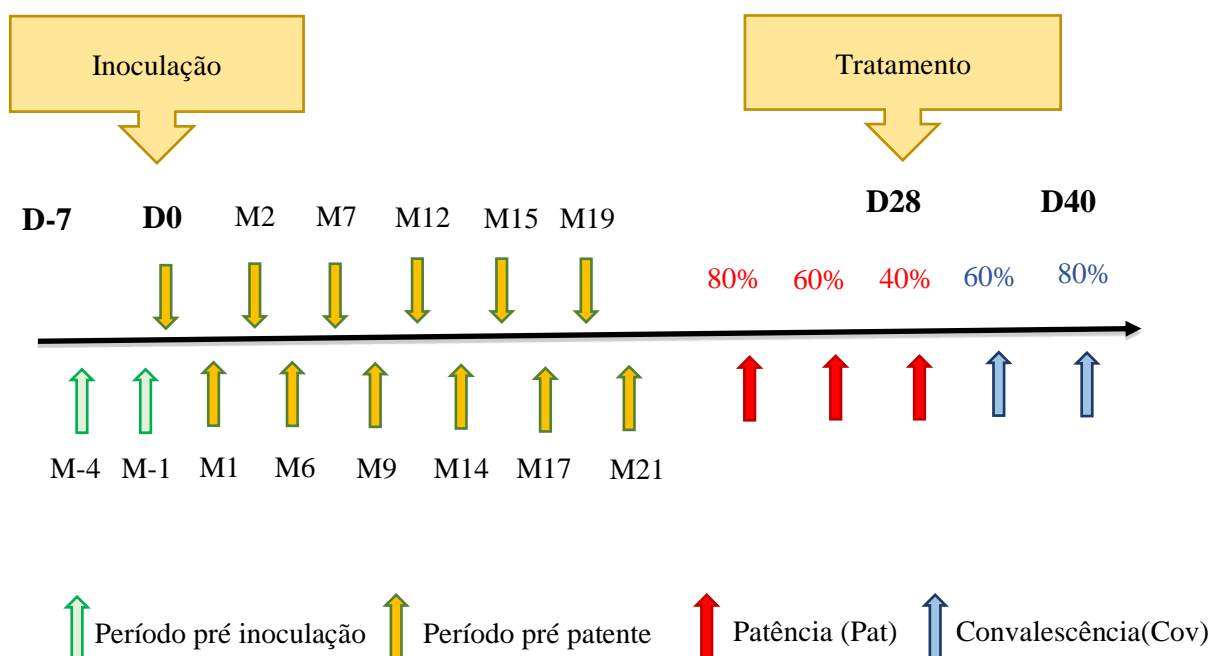


Figura 5. Linha do tempo das coletas para hemograma e bioquímica.

As amostras para hemogasometria foram coletadas da veia jugular, segundo Lisbôa et al. (2002), com uma seringa de três mililitros, sem anticoagulante, com agulha 25x7. (Fig. 6). As hemogasometrias foram realizadas no dia 9 após a inoculação (M9) e nos mesmos momentos das coletas para provas bioquímicas nos períodos de patência e convalescência.

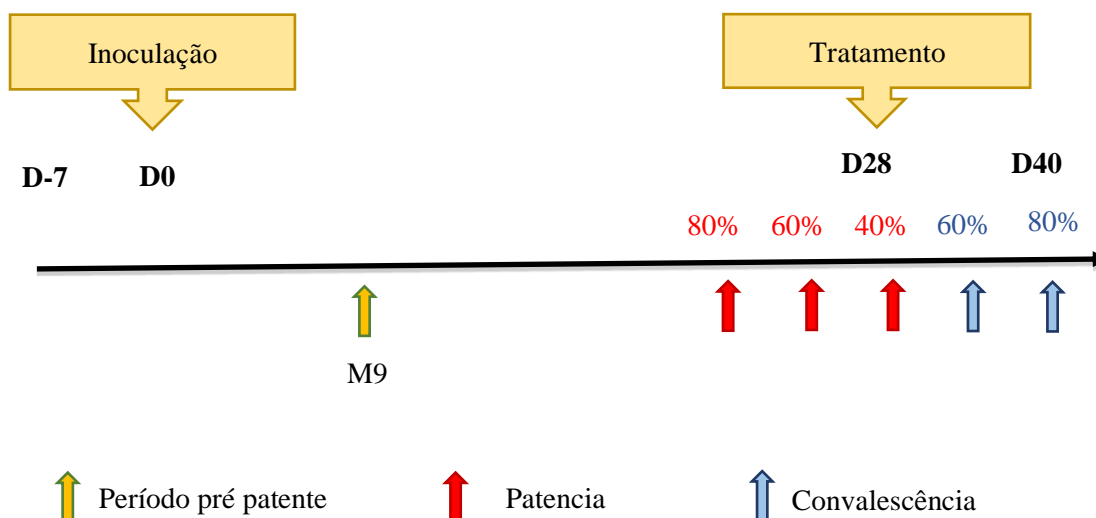


Figura 6. Linha do tempo das coletas para hemogasometria.

1.15. Armazenamento e processamento laboratorial

O volume globular (VG) foi realizado através da técnica de microhematócrito (Weiss e Wardrop, 2010), e os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Romanowsky (corante hematológico rápido - Panótico). Determinou-se a riquetsemia através da observação de 40 campos microscópicos do esfregaço sanguíneo no aumento de 1000 vezes, para a determinação do percentual de hemácias infectadas por *A. marginale* (IICA, 1987).

Para o hemograma foi realizada a contagem de hemácias (RBC), determinação da hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), a contagem de leucócitos totais (WBC), os linfócitos e as células mistas das amostras de sangue total através do contador de células automático⁴.

A hemogasometria foi realizada no analisador clínico portátil i-STAT⁵. As análises sanguíneas do pH, da pressão de gás carbônico (PaCO₂), do dióxido de carbono total (TCO₂), do bicarbonato (HCO₃⁻), da concentrações de sódio (Na⁺), do potássio (K⁺), da glicose, e do cálcio ionizado (Ca²⁺) foram realizadas, imediatamente após a coleta com a utilização de um cartucho i-STAT CG8+ Cartridg, no qual foram introduzidas gotas de sangue sem anticoagulante para a realização das análises.

Os tubos sem anticoagulantes e com heparina foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, para a retirada do soro e do plasma de heparina. Em seguida foram congelados à -20°C em tubo tipo eppendorf para posteriores análises bioquímicas. Realizou-se a bioquímica clínica por espectrofotometria em aparelho automático Cobas

⁴ Sysmex pocH-100iV Diff™

⁵ STAT®1 – Abbott Laboratories – EUA

Mira Plus⁶, utilizando reagentes de kits comerciais da marca Biotécnica⁷. As variáveis séricas avaliadas foram: cloreto, uréia, creatinina, proteína e albumina. A variável mensurada do plasma de heparina foi o lactato.

Por sua vez, o preparo dos reagentes e as técnicas de análise seguiram as indicações de bula dos fabricantes.

1.16. Análise estatística:

O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados, bloqueando o fator idade, com arranjo em parcelas subdivididas (dois grupos nas parcelas e os tempos nas subparcelas) com seis repetições por grupo.

Todos os dados foram plotados em uma única planilha utilizando o Microsoft Excel[®].

Para testar as diferenças entre grupos, ajustou-se um modelo de regressão de efeitos mistos. Neste modelo, os bezerros foram incluídos como efeito aleatório, aninhados dentro das duplas de pareamento. O efeito de grupo foi incluído como efeito fixo.

Na medida em que a variação temporal dos parâmetros vitais/bioquímicos possui uma forma complexa com algumas variações abruptas, preferiu-se trabalhar o tempo como uma variável categórica. Os testes de diferenças entre grupos foram realizados separadamente para cada momento.

A fim de facilitar a análise, os resultados que foram coletados, serão apresentados em dois períodos distintos, sendo uma análise para período pré patente e outra para período patente e convalescente. Para os dados da hemogasometria e eletrólitos, analisou-se um período único que englobava todas as medidas realizadas. Uma vez, que para esses parâmetros houveram menos coletas.

O teste foi realizado utilizando software estatístico R *Project for Statistical Computing*, versão 2017, de acordo com R *Core Team* (2017). Para todos os testes foi considerado o nível de significância de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.17. Período pré patente, patente e convalescente

O período pré patente (PPP), é o tempo compreendido entre o momento da inoculação do *A. marginale* até a observação das primeiras hemácias infectadas no esfregaço sanguíneo. Os bezerros inoculados por via intravenosa (IV) com 10⁸ eritrócitos infectados com *A. marginale* (UFMG1), apresentaram PPP médio de 18,6 dias variando entre 17 e 19 dias (Quad. 3).

O PPP pode ser influenciado pela dose infectante, pela via de inoculação, pela virulência do isolado e pelo grau de imunidade que o indivíduo possui contra a doença (Todorovic

⁶ Roche Diagnostics Corporation[®]

⁷ Biotécnica Biotecnologia Avançada[©]

et al., 1978; Wandrugala e Ristic, 1993; Gale et al., 1996). Em relação à dose infectante, Gale *et al.* (1996) observaram o PPP de bovinos inoculados com hemácias infectadas e verificaram o PPP de 19,9 dias na dose de 10^6 hemácias infectadas, de 13,9 dias na dose de 10^8 e de 7,3 dias na dose de 10^{10} hemácias infectadas. Demonstrando, que quanto maior a carga inoculada mais rápida é a manifestação da doença. Todorovic et al. (1978) verificaram que bezerros inoculados com 2×10^7 eritrócitos infectados com *A. marginale*, pela via subcutânea não apresentaram infecção enquanto aqueles inoculados com a mesma dose por via intravenosa (IV) se infectaram.

Quanto a virulência, Coelho (2007) observou o PPP de bezerros inoculados com a dose de 10^7 hemácias infectadas de isolados de UFMG1 apresentou o PPP de 35 dias. Já Bastos et al. (2010) verificaram PPP de 24 dias em bezerros inoculados (IV) aos 14 dias de vida com 2×10^7 eritrócitos infectados (UFMG 1). Os resultados de Coelho (2007) e Bastos et al. (2010) utilizando a mesma amostra desse experimento (UFMG 1) demonstram que o aumento da dose infectante se relaciona inversamente com a duração do PPP.

Lasmar et al. (2012) verificou haver um PPP de 20 dias em bezerros inoculados com a *A. marginale*-UFMG2 na dose 3×10^5 hemácias infectadas. Entretanto, Bastos *et al.* (2010) inocularam a amostra UFMG2 na dose de 5×10^7 hemácias infectadas/animal e verificaram PPP de 13 dias.

Rodríguez *et al.* (2000) também observaram PPP de 13 dias em bovinos de 18 meses inoculados por via intramuscular (IM) com 5×10^8 hemácias infectadas de um isolado do México (MEX-15). Por outro lado, Meneses (2013) verificou PPP de 20 dias em bezerros inoculados por via IV na dose de 2×10^7 eritrócitos infectados com *A. marginale*-UFMG 3.

O período de patência (PP) correspondente ao tempo compreendido entre o início da riquetsemia até o momento em que são observados os menores valores de VG no indivíduo. Em nosso estudo, o menor valor de VG foi identificado quando o VG do animal atingiu 40% do seu VG basal e, assim, o PP médio foi de 8,6 dias (Tab. 3). Ao comparar o PP entre as pesquisas, deve ser considerado as diferenças nos conceitos do PP e o parâmetro utilizado para determinar o menor valor do VG dos animais. Além disso, o tratamento dos animais doentes e o valor do VG considerado para determinar a recuperação do animal, podem influenciar o PP.

Nesse sentido, Meneses (2013) observou PP de nove dias em bezerros inoculados com UFMG3. O autor considerou o PP no momento em que iniciou a riquetsemia até o dia de menor VG do animal, e não foi realizado o tratamento dos animais. Entretanto, Lasmar (2010) determinou o menor VG equivalente ao VG de 10%, e verificou PP de 11,7 dias em bezerros inoculados com UFMG2. Por outro lado, Coelho (2007) observou PP de 25 dias com UFMG1 e PP de 13 dias com UFMG2. Nesse estudo o autor considerou o fim do PP quando a riquetsemia reduziu a 1% e permaneceu estabilizada.

Considerou o período de convalescência (CV), o intervalo entre o dia de menor VG até o momento em que o VG atingiu 80% do seu valor normal. O CV foi de 11,8 dias (Quad. 3). Esse curto CV pode ser justificado pelo tratamento dos animais e pelas condições de ambiente. Os bezerros doentes foram tratado quando o VG atingiu 40% do seu VG normal.

As condições do ambiente permitiram a recuperação mais rápida do animal, pelo fato de ser controlado e sem grandes desafios, como temperaturas extremas, ectoparasitas, falta de acesso a água e escassez de alimento.

Coelho (2007) considerou o final do CV quando a riquetsemia foi abaixo de 1%, assim, os bezerros inoculados com a cepa UFMG1 tiveram PC de 25 dias. Porém neste estudo os bezerros não foram medicados. Utilizando o inóculo UFMG2, Lasmar et al. (2012) observaram CV de 9,3 dias, porém os animais foram tratados quando o VG atingiu valores menor ou igual 10%.

Meneses (2013) considerou a duração do PC até o dia em que o VG atingiu 24%, e observou PC de 31 dias em bezerros inoculados com a cepa UFMG3.

O curto CV do nosso trabalho pode ser justificado pelo tratamento dos animais e pelas condições de ambiente. Os bezerros doentes foram tratado quando o VG atingiu 40% do seu VG normal. As condições do ambiente permitiram a recuperação mais rápida do animal, pelo fato de ser controlado e sem grandes desafios, como temperaturas extremas, ectoparasitas, falta de acesso a água e escassez de alimento.

Quadro 3. Valores médios do período (em dias) após a inoculação que os animais apresentaram o início da riquetsemia, queda (PP) do VG (80, 60, 40% pat) e recuperação (CV) do VG (60 e 80% cov) e o tempo em dias do PPP, PP, CV de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG1 de *Anaplasma marginale*.

Momento	Inoculação	Início da riquetsemia	Pat 80%	Pat 60%	Pat 40%	Cov60%	Cov 80%
Dias	0	18,6	24,8	25,4	27,2	32,4	39
Tempo	PPP = 18,6 dias	PP = 8,6 dias			CV = 11,8 dias		

1.18. Temperatura

As médias, os desvios padrão e a análise estatística das temperaturas retais encontram-se no Anexo 1.

Os resultados serão apresentados em dois períodos distintos, um gráfico com PPP e outro gráfico com PP e CV. Na primeira fase os parâmetros foram mensurados em momentos específicos e iguais para todos os bezerros. Na segunda fase os parâmetros foram mensurados de acordo com a redução ou aumento do VG de cada animal e de seu respectivo controle.

A temperatura retal entre os dias 3 e 10 foram maior ($p \leq 0,01$) para o grupo inoculado (Fig.7). A inflamação causada pelo início da riquetsemia pode ser o motivo desse aumento da temperatura nestes momentos após a infecção. Porém, nessa fase ainda não é possível identificar a riquetsemia no esfregaço sanguíneo. Alguns pesquisadores sugerem que as células endoteliais podem ser infectadas, tornando-se um local inicial de replicação de *A. marginale* após a transmissão pelo carrapato ou podem ser o reservatório para a

riquettsia durante a infecção persistente (Waghela et al., 1997; Munderloh et al., 2004; Carreño et al., 2007). Os autores sustentam que, os carrapatos alimentam-se de um conjunto de fluídos de tecido ou sangue que fluem dos capilares lesados e não perfuram diretamente os vasos sanguíneos (Munderloh et al., 2004). Com isso, a transferência do *A. marginale* da saliva do carrapato para os eritrócitos, provavelmente envolve algum tipo de célula apresentadora de antígeno que está intimamente associada ao local da picada do carrapato. Outro ponto a ser ressaltado é que na anaplasiose ocorre uma resposta imunomediada por células, devido à expressão do MHC de classe I, esse tipo de resposta pode ser iniciada pelas células endoteliais (Carreño et al., 2007). Por outro lado, a infecção intraeritrocítica não pode iniciar uma resposta imunomediada, devido a falta da expressão dessas moléculas nos eritrócitos (Carreño et al., 2007).

Contudo no presente trabalho, a infecção experimental foi realizada pela via intravenosa, impossibilitando assim uma reação tecidual local devido a inoculação natural da doença. Desta forma, outra hipótese seria que o anaplasma inoculado infectasse outras células antes dos eritrócitos. Munderloh *et al.* (2004), verificaram que o endotélio microvascular dos bovinos é susceptível a infecção por *A. marginale in vitro* (Munderloh et al., 2004). Além disso, Carreño et al. (2007) observaram pela microscopia de fluorescência dupla, que *A. marginale* foi detectada pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 e localizada junto ao marcador de células endoteliais em seções de tecidos de um bezerro experimentalmente inoculado. Contudo, Wamsley et al. (2011) trabalharam com novilhos infectados por *A. marginale* através de carrapatos e não verificaram de forma conclusiva a infecção das células endoteliais. Os autores utilizaram três técnicas de microscopia para a visualização das células endoteliais do tecido da derme, local onde ocorreu a picada, e em tecidos pós-mortem. Além disso, a inoculação intravenosa de bezerros intactos ou esplenectomizados com isolados de *A. marginale* derivados de cultura de células endoteliais, não causou soroconversão ou doença clínica (Wamsley et al., 2011).

A técnica de esfregaço sanguíneo não tem sensibilidade suficiente para detecção dessa riquetsemia precoce. A realização de PCR em pequenos intervalos durante o PPP poderá elucidar sobre o ciclo do *A. marginale* no bovino durante o PPP, uma vez que os resultados observados sugerem uma reação inflamatória durante o PPP, demonstrada pelo aumento da temperatura.

A temperatura retal (TR) foi maior ($p \leq 0,02$) para o grupo inoculado do que para o grupo controle nos três primeiros instantes da redução do VG do animal para 80%, 60% e 40% do VG normal (Fig. 8). Coelho (2007), demonstrou correlação positiva entre a TR e a riquetsemia, e justificou esse fato à liberação de mediadores inflamatório, que foi resultado da potencialização da resposta imune, devido ao aumento do número de hemácias infectadas.

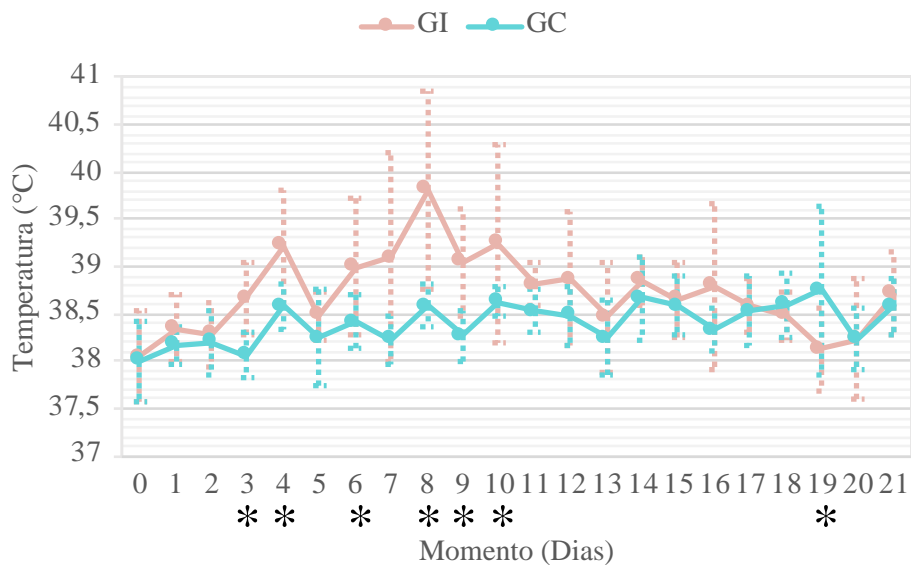


Figura 7. Dinâmica da média e desvio padrão da temperatura retal de bezerros do grupo inoculado com *A.marginale* (GI) e do grupo controle (GC) durante o período pré patente (PPP). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

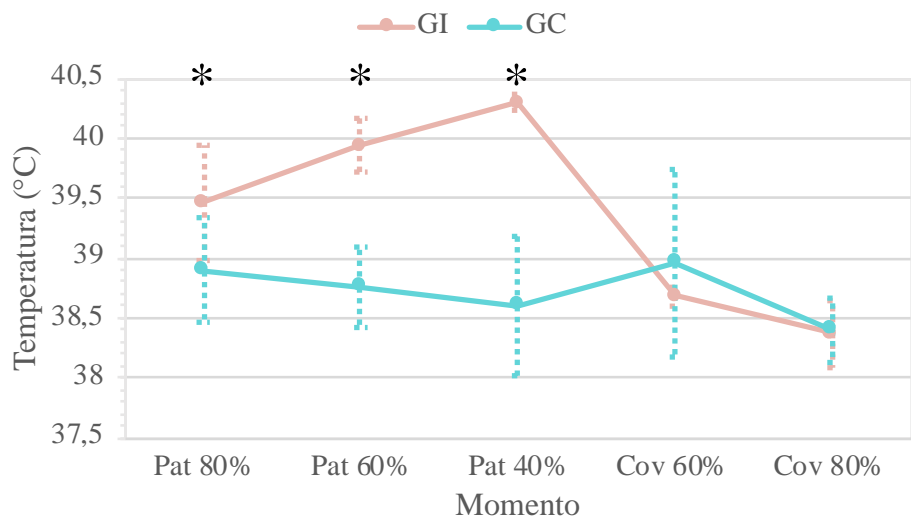


Figura 8. Dinâmica da média da temperatura retal do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Segundo Feitosa (2008), pirógenos exógenos circulantes no organismo (vírus, bactérias, fungos, protozoários e antígenos) são responsáveis por liberarem citocinas, e pirógenos endógenos armazenadas nas células de defesa. Essas substâncias induzem a liberação de alguns produtos intermediários que agem na área pré-óptica do hipotálamo. Com isso, alteram o termostato e aumentam seu ponto fixo de temperatura.

Pesquisadores, relataram aumento das concentrações de haptoglobina e amiloide A sérica em animais inoculados com *A. marginale* (Coşkun et al., 2012; Nazifi et al., 2012). Essas proteínas tem suas concentrações aumentadas em processos inflamatórios agudos (Murata et al., 2004). Além disso, foi observado na anaplasmose aumento de mediadores inflamatórios, sendo eles interferon γ e fator de necrose tumoral α e do ácido sialico (Nazifi *et al.*, 2012). Este é um biomarcador de inflamação que possui inter-relação com o aumento de neutrófilo (Makimura e Usui, 1990).

A hipertermia está entre as principais alterações clínicas apresentadas pelos animais acometidos por tristeza parasitária bovina (Gonçalves et al., 2011). Além disso, a temperatura é o primeiro parâmetro clínico que apresenta variações, esse pode auxiliar no monitoramento, no tratamento e nas medidas de controle das fazendas.

Embora a pirexia seja um bom indicador do desenvolvimento da riquetsia, essa não é um sinal patognomônico, uma vez que ocorre em outras infecções (Feitosa, 2008). Com isso, torna-se necessário o conhecimento da epidemiologia da doença, o monitoramento das categorias mais predisponentes (Coelho, 2007) e o diagnóstico etiológico a partir do esfregaço sanguíneo.

Tabela 1. Média (M) e desvio padrão da temperatura retal (Temp.) durante o período de patência e período de convalescência dos bezerros inoculados com *A. marginale* e do grupo controle.

Momentos	Grupos	Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Temp. (oC)	Inoculado	39,5a	0,48	39,9a	0,23	40,3a	0,07	38,68	0,08	38,4	0,28
	Controle	38,9b	0,44	38,8b	0,34	38,6b	0,58	38,9	0,78	38,4	0,28
	P	0,02		0,0001		6,7		0,2629		0,8893	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos (P<0,05).

As médias da temperatura retal no momento de patência e convalescência se encontram na Tab. 1 e Fig.9. Corroborando com os resultados, Meneses (2013) observou que o pico da pirexia foi quando o VG atingiu os menores valores e apresentou média de temperatura retal de 40,2o C. Lasmar (2010) observou temperatura máxima de 40,7o C 24 horas antes do pico da anemia e da riquetsemia.

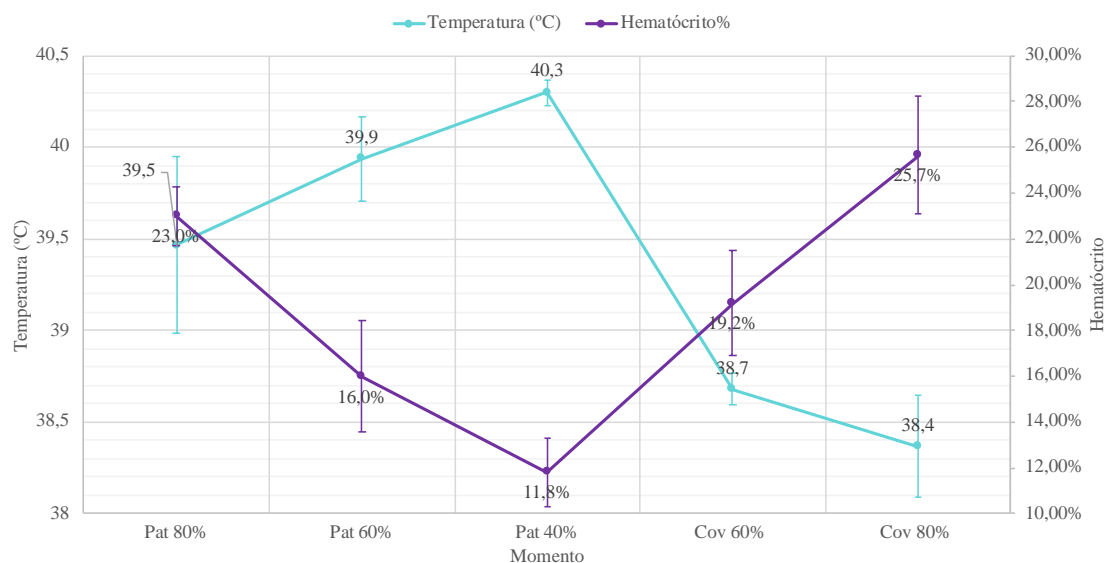


Figura 9. Dinâmica da média e desvio padrão da temperatura retal e do Hematócrito do grupo inoculado. (GI) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).

1.19. Riquetsemia

A cinética da riquetsemia por *A. marginale* estão apresentadas nas Figuras 10 e 11. Após o PPP de 18 dias, os animais apresentaram riquetsemia ascendente nos momentos de redução do hematócrito para 80%, 60% e 40% do VG normal de cada indivíduo (Tab. 2). A riquetsemia reduziu após o tratamento dos animais e o maior valor da riquetsemia foi 13,4%. Entretanto, Coelho (2007) utilizando o mesmo isolado do inóculo do presente trabalho (UFMG1), observou pico médio de 7,3% de riquetsemia. Porém, essa média não estava ajustada em relação ao pico da anemia. Bastos et al. (2010) também utilizaram a amostra UFMG1 e verificaram ocorrência de riquetsemia máxima de 5,4% e 10,2%, nas doses de $3,6 \times 10^7$ e 2×10^7 hemácias infectadas respectivamente. Entretanto, quando os autores utilizaram a amostra de alta virulência (UFMG2), foi constatado 15,6% de riquetsemia.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão (DP) da riquetsemia durante o período de patência (pat) e período de convalescência (cov) de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG1 de *Anaplasma marginale*.

	Riquetsemia				
	Pat 80%	Pat 60%	Pat 40%	Cov 60%	Cov 80%
Média	2,43%	5,26%	5,34%	0,23%	0,05%
DP	2,38%	3,04%	4,52%	0,43%	0,03%
P	0,03	0,0002	0,0002	0,9	0,9

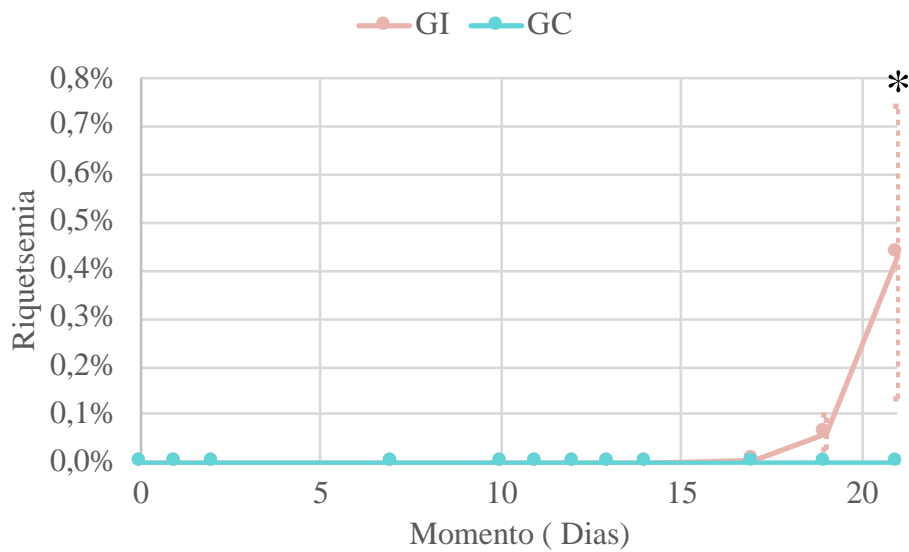


Figura 10. Dinâmica da riquetsemia média e desvio padrão do grupo inoculado com *A. marginale* e do grupo controle (GC) durante o período pré inoculação e período pré patente (PPP) . Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

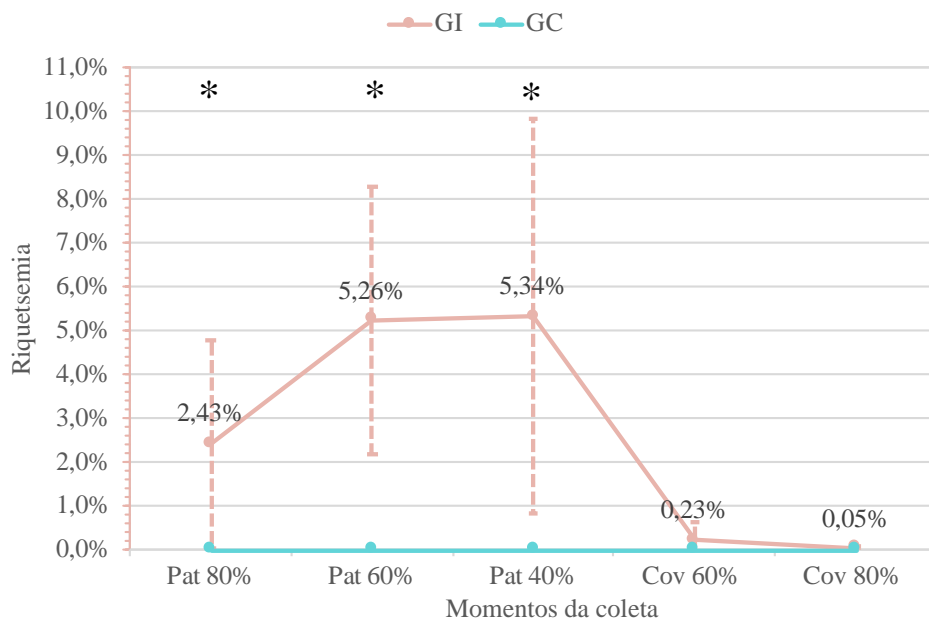


Figura 11. Dinâmica da riquetsemia média e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

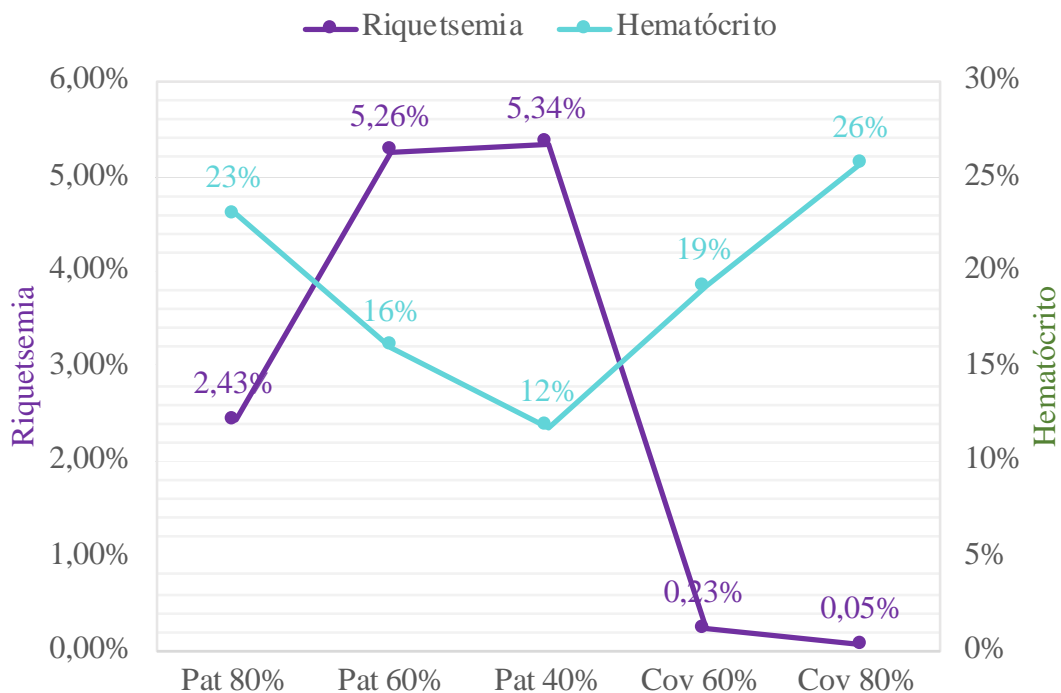


Figura 12. Dinâmica do hematócrito e da riquetsemia média do grupo inoculado durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Em paralelo ao aumento da riquetsemia, ocorreu a redução do VG (Fig. 12). Desta forma, a riquetsemia apresentou seus maiores valores no momento de patência 60% e se estendeu até o momento do menor VG (40% pat). Coelho (2007) observou correlação negativa entre os valores de riquetsemia e do hematócrito de animais inoculados com *A. marginale*. Além disso, o autor também demonstrou que o pico da riquetsemia antecede o pico de menor VG.

Os animais do Grupo Controle não apresentaram riquetsemia ou redução do volume globular durante todo o experimento.

1.20. Eritrograma

Os valores médios do hemograma no período pré patente encontram-se no Anexo 3.

Os valores médios e desvio padrão do hemograma nos momentos de patência e convalescência encontram-se na Tab. 3.

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) no volume globular até os 21 dias após a inoculação (Fig. 13). O tempo médio para o VG do animal diminuir até 80% do VG basal após a inoculação foi de 24,8 dias, para reduzir até 60% foi 25,4 dias e para atingir 40% foi de 27,2 dias. A recuperação para valores de 60% do VG basal após a inoculação foi de 32,4 dias e para a recuperação de 80% foi de 39,5 dias. (Fig. 14).

Tabela 3. Média (M) e desvio padrão dos Volume globular (VG)), contagem médias de hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle.

Momentos	Grupos	Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
VG (%)	Inoculado	23,00 ^b	1,26	16,00 ^b	2,45	11,80 ^b	1,48	19,20 ^b	2,28	25,67	2,58	24-46
	Controle	29,33 ^a	1,37	30,40 ^a	1,52	30,50 ^a	1,00	29,60 ^a	1,14	29,33	1,37	
RBC (x10 ⁶ /μL)	Inoculado	6,60 ^b	0,74	4,47 ^b	0,89	3,08 ^b	0,47	3,32 ^b	1,05	5,43 ^b	1,55	5-10
	Controle	8,84 ^a	0,80	9,02 ^a	0,48	9,09 ^a	0,61	9,04 ^a	0,27	8,40 ^a	0,59	
HGB (g/dL)	Inoculado	7,68	0,74	5,32 ^b	0,87	3,98 ^b	0,45	5,62 ^b	1,16	8,52 ^b	0,84	8-15
	Controle	9,55	0,63	9,68	0,45	9,82	0,71	9,80 ^a	0,48	9,57 ^a	0,44	
VCM (fL)	Inoculado	35,28	1,64	36,28	3,19	39,12	5,09	56,54 ^a	12,41	51,33 ^a	10,47	40-60
	Controle	33,93	0,87	33,54	0,71	33,42	0,92	33,36 ^b	1,01	34,88 ^b	2,35	
HCM (pg)	Inoculado	11,65	0,36	12,00	0,72	12,98	1,11	17,48 ^a	3,23	16,35 ^a	2,91	11-17
	Controle	10,83	0,64	10,76	0,59	10,80	0,48	10,84 ^b	0,63	11,43 ^b	0,82	
CHCM (g/dL)	Inoculado	33,03 ^a	0,74	33,10 ^a	0,97	33,34 ^a	1,33	31,18 ^a	1,86	32,02 ^a	1,17	30-36
	Controle	31,90 ^b	1,37	32,06 ^b	1,52	32,38 ^b	1,29	32,52 ^b	1,50	32,78 ^b	1,28	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos (P<0,05). Intervalo de referência (IR) de acordo com (Radostits et al., 2007).

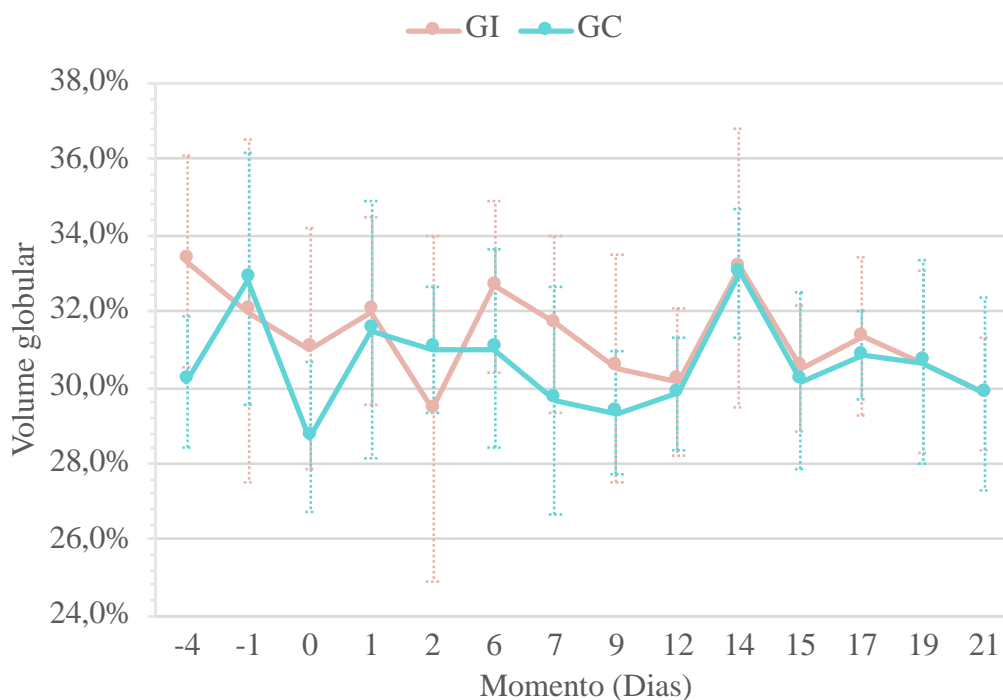


Figura 13. Dinâmica da média e desvio padrão do volume globular (VG) do GI com *A. marginale* (UFMG1) e GC durante o período pré inoculação e pré patente (PPP) em bezerros com idade entre 90 a 120 dias.

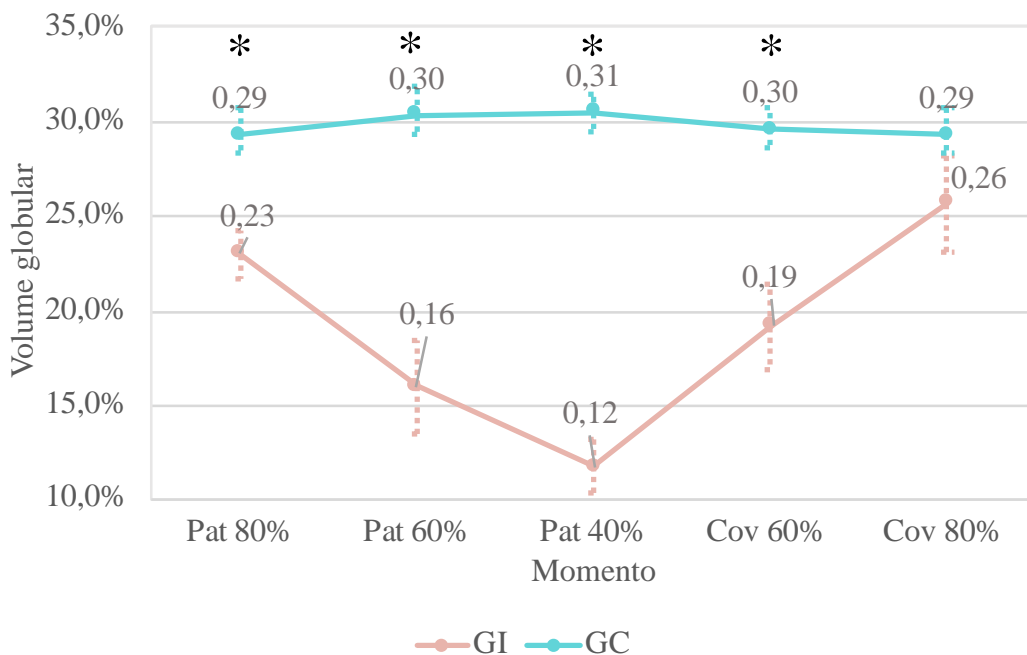


Figura 14. Dinâmica do volume globular (VG) médio e desvio padrão d do grupo inoculado com *A. marginale* (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (pat) e período convalescente (cov). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Não houve diferenças ($P \geq 0,05$) na contagem de hemácias durante o período pré inoculação e PPP (Tab.3) . A média máxima observada foi $9,96 \times 10^6 / \mu\text{L}$ e a mínima $9,82 \times 10^6 / \mu\text{L}$. Caxito (2013), demonstrou média de $9,63 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ao avaliar 15 bezerros da raça Holandês saudáveis e com três meses de idade.

A contagem de hemácias (RBC) foi menor ($p \leq 0,05$) no grupo inoculado em todos os momentos de patência e convalescência (Figura 15). Entretanto, observa-se que não houve diferença ($P \geq 0,05$) do VG no momento 80% de convalescência (Figura 7).

É importante ressaltar que o RBC é caracterizado como a quantidade de hemácias totais, e independe do seu tamanho, enquanto o VG é definido como a razão entre o volume da massa de eritrócitos e o volume de sangue total (Thrall et al., 2012). Logo, há a possibilidade de uma quantidade menor de eritrócitos se apresentarem com um tamanho maior e com isso não apresentarem uma variação relevante no VG. Nesse contexto, a anemia grave causada pela anaplasmosse pode liberar “reticulócitos de estresse” (Harvey, 2001). Isso ocorre devido a uma menor divisão mitótica durante a produção e os reticulócitos imaturos, que possuem o dobro do tamanho normal, são liberados (Harvey, 2001). Esse fato é comprovado pela avaliação das médias do volume corpuscular médio (VCM), que apresentaram aumento ($p \leq 0,05$) nos períodos de 60% e 80% de convalescência (Fig. 16). As médias de VCM no momento de 60% de CV foi $56,5 \text{ fm}^3$ e no momento de 80% de CV foi de $51,3 \text{ fm}^3$. O volume corpuscular médio é a razão do

hematócrito sobre a quantidade de hemácias e indica o tamanho médio das hemácias.

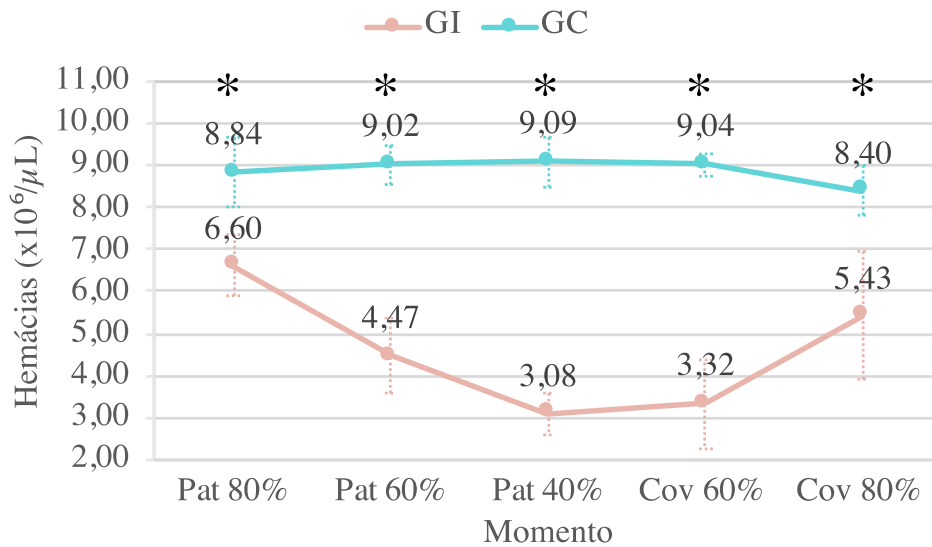


Figura 15. Dinâmica da contagem de hemácias média e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas (p≤0,05) entre os grupos.

Segundo Harvey (2012), são necessários no mínimo quatro dias para que ocorra aumento das quantidades dos reticulócitos sanguíneos. Esse é o tempo necessário para que a eritropoietina possa agir na medula óssea para aumentar e liberar os precursores eritróides para a circulação. Em nosso estudo, o tempo observado para a recuperação do VG 40% para 60% também foi de quatro dias (Quadro 3) e foi nesse período que ocorreu o aumento do VCM, demonstrando a maior quantidade de reticulócitos.

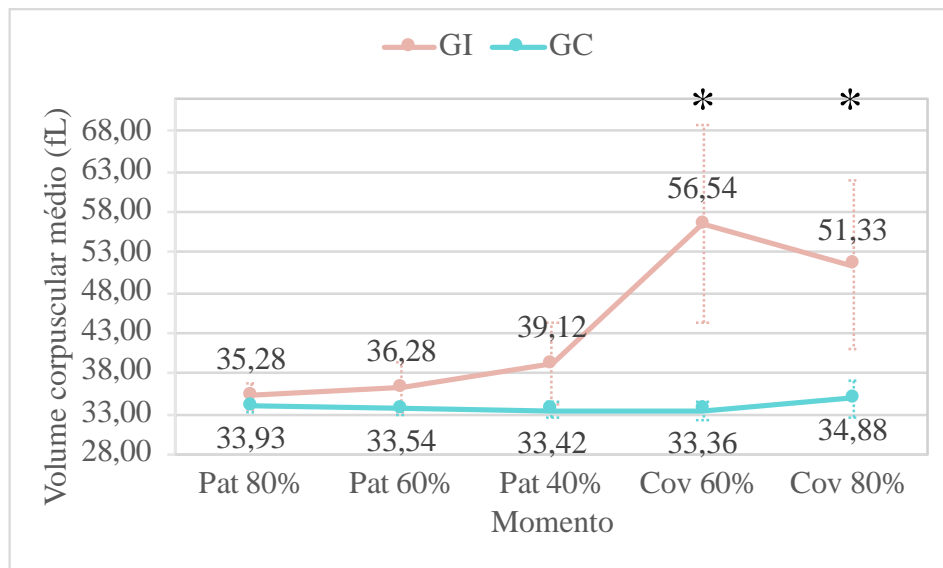


Figura 16. Dinâmica do volume corpuscular médio (VCM) e desvio padrão do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

O VCM do grupo inoculado apresentou médias elevadas ($p \leq 0,05$) durante todo o período de pré inoculação e PPP (Fig 16). Esse achado se deve a um animal do grupo inoculado apresentar valores mais altos sem nenhuma causa patológica aparente (Anexo 3). E com o valor máximo de 37,4 fm³ e o valor mínimo de 36,4 fm³. Porém, todas as observações encontraram-se dentro dos valores de referência normal para a espécie (Weiss e Wardrop, 2010).

A hemoglobina apresentou médias elevadas ($p \leq 0,05$) para o grupo inoculado durante diversos momentos (-4 a 1 dias, 6 a 9 dias e 14 dias) do período pré inoculação e PPP (Fig.17). Contudo, os valores máximos e mínimos encontram-se dentro da faixa de referência normal para a espécie (Weiss e Wardrop, 2010).

Ao contrário dos resultados observados na fase inicial, durante o PP e CV, as médias de hemoglobina foram menores em todos os momentos (Fig. 18). Além disso, elas apresentaram os menores valores simultaneamente ao momento de menor VG (Tab. 3). Esse resultados evidenciam a redução da capacidade do animal realiza hematose.

A razão desse fato, possivelmente é devido a anemia causada pela anaplasmosse ocorrer através da fagocitose de eritrócitos infectados e possivelmente não infectados pelo sistema reticulo endotelial (Kocan et al., 2010), ou seja, a hemoglobina reduz concomitante com a queda do VG devido a retirada das hemácias de circulação. Coskun et al. (2012) e Bernardo et al. (2016) ao trabalharem com grupo doente e controle também observaram reduções significativas na hemoglobina, porém com médias maiores que no presente estudo (médias de 6,08g/dL, e 8,19 g/dL respectivamente). Essa diferença pode ter ocorrido pelos pesquisadores trabalharem com média de VG mais elevadas para o grupo doente.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentou variações entre os grupos ao longo do período de incubação (Anexo 3). Porém, no PP (80%, 60% e 40%pat) aumentou o CHCM no grupo inoculado ($p \leq 0,05$) (Fig. 19). O CHCM é a razão entre a hemoglobina e o VG (Weiss e Wardrop, 2010). Esse aumento ocorreu devido a redução do volume globular ter sido proporcionalmente maior que a redução da hemoglobina. Indicando que possivelmente também ocorreu hemólise intravascular. Um estudo feito com animais infectados clinicamente com *A. marginale* demonstraram aumento da fragilidade corpuscular média das hemácias concomitante ao aumento da riquetsemia, indicando lesão na membrana eritrocitária, que podem ter como consequência o aumento da lise celular (Nazifi et al., 2008). Além disso, foi evidenciado correlação positiva entre a concentração da enzima lactato desidrogenase e a riquetsemia, um indicativo de lesão celular (Nazifi et al., 2008). Foi elucidado também correlação negativa entre enzimas antioxidante e riquetsemia, sugerindo que o estresse oxidativo pode ter um papel importante na causa da hemólise (Nazifi et al., 2008). Com isso são necessárias mais pesquisas nessa área para melhor entendimento da patogenia das hemólises e da anemia imunomediada que ocorre na anaplasmosse (Nazifi et al., 2008).

Além disso, a gravidade da hemólise está vinculada a algumas características da opsonização do anticorpo, como por exemplo: quantidade, especificidade, amplitude térmica, habilidade de fixar complemento, capacidade de se ligar a macrófagos teciduais, bem como do antígeno alvo (Bradley e Friedberg, 2002). Anticorpos IgG são ativadores relativamente limitados da via clássica do complemento, mas são facilmente identificados pelos receptores Fc em células fagocitárias (exclusivamente os anticorpos IgG1 e IgG3) (citado por Bradley e Friedberg, 2002). Portanto, os eritrócitos sensibilizados por IgG geralmente são eliminados da circulação pelos fagócitos do sistema retículoendotelial. Contudo, as células reticuloendoteliais também possuem receptores para os fatores do complemento C3b e iC3b, esses componentes do complemento podem intensificar a hemólise extravascular (citado por Bradley e Friedberg, 2002).

Ademais, os eritrócitos opsonizados por IgM geralmente estão associados a uma combinação de hemólise intra e extravascular. A hemólise intravascular ocorre devido aos anticorpos IgM, ativarem a via clássica do complemento e consequentemente produzirem citólise. Portanto, devido à presença de proteínas RBC reguladoras, como fator de aceleração de decaimento e inibidor de membrana de lise reativa, ocorre ativação do complemento produzindo um quadro agudo de hemólise intravascular (citado por Bradley e Friedberg, 2002).

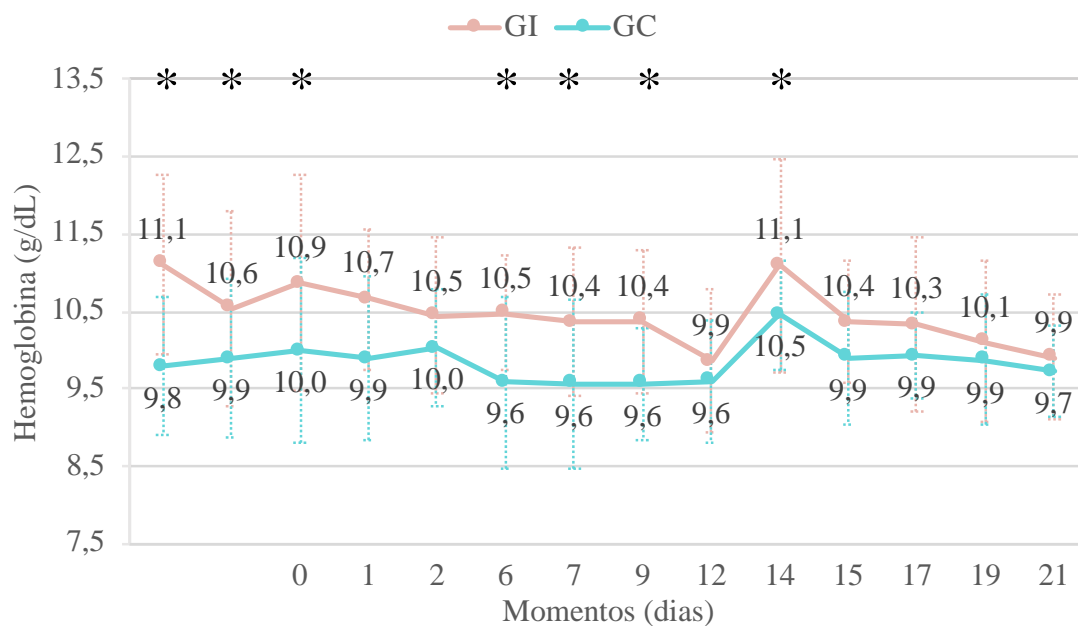


Figura 17. Dinâmica da média e desvio padrão da hemoglobina do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período pré inoculação e pré patente (PPP) em bezerros com idade entre 90 a 120 dias. Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

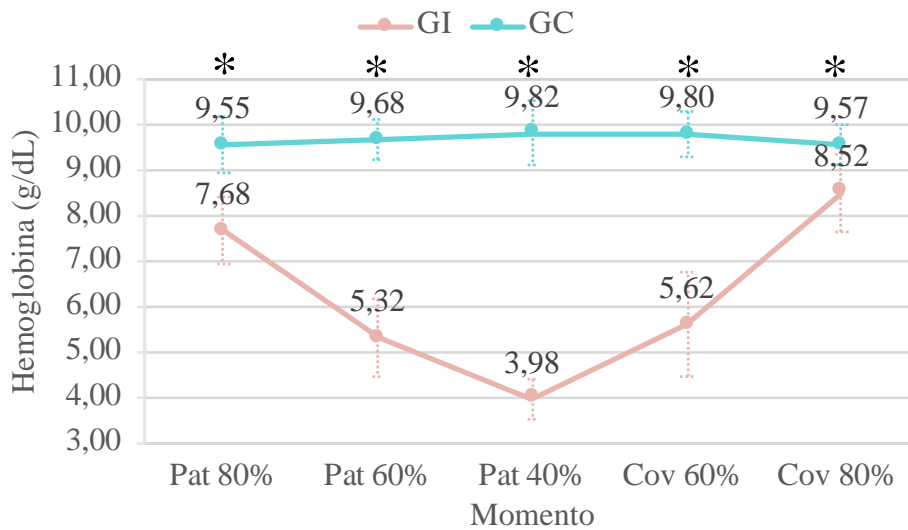


Figura 18. Dinâmica da média e desvio padrão das concentrações da hemoglobina do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

No período de CV (60% e 80% cov) houve redução das médias de CHCM para o grupo inoculado que pode ser justificada pela resposta regenerativa à anemia. Reticulócitos ainda estão sintetizando a hemoglobina e, portanto, não atingiram a concentração de hemoglobina celular de um eritrócito maduro (Thrall et al., 2012).

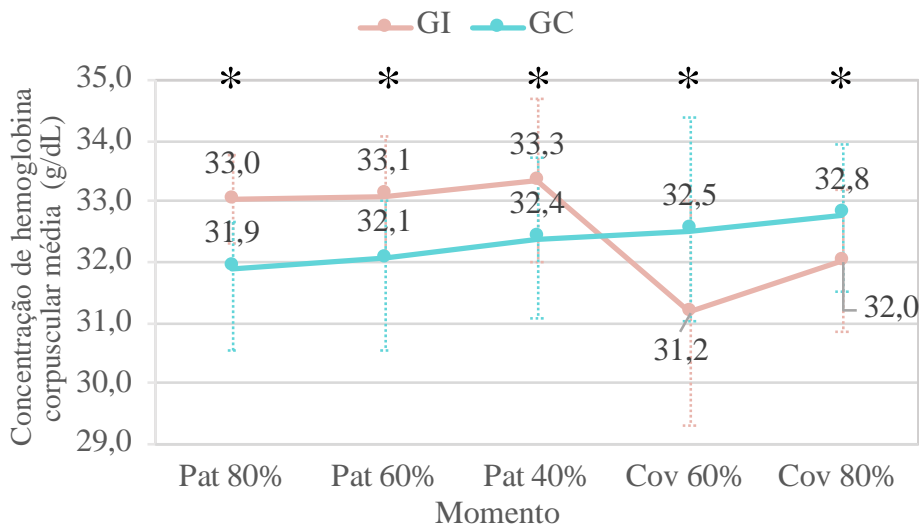


Figura 19. Dinâmica das médias e desvio padrão das concentrações de hemoglobina corpuscular média (CHCM) do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP=

Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

1.21. Leucograma

Não houve diferenças ($p \geq 0,05$) na contagem de leucócitos totais (WBC) durante o período pré inoculação e PPP (Anexo2), entre os grupos. O dados que apresentaram diferenças significativas no período PP e CV encontram-se na Tab. 4.

Tabela 4. Média (M) e desvio padrão dos leucócitos totais (WBC), linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$ e %) e células mistas ($10^3/\mu\text{L}$ e %) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle.

Momento		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
Grupos		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Inoculado	9,58	3,02	9,24	2,62	9,58	3,12	7,32 ^b	1,72	9,25	2,95	4-12
	Controle	10,17	2,89	8,78	2,60	9,28	3,59	11,30 ^a	2,05	10,43	2,70	
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Inoculado	6,11	2,84	5,91	2,40	6,29	2,86	4,43	3,18	5,65	4,42	2-7,5
	Controle	5,85	1,58	5,10	1,83	5,38	1,98	6,09	1,61	4,91	2,81	
Linfócitos %	Inoculado	62,02	9,18	63,28	12,33	64,20	11,38	59,26	32,68	53,86	31,88	45-75
	Controle	57,88	8,23	57,76	8,64	58,80	4,68	53,62	7,27	50,02	25,26	
Células mistas ($10^3/\mu\text{L}$)	Inoculado	3,48	0,85	3,33	1,28	3,29	1,05	2,89 ^b	2,53	3,66	1,57	4-7
	Controle	4,32	1,80	3,68	1,15	3,90	1,64	5,21 ^a	0,97	4,88	2,65	
Células mistas %	Inoculado	37,98	9,18	36,72	12,33	35,80	11,38	40,74	32,68	39,26	18,31	
	Controle	42,12	8,23	42,24	8,64	41,20	4,68	46,38	7,27	45,03	15,78	
Neutrófilos segmentados %	Inoculado	36,00	11,19	40,75	22,23	20,80 ^b	10,21	20,20 ^b	9,07	22,33	11,04	15-45
	Controle	36,80	15,21	36,50	3,42	39,75 ^a	12,82	43,00 ^a	2,94	32,80	8,87	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos ($p \leq 0,05$). Intervalo de referência (IR) de acordo com (Radostits et al., 2007).

A contagem de leucócitos totais (WBC) foi menor ($p \leq 0,05$) no grupo inoculado no momento de CV 60% (Fig. 20). Além disso, houve redução nos valores absolutos das células mistas nesse mesmo momento (Tab. 4 e Fig. 21), enquanto que os valores relativos médios das células mistas (%) se mantiveram iguais. Pois, a redução do WBC e das células mistas foram proporcionais. Logo, constatou-se que a diminuição do WBC foi devido à redução das células mistas. As células mistas são compostas por neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos. Destas células, a que prevalece em maior quantidade (95%) são os neutrófilos e por isso elas podem ser utilizadas como quantificadores da contagem dos neutrófilos (Riond et al., 2011). Além disso, corroborando com tal pesquisa foi possível observar no presente trabalho que os neutrófilos segmentados também apresentaram redução ($p \leq 0,05$) nos momentos 40% de PP e 60% de CV (Fig. 22 e 23). Enquanto que os linfócitos não apresentaram variação em nenhum dos momentos.

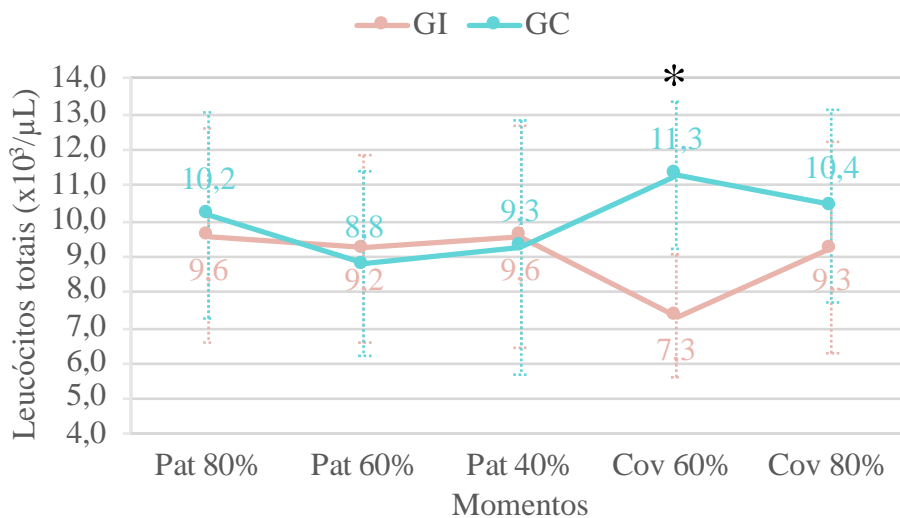


Figura 20. Dinâmica da média e desvio padrão da contagem de leucócitos totais do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

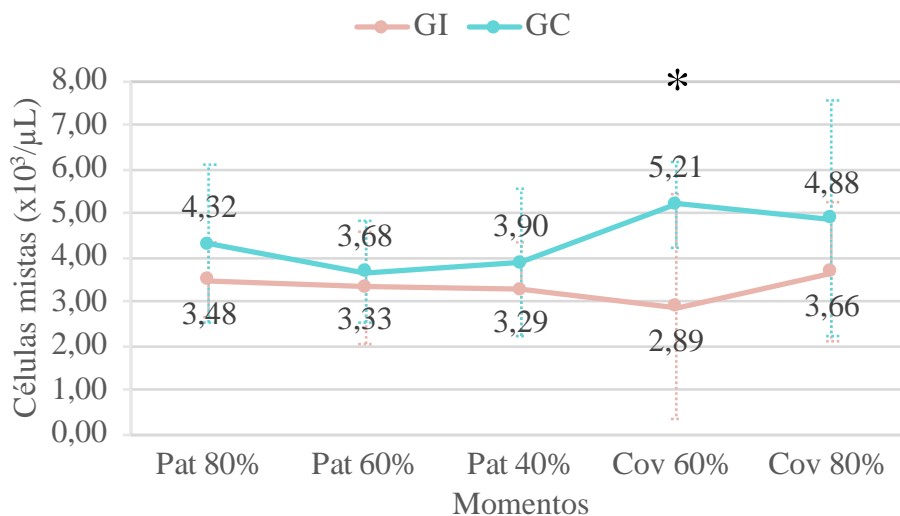


Figura 21. Dinâmica da média e desvio padrão das células mistas do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

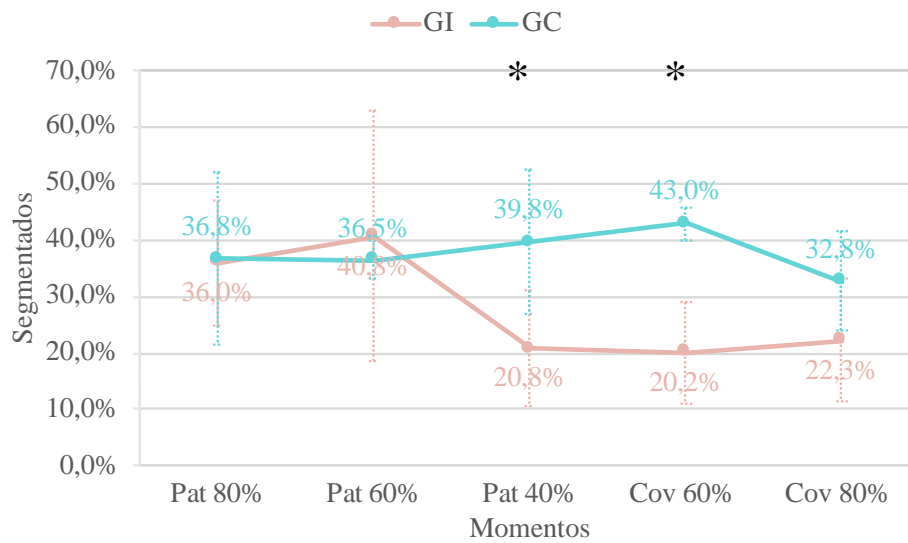


Figura 22 Dinâmica da média e desvio padrão dos neutrófilos segmentados do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

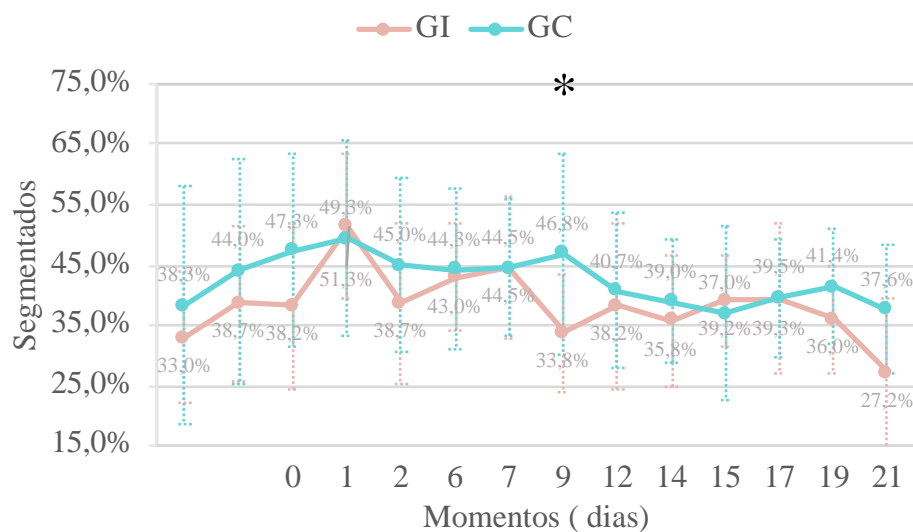


Figura 23 Dinâmica da média e desvio padrão da neutrófilos segmentados do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Essa redução dos neutrófilos, pode ser advinda de uma hiperplasia eritrocítica na medula óssea concomitante a uma hipoplasia granulocítica, devido a uma resposta causada pela

anemia severa nesses animais. A hipóxia, como ocorre em graves anemias, é responsável por regular a produção de eritropoietina (EPO). Em hipóxias graves, a produção de EPO é aumentada até 1.000 vezes e com isso pode causar uma hiperplasia eritrocítica (Schalm's, 2010). Como resultado, reduz a proporção mielóide/eritróide na medula óssea (Harvey, 2012). Além disso, o bovino possui uma menor reserva de granulócitos e isso pode causar uma neutropenia ao ocorrer distúrbios inflamatórios (Weiss e Wardrop, 2010).

Corroborando com os valores encontrados, Alsaad e Alimam (2013) observaram redução do número absoluto de neutrófilos em bezerros com anaplasmosse. No entanto, diversos autores observaram o aumento da WBC e da contagem dos neutrófilos, ou não observaram variações (Coşkun et al., 2012; Nazifi et al., 2012; Ashuma et al., 2013; Bernardo et al., 2016). A causa da variação desses resultados pode ser devido a coleta dos dados terem sido única e sem acompanhamento dos animais ao longo do tempo. Além disso, os grupos inoculados dessas pesquisas não apresentaram valores abaixo de 15% de VG, como na presente pesquisa. Com isso, o presente trabalho possui fundamental importância no intuito de caracterizar o que ocorre em cada momento de redução do volume globular afim de melhorar os tratamentos.

1.22. Equilíbrio Eletrolítico

Não houveram diferenças ($p \leq 0,05$) entre os grupos quanto á concentração de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloretos (Cl^-) e Cálcio ionizado (Ca^{++}) durante o experimento (Tab. 5).

Tabela 5. Média (M) e desvio padrão das concentrações séricas de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloretos (Cl^-) e cálcio ionizado (Ca^{++}) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle.

Momentos		10		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
Grupos		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Na^+ (mmol/L)	Inoculado	138,50	1,97	138,00	2,35	136,60	0,55	136,40	2,07	138,60	1,52	138,00	0,89	132-152
	Controle	138,50	2,07	138,40	1,14	137,20	0,84	137,20	1,92	137,60	1,34	138,17	2,64	
Cl^- (mmol/L)	Inoculado	98,86	9,68	129,72	17,86	116,89	14,80	115,43	6,43	114,04	15,85	104,54	12,72	95-110
	Controle	102,53	5,31	124,06	8,85	115,68	14,06	109,19	17,33	106,90	16,65	106,70	13,37	
K^+ (mmol/L)	Inoculado	4,10	0,20	4,06	0,53	4,26	0,19	4,00	0,34	3,96	0,63	4,03	0,51	3,9-5,8
	Controle	4,18	0,19	4,34	0,32	4,12	0,13	3,98	0,11	4,14	0,24	4,10	0,24	
Ca^{++} (mmol/L)	Inoculado	1,33	0,04	1,33	0,05	1,33	0,04	1,33	0,04	1,38	0,03	1,34	0,06	1,2-1,6
	Controle	1,36	0,03	1,34	0,03	1,39	0,07	1,32	0,03	1,36	0,08	1,37	0,04	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos ($p \leq 0,05$). Intervalo de referência (IR) de acordo com Radostits *et al.* (2007).

Esses resultados refletiram as boas condições experimentais que os animais se

encontravam, diferentes de condições à campo. Ou seja, sem maiores desafios, como temperaturas extremas, ectoparasitas, competição por alimento com outros animais ou gasto energético com movimentações excessivas.

Corroborando com os resultados encontrados, Allen e Kuttler (1981) não observaram diferenças no teor de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ dos bezerros esplenectomizados que sobreviveram a infecção causada por *A. marginale*. No entanto, as quantidades médias de K⁺ foram mais baixas para o grupo dos bezerros não sobreviventes. Apesar disso, esse valor médio de K⁺ (3,95 mmol/L) está dentro dos limites de referência citados por Radostits *et al.* (2007).

Ajayi *et al.*, (1987) também não verificaram diferença nas concentrações dos eletrólitos Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺ em um bezerro esplenectomizado com um ano de vida e inoculados com *A. marginale*. O animal foi avaliado diariamente no período de pré infecção, pré patente e patente.

Oliver *et al.*, (1994) avaliaram novilhos com 5 a 7 meses de vida divididos em dois grupos: um grupo inoculado com 10⁸ hemácias infectadas do isolado Gacheta 83 de *A. marginale* e outro com 10¹¹ do mesmo isolado. Os autores também não observaram diferenças nas concentrações de Ca⁺⁺ e Cl⁻.

Da mesma forma Alsaad e Alimam, (2013) não observaram diferença nos teores de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em bezerros infectados clinicamente com *A. marginale*.

Temiz *et al.*, (2013) também não verificaram diferença na concentração dos eletrólitos de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em bovinos com diferentes idades e infectados com *Theileria annulata* na Turquia. Nesse estudo os animais foram divididos em grupos de acordo com o grau de anemia.

Os valores de Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺ estavam dentro do valor de referência para a espécie (Radostits *et al.*, 2007). No entanto, as concentrações de Cl⁻ ficaram ligeiramente acima dos valores de referência para os dois grupos, possivelmente devido a metodologia.

1.23. Equilíbrio Ácido-básico

O pH sanguíneo foi maior ($p < 0,05$) no grupo inoculado nos momentos de 80%, 60% e 40% do período de patência (Fig. 24). As médias da concentração de PCO₂ também foram menores ($p < 0,05$) para o grupo inoculado nos mesmos momentos do período de patência (Fig. 25). Porém, todas as médias ficaram dentro do intervalo de normalidade para a espécie de acordo com Radostits *et al.* (2007) (Tab. 6). O valor máximo de pH foi 7,51, observado em um bezerro do grupo inoculado, quando o VG reduziu para 80% do valor basal. O valor mínimo de pH foi 7,35 e foi observado em um animal do grupo controle.

A maior redução na PaCO₂ foi observada no momento do menor volume globular (VG= 40%) e maior riquetsemia. Possivelmente, esse comportamento foi em decorrência do aumento da frequência respiratória durante o período patente. Coelho (2007) e Lasmar (2010), constataram aumento da frequência respiratória no momento do pico da anemia. Isso ocorreu, possivelmente, devido ao transporte de oxigênio ser deficiente em animais anêmicos, sendo necessário respirar com maior rapidez e profundidade para compensar a

hipóxia sanguínea (Feitosa, 2008).

Tabela 6. Concentrações médias e desvio padrão (DP) de pH, da pressão de gás carbônico (PaCO₂), de dióxido de carbono total (TCO₂), bicarbonato (HCO₃⁻) sanguíneos durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerras inoculados com *A. marginale* e bezerras do grupo controle.

	Momentos	10		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
		Grupos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	
pH	Inoculado	7,44	0,03	7,46a	0,04	7,45a	0,02	7,44a	0,02	7,43	0,04	7,41	0,02	7,32 -7,45
	Controle	7,42	0,02	7,42b	0,04	7,40b	0,04	7,39b	0,03	7,40	0,03	7,42	0,03	
PaCO ₂ (mm/Hg)	Inoculado	44,25	2,82	39,88b	2,99	37,32b	1,25	35,60b	2,61	41,16b	1,86	44,58	1,50	35 - 45
	Controle	46,55	1,23	45,48a	2,68	42,62a	5,12	44,16a	2,64	44,50a	1,86	46,08	2,89	
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	Inoculado	29,68	1,28	27,92	1,54	25,84	1,13	24,36	1,18	26,92	1,11	28,37	1,90	20-30
	Controle	30,33	1,41	29,56	2,23	26,38	2,77	26,56	3,18	27,88	1,98	29,87	2,58	
TCO ₂ (mEq/L)	Inoculado	31,17	1,47	29,20	1,30	26,80	1,30	26,20	1,64	28,20	1,10	29,67	1,75	20-30
	Controle	31,50	1,64	30,80	2,17	28,00	3,39	27,00	2,92	29,20	1,64	31,33	2,66	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos (p≤0,05). Intervalo de referência (IR) de acordo com Radostits *et al.* (2007).

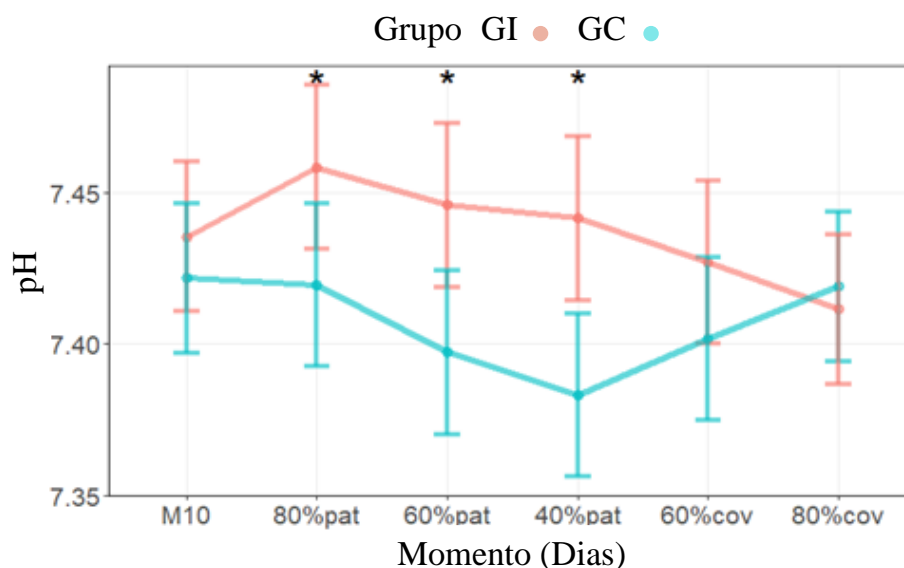


Figura 24. Dinâmica da média e intervalo de confiança do pH sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas (p≤0,05) entre os grupos.

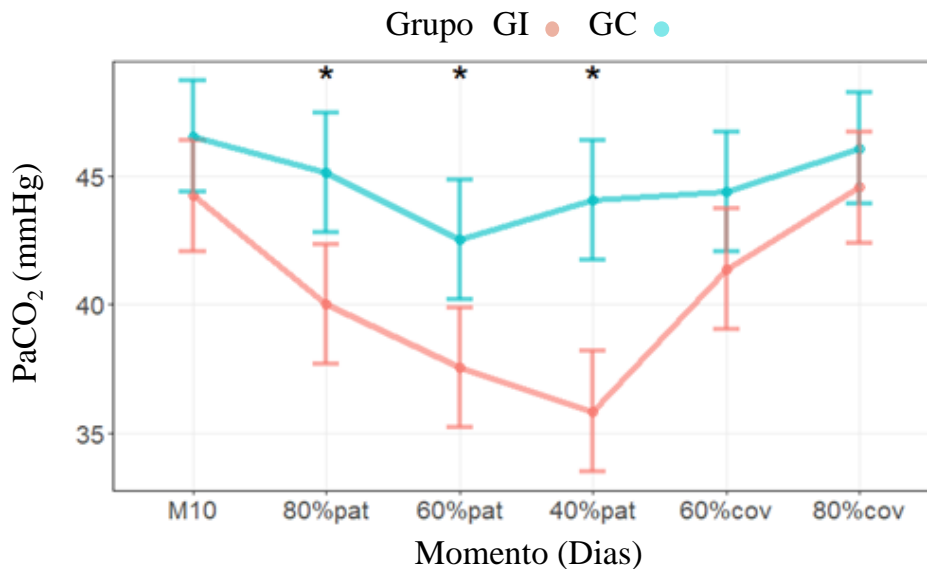


Figura 25. Dinâmica da média e intervalo de confiança da pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂) sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Não houveram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nas concentrações de dióxido de carbono total (TCO₂) e bicarbonato (HCO₃⁻), embora as médias tenham sido sempre mais baixas para o grupo inoculado (Fig. 26 e Tab. 6).

A alcalose respiratória ocorre pelo estímulo de quimiorreceptores que provocam uma hiperventilação alveolar, e assim pode ser estimulada por hipoxemia associada a doença pulmonar, a insuficiência cardíaca congestiva ou a anemia grave (Cunningham, 2008; Kaneko *et al.*, 2008). Com isso, o dióxido de carbono é eliminado com mais rapidez do que é produzido pelos tecidos, resultando em uma redução da PaCO₂ sanguínea. Conforme o CO₂ é eliminado forma-se o ácido carbônico H₂CO₃, que é formado a partir de H⁺ e HCO₃⁻ e, com isso, ocorre aumento do pH e redução da concentração de HCO₃⁻ para manter o equilíbrio ácido-básico (Cunningham, 2008).

Coelho (2007) observou redução da PaCO₂ de acordo com a evolução da anemia causada pela infecção por *A. marginale* em bezerros inoculados experimentalmente. Observou também maior valor médio de pH nos bezerros inoculados com *Anaplasma marginale* indicando que houve alcalose respiratória até um dia antes do VG atingir 40% de PP (7,43% e 7,51%). Após esse pico os valores de pH permaneceram normais (7,38 e 7,4) até o final do experimento. Assim como Allen e Kutler (1981), Coelho (2007) observou valor de pH baixo (7,16) para o animal não sobrevivente. Além disso, o HCO₃⁻ e o PaCO₂ reduziram concomitante à diminuição do VG.

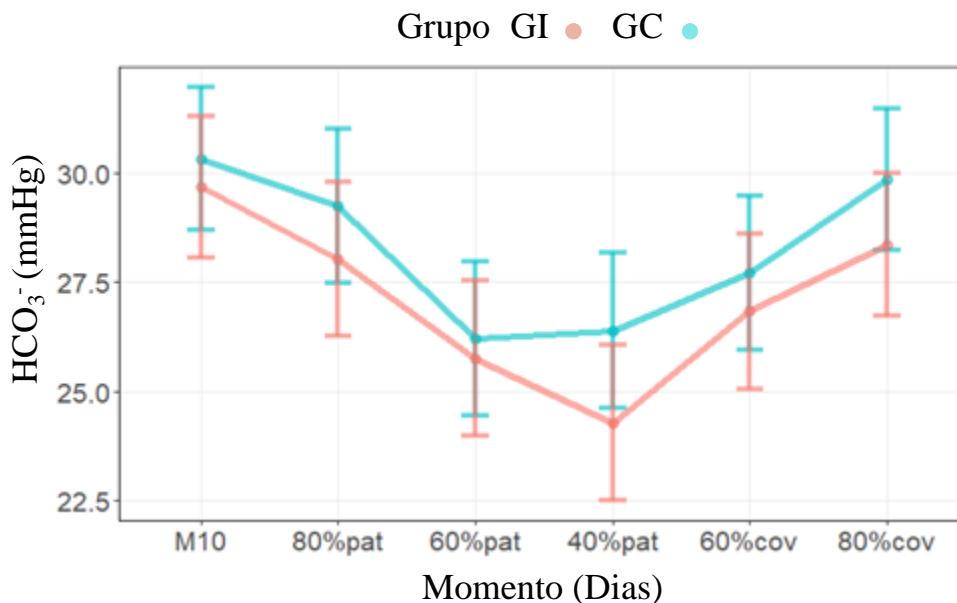


Figura 26. Dinâmica das concentrações de bicarbonato (HCO_3^-) sanguíneo do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

Endossando os resultados encontrados, Oliver et al., (1994) observaram uma tendência de aumento do pH quando houve redução do VG e aumento da riquetsemia. Os autores também não verificaram aumento na concentração de HCO_3^- ao utilizar novilhos inoculados com a cepa gacheta 83 de *A. marginale*, Colômbia. Além disso, os autores observaram aumento significativo do excesso de base após o pico da anaplasmosse. Também foi observado que os dois animais que vieram a óbito tiveram maior pH, HCO_3^- , indicando que houve alcalose respiratória.

Wright et al., (1982) observaram alcalose metabólica e alcalose respiratória em bezerros com *Babesia bovis*. Esses bezerros tiveram maior pH e HCO_3^- . Os autores também verificaram redução da PaCO_2 concomitante à redução do VG.

Na Turquia, Temiz et al. (2013) determinaram o pH, TCO_2 , HCO_3^- e PaCO_2 de bovinos de diferentes idades infectados com *Theileria annulata*, que foram divididos em grupos de acordo com o VG. Não houve variação no pH sanguíneo com a variação do VG. O TCO_2 e HCO_3^- reduziram apenas nos animais que apresentaram média de 11% de VG. Também verificaram redução da PaCO_2 com a diminuição do VG.

Allen e Kutler (1981) observaram maior pH sanguíneo em bezerros esplenectomizados e inoculados com *A. marginal* (pH=7,48) em relação ao grupo controle (7,38). Os autores verificaram pH ácido nos bezerros que não sobreviveram. Isto indica que não houve compensação metabólica.

Em contrapartida, Alsaad e Alimam (2013) conduziram um estudo no Iraque com 167 bovinos (2 a 5 anos) com infecção clínica natural por *A. marginale* (VG 22%) e com 20

bovinos clinicamente saudáveis (VG 34%) como controle. Os valores de pH (7,53 x 6,93), PCO₂ (46,91 x 39,6mm/Hg) e bicarbonato (26,6 x 20,8 mEq/L) foram menores para o grupo doente. Contudo, foi realizado apenas uma coleta e não foi determinado em qual período da doença o animal estava.

1.24. Lactato

Embora, as principais causas de hiperlactemia sejam as anemias graves e as hipóxias (Luft, 2001) não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) nas concentrações médias de lactato entre os grupos (Tab. 7), porém, os valores médios de lactato ficaram acima dos valores de referência. Possivelmente esse fato se deve a hipóxia ter sido compensada pelo aumento da frequência respiratória, sendo demonstrado pela maior PaCO₂. Com isso possivelmente não ocorreu metabolismo anaeróbico nos tecidos para produzir lactato.

As principais causas de hiperlactemia são as anemias graves e as hipóxias ((Luft, 2001). Stanley *et al.* (1988) observaram maior teor de lactato em cães com hipóxia induzida com anestésicos em relação ao grupo controle. Porém, não havia como os animais compensarem, uma vez que a depleção era exatamente pulmonar.

Tabela 7. Concentrações médias (M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas de lactato (Lact) durante o período de patência (Pat) e período convalescência (Cov) de bezerros inoculados com *A. marginale* (GI) e dos bezerros do grupo controle (GC).

Momentos		-4	9		14		17		21		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		
Grupo		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Lact	GI	27,72	6,08	26,68	3,59	20,52	2,83	22,84	2,79	21,87	5,59	19,89	4,47	19,21	2,77	26,04	8,90	17,78	7,75	12,65	3,90
(mg/dL)	GC	30,19	6,10	24,19	12,97	26,39	3,27	22,30	4,37	22,76	3,97	24,30	6,31	21,44	4,61	26,41	7,45	20,82	4,64	14,86	4,43

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos ($p \leq 0,05$). O intervalo de referência para lactato é 5 a 20 mg/dL (Radostits *et al.*, 2007)

1.25. Uréia e creatinina

Não houve diferença nas médias das concentrações séricas da uréia e da creatinina durante o período de pré inoculação e PPP ($p \geq 0,05$). Além disso, não foram observadas variações na creatinina durante o PP e CV (Tab. 8). No entanto, as concentrações médias de ureia foram maiores ($p \leq 0,05$) no período de 40% de patência no grupo inoculado (Figura 27). Salienta-se ainda, que as médias do grupo inoculado ficaram acima do intervalo de referência nos momentos de 80%, 60% e 40% de patência.

Uma das possíveis causas para esse achado pode ser a liberação de catabólitos da hemoglobina pelas células do sistema monocítico fagocitário, sobrecarregando a função hepática (Kaneko *et al.*, 2008), uma vez que, a ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia. Endossando essa hipótese, Coşkun *et al.*, (2012), observaram aumento das enzimas hepáticas AST, GGT, e ALT no grupo com *A. marginale*, indicando uma

disfunção hepática. Além disso, o catabolismo proteico devido a diminuição dos ácidos graxos voláteis, por redução do consumo, pode ser a causa do aumento das concentrações de uréia. Isso ocorre devido a gliconeogênese a partir de aminoácidos musculares que tem como consequência a formação da uréia (Kerr, 2002).

Coelho (2007), verificou alta correlação entre a queda do VG e o aumento da ureia. Allen *et al.* (1981), também observaram maiores médias de ureia para o grupo doente.

Uma possível desidratação também poderia levar o aumento da uréia, porém em quadros de desidratações esse elevação também é acompanhado com o aumento da creatina, porém tal quadro não foi observado no presente trabalho.

Tabela 8. Concentrações médias(M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas da uréia e creatinina (CRT) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) de bezerros inoculados com *A. marginale* (GI) e bezerros do grupo controle(GC).

Momentos		-4		6		14		21		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
Uréia (mg/dL)	GI	23,22	7,43	18,26	3,05	21,92	6,50	22,29	3,30	28,80	7,17	27,88	1,36	39,7a	12,46	26,44	8,47	20,76	4,16	6-27
	GC	18,75	7,01	16,38	6,29	19,64	5,56	25,56	4,41	24,78	7,10	24,49	9,85	25,49b	8,95	20,61	8,98	20,66	6,19	
CRT (mg/dL)	GI	1,26	0,23	1,26	0,18	2,03	0,86	1,38	0,16	1,84	0,63	1,32	0,22	1,44	0,34	1,84	0,63	1,64	0,26	1-2
	GC	1,38	0,20	1,22	0,13	1,94	0,30	1,54	0,29	1,70	0,33	1,54	0,23	1,76	0,18	1,70	0,33	1,67	0,29	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos ($p \leq 0,05$). Intervalo de referência (IR) de acordo com Radostits *et al.* (2007).

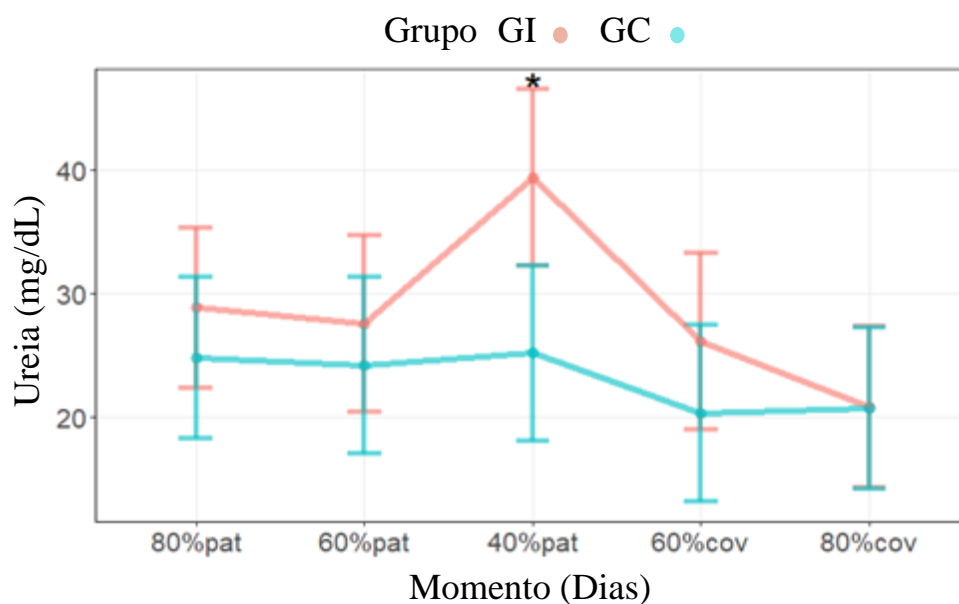


Figura 27. Dinâmica das concentrações médias e intervalo de confiança da uréia sérica em bezerros com 90 a 120 dias de vida do grupo inoculado com *A. marginale* -UFMG1 (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos

1.26. Glicose

As concentrações séricas de glicose reduziram nos momentos de 60% e 40% do período de patência (Fig. 28). Essa redução dos níveis de glicose pode ser explicada pela anorexia causada pela doença, que causa redução do suprimento adequado de glicose para os animais (Kocan et al., 2010). Ajayi et al., (1987) também observaram redução da glicose em um bezerro inoculado com *A. marginale*. Os autores justificaram essa redução pela maior utilização de glicose pelos tecidos corporais, assim a glicose foi convertida em energia para outros produtos essenciais.

Além disso, os valores de glicose foram acima dos limites de referência em todos os momentos (Tab. 9). Contudo, vale ressaltar que as amostras eram colhidas e processadas instantaneamente sem perdas na concentração de glicose por consumo.

Tabela 9. Concentrações médias(M) e desvio padrão (DP) das concentrações séricas de glicose durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) de bezerros inoculados com *A. marginale* (GI) e de bezerros do grupo controle (GC).

	Momentos	10		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR	
		Grupos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média		DP
Glicose (mg/dL)	Inoculado		82,33	6,80	82,40	4,88	77,40b	6,07	76,00b	9,77	84,20	6,22	81,33	2,88	64-76
	Controle		92,00	13,86	84,00	8,97	95,00a	7,58	91,80a	12,99	87,40	7,06	83,17	6,27	

Intervalo de referência (IR) de acordo com (Pogliani e Birgel Júnior, 2007)

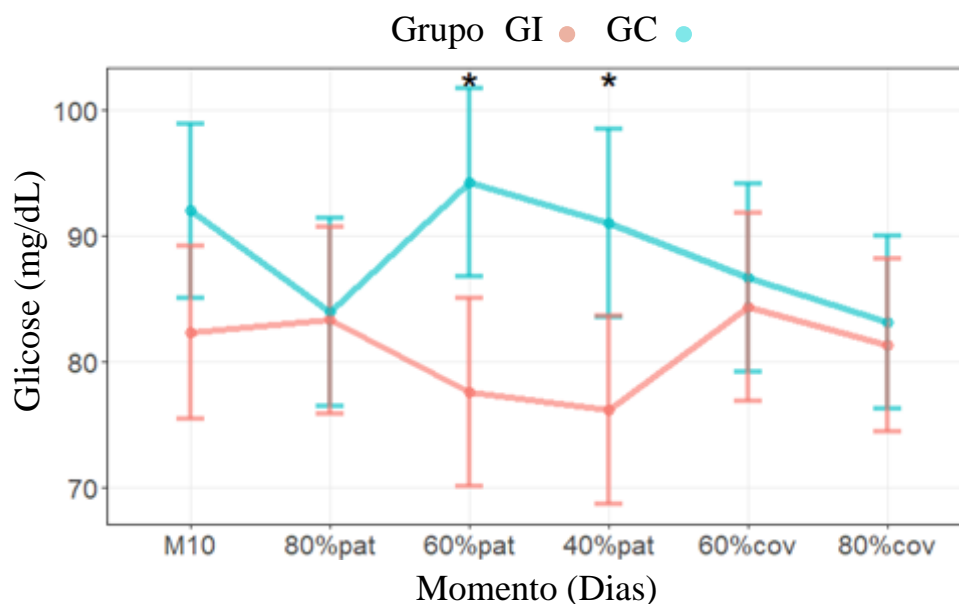


Figura 28. Dinâmica das médias e intervalo de confiança das concentrações de glicose sanguínea do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

1.27. Proteína plasmática total, albumina e fibrinogênio

Não houve diferença das concentrações da proteína sérica total (PT) entre os grupos no PPP (Tab. 10), porém, a albumina foi maior no grupo controle no momento 9 (Fig.24). Os valores de proteína total e albumina encontraram-se ligeiramente acima dos valores de referência durante todos os períodos (Tab. 10) (Kaneko et al., 2008), porém sem uma causa patológica visível.

Além disso, o grupo inoculado apresentou aumento da proteína sérica total ($P < 0,05$) no CV de 60% cov (Fig. 25). O aumento na PT, possivelmente, se deve ao aumento das imunoglobulinas, devido a uma resposta imunológica humoral contra a infecção por *A. marginale* (Brown e Barbet, 2016). Além disso, várias proteínas de fase aguda da inflamação, embora em quantidades muito baixas, aumentam devido a doença, como haptoglobulina, amiloide A sérica, citocina, e ceruloplasmina (Nazifi et al., 2012).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, apresenta redução em inflamações agudas (Murata et al., 2004). No entanto, não houve variação das concentrações médias de albumina durante o PP e CV.

Ajayi et al., (1987) não observaram diferenças nas médias de PPT em um bezerro inoculado com *A. marginale*, porém, observaram inversões em proporção das duas principais proteínas, aumento de globulina e a redução de albumina.

Apesar das concentrações de proteínas séricas apresentarem valores altos no grupo infectado por *A. marginale*, Coşkun et al. (2012) não verificaram diferença estatística na PPT entre bovinos saudáveis e bovinos infectados com *A. marginale*. Da mesma forma,

na Índia, Ashuma *et al.* (2013) não observaram variação na PPT e na albumina em bovinos infectados com *A. marginale* em relação ao grupo controle.

Todavia, outros autores observaram menores valores da PPT em bezerros com *A. marginale* (Coelho, 2007; Bernardo et al., 2016). Isto pode estar relacionado a casos mais graves com maior período de convalescência, levando a baixo consumo de alimento e, conseqüentemente, de aminoácidos.

Não houve diferença ($P \geq 0,05$) das concentrações de fibrinogênio entre os dois grupos. Isso pode ter ocorrido em consequência do aumento das médias de fibrinogênio para os dois grupos (Tab. 10) que podem ser devido a outros processos inflamatórios. exemplos animais apresentaram flebites da veia jugular, observadas ao longo do experimento, em consequência de muitas coletas de sangue no mesmo local por longos períodos. Os bezerros apresentavam espessamento, dor e aumento de consistência das veias jugulares, caracterizando uma flebite.

Além disso, Nazifi *et al.* (2012) observou que o fibrinogênio não demonstrou ser uma boa proteína de fase aguda para avaliação inflamatória na anaplasiose .

Tabela 10. Concentrações médias (M) e desvio padrão (DP) das concentrações sanguíneas de proteína sérica total, albumina (Alb) e fibrinogênio (Fib) durante o período de patência (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) de bezerros inoculados com *A. marginale* (GI) e grupo controle(GC).

Momentos	Grupos	-4		2		9		14		17		21		Pat 80%		Pat 60%		Pat 40%		Cov 60%		Cov 80%		IR
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	
PT (g/dL)	GI	8,29	0,65	7,81	2,83	8,92	2,08	10,78	1,55	8,85	1,73	9,16	0,25	10,95	1,32	9,41	1,07	10,55	1,27	13,19a	1,91	10,77	1,86	6,7-7,4
	GC	7,47	0,82	7,78	3,14	10,85	1,45	9,08	1,45	9,97	1,51	22,42	33,61	9,67	1,06	10,07	1,27	9,65	1,45	9,28b	1,28	9,55	1,52	
Alb (g/dL)	GI	3,90	0,45	3,39	1,45	3,73b	1,00	4,65	0,46	3,69	0,58	3,97	0,18	4,31	0,57	3,45	0,52	3,76	0,21	4,84	0,60	4,29	0,80	3,03-3,55
	GC	3,66	0,44	4,10	1,31	4,97a	0,56	4,30	0,76	4,39	0,64	4,23	0,54	4,02	0,81	4,09	0,74	4,01	0,51	3,87	0,56	4,23	0,64	
Fib (mg/dL)	GI	<100	0	360	167	560	328	680	178	600	219	366	150	550	300	400	282	360	89	450	191	466	301	300-700
	GC	<100	0	200	0	366	265	566	233	433	233	300	167	533	305	680	438	520	228	600	282	466	163	

*Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem entre grupos ($p \leq 0,05$). Intervalo de referência (IR) de acordo com (Kaneko et al., 2008).

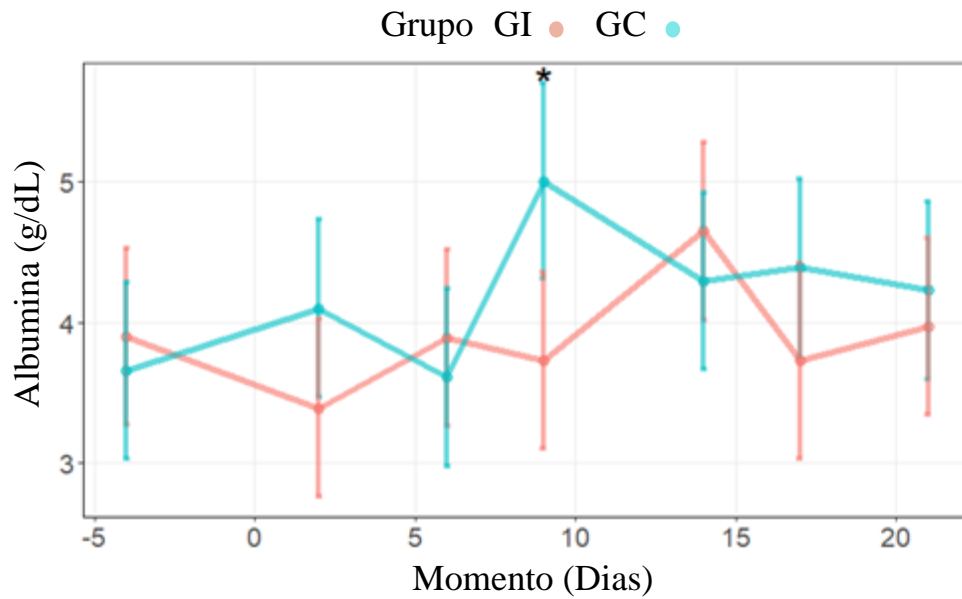


Figura 29. Dinâmica das concentrações médias e intervalo de confiança da albumina sérica do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

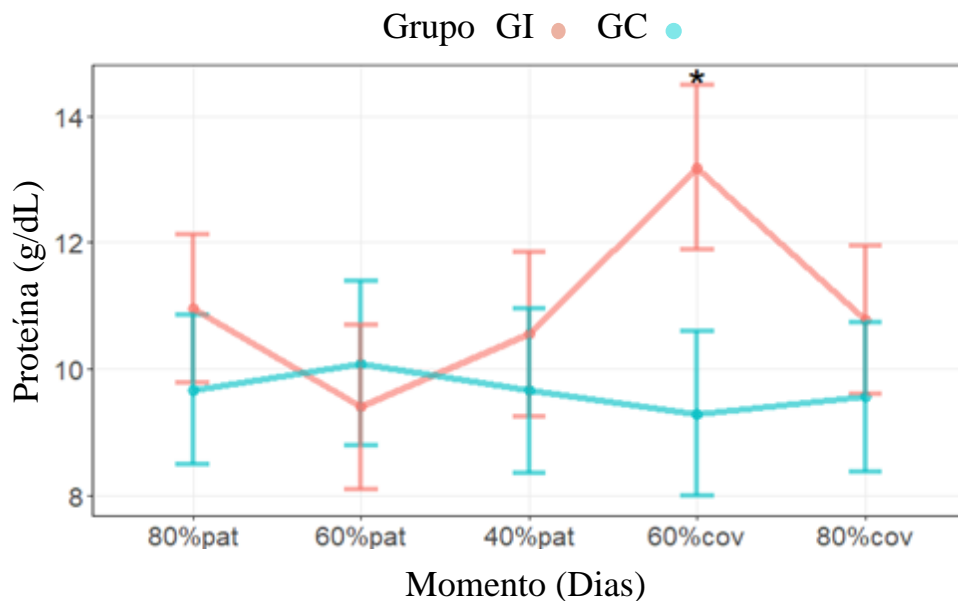


Figura 30. Dinâmica das concentrações de proteína sérica total do grupo inoculado (GI) e do grupo controle (GC) durante o período patente (PP= Pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= Cov 60 e 80%).

(CV= Cov 60 e 80%). Médias com * representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho mostraram que a anaplasnose se caracterizou por causar uma importante anemia nos animais, levando a hipóxia. A resposta a esta hipóxia se caracterizou por dois eventos importantes. O primeiro foi a resposta na produção de eritrócitos, inclusive em detrimento da produção de leucócitos. É interessante observar o quadro de anemia regenerativo que se instala. A outra grande resposta à hipóxia é a alcalose respiratória, caracterizada como a redução primária da PaCO_2 , com elevação do pH e redução variável na concentração de HCO_3^- . Essas alterações ocorreram no presente trabalho durante o PP da anaplasnose e, possivelmente ocorram de forma semelhante nos casos naturais. Nas fazendas os casos quase sempre são graves pois somente são diagnosticados quando há alterações de comportamento, ou seja, quando já existe uma grave anemia. Além disso existe uma cultura de se tratar apenas o agente etiológico, sem cuidados com as consequências da anaplasnose como a anemia e alcalose respiratória.

A quebra do paradigma de que as anemias causam hipóxia acarretando somente acidose metabólica foi importante, uma vez que, possibilita a reformulação de melhores tratamentos e monitoramentos para os animais acometidos com a doença.

Segundo Di Bartola (2000), em casos de alcalose respiratória o principal tratamento é a retirada da causa da hipocapnéia. Esse autor não elucida a fluidoterapia como um possível tratamento para esse distúrbio. Porém, a fluidoterapia pode ser importante para restauração da glicemia, visto que os animais apresentaram redução da glicose devido a diminuição do consumo. Além disso, a fluidoterapia melhora a perfusão renal e resulta na excreção de metabólitos tóxicos formados durante a doença devido a inflamação e a destruição eritrocitária causada pela anaplasnose.

A retirada da causa da hipocapnéia, elucidada por Di Bartola (2000), pode ser realizada pela transfusão sanguínea em casos graves. Além disso, outra alternativa, é a prevenção de quadros clínicos graves causados pela anaplasnose. Isso pode ser feito através do monitoramento diário dos animais pela inspeção, consumo de alimento, temperatura retal, volume globular e diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo.

Ademais, são necessários mais estudos que revelem as causas da grave anemia imunomediada, bem como a contribuição da inflamação e do stress oxidativo na patogênese da anemia observada nos casos de anaplasnose.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- ✓ Durante a fase de patência da anaplasmosose, ocorre alcalose respiratóri.
- ✓ A anaplasmosose não influenciou o perfil hidroeletrólítico durante a fase de patência e convalescência.

REFERÊNCIAS

- AJAYI, S. A.; OYETUNDE, I. L.; OGBONNA, G. A.; *et al.* Bovine anaplasmosis: clinical, haematological and blood biochemical changes in experimentally infected Nigerian cattle. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, v. 40, n. 1, p. 41–47, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3444964>>.
- ALLEN, P.; KUTTLER, K. L. Effect of *Anaplasma marginale* Infection upon Blood Gases and Electrolytes in Splenectomized Calves. *J Parasitol*, v. 67, n. 6, p. 954–956, 1981.
- ALLEN, S. E.; HOLM, J. L. Lactate: Physiology and clinical utility. *J Vet Emerg Crit Care*, v. 18, n. 2, p. 123–132, 2008.
- ALSAAD, K. M.; ALIMAM, H. M. S. Concomitant of Anaplasmosis With Acid-Base Balance , Blood Gas Analysis , Acute Phase Response and Hemogram in Cattle. v. 12, n. 2, 2013.
- AMARAL, R.V.G. *Alterações Do Equilíbrio Ácido-Base. Circulação extracorpórea*. São Paulo: [s.n.]. , 1985
- ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; *et al.* Seroprevalence fo *Anaplasma marginale* in dairy cattle and , studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros e estudos sobre a dinâmica da infecção natural em be. *Semina: Ci. Agrárias*, v. 22, n. 2, p. 155–159, 2001.
- ASHUMA; SHARMA, A.; SINGLA, L.; *et al.* Prevalence and haemato-biochemical profile of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 6, n. 2, p. 139–144, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60010-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60010-3)>.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of Bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.
- BARBOSA, M. B. G.; ALVES, C. A. D.; FILHO, H. Q. Avaliação da Acidose Metabólica em Pacientes Graves : Método de Stewart-Fencl-Figge Versus a Abordagem

Tradicional de Henderson-Hasselbalch *. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 18, n. 4, p. 380–384, 2006.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAIUJO, F. R.; *et al.* Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 513–517, 2005.

BASTOS, C. V.; PASSOS, L. M. F.; FACURY-FILHO, E. J.; *et al.* Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J*, v. 186, n. 3, p. 374–378, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.09.013>>.

BERNARDO, FÁBIO DARLAN; CONHIZAK, CLEVERSON; AMBROSINI, FRANCIELLI; *et al.* Alterações hematológicas e bioquímicas causadas por *Anaplasma marginale* em bovinos com aptidão leiteira da região Sudoeste do Paraná. *Rev Bras Ciênc Vet*, v. 23, n. 3–4, p. 152–156, 2016.

BRADLEY, G.C.; FRIEDBERG, C.R. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Am. Jour. Hemat.* v.69. p. 258-271. 2002.

BROWN, W. C. Adaptative immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. v. 35, n. 3, p. 241–252, 2012.

BROWN, W. C.; BARBET, A. F. Persistent Infections and Immunity in Ruminants to Arthropod-Borne Bacteria in the Family Anaplasmataceae. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2016. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022513-114206>>.

BYERS, S. R.; LEAR, A. S.; VAN METRE, D. C. Sodium balance and the dysnatremias. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v. 30, n. 2, p. 333–350, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.03.003>>.

CARREÑO, A. D.; ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F.; *et al.* In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet Pathol*, v. 44, n. 1, p. 116–118, 2007.

CAVINATO, CÉSAR; ABAD, CAL. Metabolismo do lactato : uma revisão sobre a bioenergética e a fadiga muscular Lactate metabolism : a review on bioenergetics and muscle fatigue. v. 11, n. 2, p. 226–234, 2009.

CAXITO, L. M. *Influência etária e nutricional na hematologia de bezerros da raça holandesa*. 2013. 104 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

CHOMEL, B. B.; CARNICIU, M. L.; KASTEN, R. W.; *et al.* Antibody prevalence of

eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). *J Wildl Dis*, v. 30, n. 1, p. 51–59, 1994.

COELHO, L. C. T. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Medicina Veterinária . Área de Concentração : Clínica e Cirurgia Veterinárias Orientador : Antônio Último de Carvalho Belo Horizonte Escola. 2007. 65 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

CORONADO, A. *Is Boophilus microplus the main vector of Anaplasma marginale? Technical note. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. [S.l: s.n.]. , 2001

COŞKUN, A.; DERİNBAEKİCİ, Ö.; GÜZELBEKTEŞ, H.; *et al.* Acute Phase Proteins, Clinical, Hematological and Biochemical Parameters in Dairy Cows Naturally Infected with *Anaplasma Marginale*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 18, n. 3, p. 497–502, 2012. Disponível em: <http://vetdergi.kafkas.edu.tr/extdocs/2012_3/497-502.pdf>.

CUNNINGHAM, JAMES G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Terceira e ed. Rio de Janeiro: Guanagara Koogan, 2008.

DE, U. K.; DEY, S.; BANERJEE, P. S.; *et al.* Correlations among *Anaplasma marginale* parasitemia and markers of oxidative stress in crossbred calves. *Trop Anim Health Prod* v. 44, n. 3, p. 385–388, 2012.

DI BARTOLA, S.P. *Fluid therapy in small animal practice*. 2nd. ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2000.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BAKKER, C.P.; *et al.* Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with neorickettsia, description of six new species combinations and designatio. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, n. 2001, p. 2145–2165, 2001.

EICKER, S. W. An introduction to strong ion difference. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v. 6, n. 1, p. 45–49, 1990. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30893-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30893-8)>.

EWING S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference, 1981, Mississippi State University, Mississippi State. Mississippi State University, p.395-423, 1981

FIGUEROA, J. V.; ALVAREZ, J. A.; RAMOS, J. A.; *et al.* Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic

diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. [S.l: s.n.], 1998

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today*, v. 5, n. 3, p. 88–96, 1989.

GALE, K. R.; LEATCH, G.; DE VOS, A. J.; *et al.* *Anaplasma marginale*: Effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. *Int J Parasitol*, v. 26, n. 12, p. 1417–1420, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751996001336>>.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Manual de Hematologia Veterinária. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, p.41-45, 2005.

GIARDINA, S.; ASO, P. M.; BRETANA, A. Antigen recognition on *Anaplasma marginale* and bovine erythrocytes: an electron microscopy study. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 38, n. 1–2, p. 183–191, 1993.

GOFF, J. P. Calcium and Magnesium Disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract Practice*, v. 30, n. 2, p. 359–381, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>>.

GOMES, O. M. *Interpretação clínica das alterações ácido-básicas e distúrbios da oxigenação*. 1. ed. Belo Horizonte: Coração LTDA(EDICOR), 1997.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol*, v. 57, n. 1–3, p. 109–119, 1995.

GUNNERSON, K. J.; SAUL, M.; HE, S.; *et al.* Lactate versus non-lactate metabolic acidosis: a retrospective outcome evaluation of critically ill patients. *Critical care (London, England)*, v. 10, n. 1, p. R22, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507145>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1550830>>.

HARVEY, J. W. *Atlas of veterinary hematology - Blood and bone marrow of domestic animals*. Philadelphia, Pennsylvania: [s.n.], 2001.

HARVEY, J.W. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. 1st Edition. St. Louis Missouri, USA.: [s.n.], 2012.

HOWDEN, K. J.; GAJADHAR, A.; W, G. D. An update on bovine anaplasmosis Cross-Canada Disease Report Rapport des maladies diagnostiquées au Canada. *Can Vet J*, v. 51, p. 837–840, 2010.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic*

Animals. 6th Edition. San Diego, California: Elsevier Inc, 2008. Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>> http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=spsD4WQbL0QC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Biochemistry+of+Domestic+Animals&ots=T_f6aJml8f&sig=sKSGfl18B1Rjre6_UTJHLMZSxbI>.

KELLUM, J. A. Clinical review: reunification of acid-base physiology. *Critical care (London, England)*, v. 9, n. 5, p. 500–507, 2005.

KERR, M. G. *Veterinary Laboratory Medicine*. Second edition. Osney Mead, Oxford OX2 0EL: Blackwell Science Ltd, 2002.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun*, v. 58, n. 4, p. 1117–1119, 1990.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; *et al.* *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, v. 129, n. SUPPL., 2004.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; *et al.* The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol*, v. 167, n. 2–4, p. 95–107, 2010.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; ALBERTO, A.; *et al.* Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14557295> <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>>.

LUFT, F. C. Lactic acidosis update for critical care clinicians. *J Am Soc Nephrol*, v. 12 Suppl 1, p. S15-9, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11251027>.

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A.; *et al.* Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. *Pesq Agropec Bras*, v. 20, n. 1, p. 135–142, 1985.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootical factor in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J*, v. 48, n. 1, p. 292–298, 1972.

MAKIMURA, S.; USUI, M. Correlation between Haptoglobin and Sialic Acid or

Mucoprotein in diseased Bovine Serum. *Jpn. J Vet. Sci*, v. 52, n. 6, p. 1245–1250, 1990.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; *et al.* Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 18, n. 1, p. 20–26, 2009.

MARÇAL, W. S. *Eritrograma de bovinos (Bos taurus, LINNAEUS, 1758), fêmeas da raça holandesa preta e branca, sadias, criadas no Estado de São Paulo*. 1989. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MELÉNDEZ, R. D. Phagocytosis of *Anaplasma marginale* infected and uninfected erythrocytes by bovine peripheral blood leukocytes. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, v. 15, n. 4, p. 305–309, 2005.

MENDONÇA, F. L. M. *Virulência Em Protocolos De Imunização De Bezerros : Análise Dos Efeitos Pós-Vacinais E Proteção Contra O Desafio Natural*. 2015. 1-69 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

MENESES, R. M. *Isolamento E Caracterização Molecular De Anaplasma marginale De Origem Congênita E Avaliação Da Virulência Em Bezerros Experimentalmente Infectados*. 2013. 48 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MUNDERLOH, U. G.; LYNCH, M. J.; HERRON, M. J.; *et al.* Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol*, v. 101, n. 1, p. 53–64, 2004.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Vet J*, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

NAZIFI, S.; RAZAVI, S. M.; KAVIANI, F.; *et al.* Acute phase response in cattle infected with *Anaplasma marginale*. *Vet Microbiol*, v. 155, n. 2–4, p. 267–271, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.024>>.

NAZIFI, S.; RAZAVI, S. M.; MANSOURIAN, M.; *et al.* Studies on correlations among parasitaemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (theileriosis and anaplasmosis) in Fars province of Iran. *Trop Anim Health Prod*, v. 40, n. 1, p. 47–53, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

OIE. Bovine anaplasmosis. *OIE Terrestrial manual*. [S.l: s.n.], 2015. v. 13. p. 1–15.

OIE. *TERRESTRIAL ANIMAL HEALTH CODE*. 46. ed. [S.l.]: Publications, World Organisation for Animal Health (OIE), 2017. v. I. Disponível em: <<https://www.oie.int/doc/ged/D10905.PDF>>.

OLIVEIRA, A. A.; DE PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da anaplasiose no estado de Sergipe. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.44, p.377- 386, 1992.

OLIVER, OLIMPO; ZANELLA, G.; MONCAYO, L.F.; *et al.* BOVINE ANAPLASMOSIS: A CLINICO-PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION. 1994, ONTARIO CANADA: [s.n.], 1994. p. 47–49.

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci* v. 44, n. 5, p. 373–383, 2007.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; *et al.* *Veterinary medicine A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th Editi ed. Edinburgh, London, New York, Oxford ,Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Joyce Rodenhuis, 2007.

RANDALL, H. T. Fluid, electrolyte, and acid base balance. *Surgical Clinics of North America*, v. 56, n. 5, p. 1019–1058, 1976. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)41030-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-6109(16)41030-3)>.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R.; SALCEDO, J. H. P. Avaliação de vacina atenuada de *Anaplasma marginale* em bezerros mantidos em piquetes. *Arq Esc Vet UFMG*, v.32, n.2, p.251-258, 1980.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. et al. Transmissão congênita da anaplasiose bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.47, p.297-304, 1995.

RIBEIRO, M. F.B.; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*, v. 61, n. 1–2, p. 31–39, 1996.

RIBEIRO M. F. B.; LIMA J.D; SALCEDO J.H.P. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 48, p. 397-402, 1996.

- RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; GUIMARÃES, A. M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, v. 70, n. 4, p. 271–277, 1997.
- RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS L. M. F. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad Tec Vet Zootec* v. 39, p. 36-52, 2002.
- RIOND, B.; WEISSENBACHER, S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; *et al.* Performance evaluation of the Sysmex pocH-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. *Vet Clin Pathol*, v. 40, n. 4, p. 484–495, 2011.
- RISTIC, M.; LYKINS, J. D.; MORRIS, H. R. Anaplasmosis: Opsonins and hemagglutinins in etiology of anemia. *Exp Parasitol*, v. 31, n. 1, p. 2–12, 1972.
- ROCCO, J. R. Diagnóstico dos Distúrbios do. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 15, n. 4, p. 184–192, 2003.
- RODRÍGUEZ, S. D.; GARCÍA ORTIZ, M. A.; HERNÁNDEZ SALGADO, G.; *et al.* *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: Dose titration against a homologous challenge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 23, n. 4, p. 239–252, 2000.
- RODRÍGUEZ, S. D.; GARCÍA ORTIZ, M. Á.; JIMÉNEZ OCAMPO, R.; *et al.* Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol* v. 9, n. 6, p. 1092–1101, 2009.
- SATTLER, N.; FECTEAU, G. Hypokalemia Syndrome in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v. 30, n. 2, p. 351–357, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.004>>.
- SILVA, J. B.; FONSECA, A. H. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Trop Anim Health Prod* v. 46, n. 2, p. 461–465, 2014.
- SMITH, B., *Large animal internal medicine*. 4th. ed. [S.l.]: Mosby Elsevier, 2009.
- SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; *et al.* Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na. *Medicina*, v. 20, n. 3, p. 97–101, 2000.
- STANLEY, W. C.; MAZER, C. D.; NEESE, R. A.; *et al.* Increased Lactate and Glucose-Turnover during Hypoxia in Anesthetized Dogs. *Faseb J*, v. 2, n. 4, p. A337–A337, 1988.
- STICH R.W.; KOCAN, K. M.; PALMER GH, *et al.* Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am J Vet Res*, v.50, n.8, p.1377-1380, 1989.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. 2a ed. Ed. Guanabara Koogan, 729 p., 2011.

TEMIZ, M.; ALTUTUG, N.; YUKSEK, N.. Relationship between degree of anemia and blood gases in cattle with theileriosis. *Turk J Vet Anim Sci*, v. 38, n. 1, p. 82–87, 2013.

THEILER, A. Further Investigations into Anaplasmosis of South African Cattle . *1st Report of the Director of Veterinary Research. Department of Agriculture of the Union of South Africa*, p. 7–32, 1911.

THEILER, A. C. M.G. *Anaplasma marginale* (Gen. and spec. nov.) The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. *Report of the Government on Veeterinary Bacteriology in Transvaal. Department of Agriculture, South Africa 1908-1909*, p. 7–64, 1910. Disponível em: <http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/10409/02a_the_p007-029.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; *et al.* *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Second Edi ed. Ames, Iowa: [s.n.], 2012.

TODOROVIC, R.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. Part II. Evaluation of cryo-preserved vaccines using different doses and routes of inoculation. *Tropenmedizin und Parasitologie*, v. 29, n. 2, p. 210—214, 1978. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/675843>>.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. S.; SOUSA, M. G.; *et al.* Frequência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. *Ciência Animal*, v. 21, n. 2, p. 119–125, 2011. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo13_2011.pdf>.

VIDOTTO, ODILON; MARANA, E. R. M. Anaplasmosse bovina: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Controle. 1999, [S.l: s.n.], 1999. p. 98–106.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciênc Rural*, v. 3, n. 2, p. 361–368, 2001. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/331/33113587028.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/pdf/cr/v31n2/a28v31n2.pdf>>.

WAGHELA, S. D.; CRUZ, D.; DROLESKEY, R. E.; *et al.* *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Vet Parasitol*, v. 73, n. 1–2, p. 43–52, 1997.

WAMSLEY, H. L.; ALLEMAN, A. R.; JOHNSON, C. M.; *et al.* Investigation of endothelial cells as an *in vivo* nidus of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Vet*

Microbiol, v. 153, n. 3–4, p. 264–273, 2011. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.035>>.

WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. Rickettsial and chlamydial disease of Domestic animals. England: Pergamon Press Ltda, 1993. c.3, p.65-87.

WANER, T.; MAHAN, S.; KELLY, P.; *et al.* Rickettsiales. In: GYLES, CARLTON L. *et al.* (Org.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Fourth Edition. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2010. p. 651.

WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, JANE K. (Org.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th Edition. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2010.

WRIGHT, I.G.; WALTISBUHL, D.J.; MAHONEY, D.F.; *et al.* Acute Babesia Bovis Infections: Metabolic and Blood Gas Changes During Infection. *British Vet J*, v. 138, n. 1, p. 61–69, 1982. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007193517311910>>.

Anexo 1. Média (M) e desvio padrão e valores de P da temperatura retal durante o período pré patente, patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados (GI) com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle (GC).

Momentos		-1		0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
Grupos		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Temperatura (°C)	GI	38,02	0,30	38,05	0,48	38,35	0,36	38,29	0,33	38,67	0,38	39,22	0,59	38,48	0,25	39,00	0,72	39,10	1,11	39,82	1,05	39,05	0,57	39,25	1,05	38,82	0,22
	GC	38,22	0,76	38,00	0,43	38,17	0,20	38,20	0,34	38,07	0,25	38,58	0,25	38,25	0,50	38,42	0,28	38,23	0,26	38,58	0,23	38,27	0,26	38,63	0,15	38,53	0,23
	P	0,42	0,84	0,46	1,00	0,02	0,01	0,35	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Momentos		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21	
Grupos		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Temperatura (°C)	GI	38,87	0,70	38,47	0,58	38,85	0,25	38,65	0,39	38,80	0,88	38,58	0,28	38,48	0,26	38,13	0,44	38,23	0,64	38,72	0,44
	GP	38,48	0,32	38,25	0,39	38,67	0,44	38,58	0,31	38,33	0,22	38,53	0,36	38,60	0,34	38,75	0,90	38,23	0,33	38,58	0,30
	P	0,12	0,38	0,46	0,79	0,06	0,84	0,64	0,01	1,00	0,59										

Momentos		PP80%		PP60%		PP 40%		CV60%		CV 80%	
Grupos		M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Temperatura (°C)	GI	39,5	0,5	39,9	0,2	40,3	0,1	38,7	0,1	38,4	0,3
	GC	38,9	0,4	38,8	0,3	38,6	0,6	39,0	0,8	38,4	0,3
	P	0,024857	0,000131	0,000001	0,262870	0,8					

Anexo 2. Média (M) e desvio padrão dos leucócitos totais (WBC), linfócitos (10³/μL e %) e células mistas (10³/μL e %) durante o período pré patente, patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados (GI) com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle (GC).

Dias		-4	-1	0	1	2	6	7	9	12	14	15	17	19	21														
Grupos		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D														
Leucócitos totais	I	9,80	3,49	10,18	2,48	10,88	2,80	12,05	3,29	11,17	3,64	8,18	3,19	7,43	1,72	8,37	3,14	7,55	0,87	8,57	1,79	8,55	2,64	10,25	3,45	10,55	4,00	10,85	10,85
	C	8,80	1,54	9,30	1,28	10,42	3,97	9,97	2,49	10,15	4,45	10,05	2,48	9,45	2,88	8,73	2,34	9,68	2,13	9,95	1,39	8,68	1,56	8,55	2,09	7,97	3,29	10,38	10,38
Linfócitos (10 ³ /μL)	I	4,87	1,17	5,12	1,08	5,22	0,95	4,97	0,86	5,04	0,91	4,01	1,27	3,61	1,38	4,60	1,30	3,97	0,87	4,60	1,29	4,09	1,00	4,95	1,70	5,25	2,09	6,54	6,54
	C	4,76	0,99	4,90	0,92	4,83	1,48	4,52	1,04	4,61	1,41	4,89	1,31	5,08	1,54	4,69	1,32	5,19	1,22	5,75	1,38	4,81	1,19	4,76	1,50	4,69	1,77	5,45	5,45
Linfócitos %	I	51,98	9,15	51,30	9,04	49,43	8,79	42,78	8,20	47,63	10,50	50,10	6,75	47,35	10,10	56,62	8,40	52,67	10,69	53,65	10,90	48,90	7,67	49,83	10,98	51,88	14,00	60,20	8,96
	C	54,63	11,45	53,50	12,39	48,35	10,15	46,70	8,95	47,73	9,81	48,67	5,24	53,88	4,53	53,78	3,76	53,85	7,64	57,38	8,49	55,30	8,18	55,02	6,74	59,40	6,00	53,92	10,84
Células mistas (10 ³ /μL)	I	4,93	2,44	5,07	1,64	5,66	2,32	7,08	2,74	6,13	2,95	4,17	2,08	3,82	0,62	3,77	1,98	3,58	0,91	3,97	1,29	4,46	1,83	5,30	2,48	5,30	3,09	4,31	4,31
	C	4,04	1,31	4,40	1,60	5,59	2,96	5,44	1,99	5,54	3,35	5,16	1,40	4,37	1,47	4,04	1,13	4,49	1,47	4,20	0,92	3,87	0,94	3,79	0,86	3,28	1,70	4,93	4,93
Células mistas %	I	48,02	9,15	48,70	9,04	50,57	8,79	57,22	8,20	52,37	10,50	49,90	6,75	52,65	10,10	43,38	8,40	47,33	10,69	46,35	10,90	51,10	7,67	50,17	10,98	48,12	14,00	39,80	8,96
	C	45,37	11,45	46,50	12,39	51,65	10,15	53,30	8,95	52,27	9,81	51,33	5,24	46,12	4,53	46,22	3,76	46,15	7,64	42,62	8,49	44,70	8,18	44,98	6,74	40,60	6,00	46,08	10,84
Bastonetes	I	1,17	1,47	0,50	0,55	0,17	0,41	0,17	0,41	0,50	0,84	0,33	0,82	0,33	0,52	1,33	1,21	0,50	0,55	0,17	0,41	0,50	0,84	0,83	1,17	1,40	2,07	0,33	0,52
	C	0,00	0,00	0,33	0,52	1,00	2,45	0,33	0,82	0,67	0,52	0,67	0,82	0,83	1,17	0,00	0,00	0,33	0,52	0,00	0,00	0,17	0,41	0,17	0,41	0,40	0,55	0,00	0,00
Segmentados	I	33,00	10,97	38,67	12,77	38,17	13,83	51,33	11,94	38,67	13,22	43,00	8,99	44,50	11,64	33,83	9,75	38,17	13,88	35,83	10,83	39,17	7,57	39,33	12,36	36,00	8,75	27,17	12,50
	C	38,33	19,64	44,00	18,71	47,33	15,98	49,33	16,08	45,00	14,51	44,33	13,44	44,50	11,22	46,80	16,75	40,67	12,83	39,00	10,08	37,00	14,30	39,50	9,57	41,40	9,42	37,60	10,69

Dias		80%	60%	40%	60% cov	80% cov					
Grupos		M	D	M	D	M	D				
Leucócitos totais	I	9,58	3,02	9,24	2,62	9,58	3,12	7,32	1,72	9,25	2,95
	C	10,17	2,89	8,78	2,60	9,28	3,59	11,30	2,05	10,43	2,70
Linfócitos (10 ³ /μL)	I	6,11	2,84	5,91	2,40	6,29	2,86	4,43	3,18	5,65	4,42
	C	5,85	1,58	5,10	1,83	5,38	1,98	6,09	1,61	4,91	2,81
Linfócitos %	I	62,02	9,18	63,28	12,33	64,20	11,38	59,26	32,68	53,86	31,88
	C	57,88	8,23	57,76	8,64	58,80	4,68	53,62	7,27	50,02	25,26
Células mistas (10 ³ /μL)	I	3,48	0,85	3,33	1,28	3,29	1,05	2,89	2,53	3,66	1,57
	C	4,32	1,80	3,68	1,15	3,90	1,64	5,21	0,97	4,88	2,65
Células mistas %	I	37,98	9,18	36,72	12,33	35,80	11,38	40,74	32,68	39,26	18,31
	C	42,12	8,23	42,24	8,64	41,20	4,68	46,38	7,27	45,03	15,78
Bastonetes	I	0,17	0,41	1,50	2,38	1,40	2,61	0,00	0,00	0,00	0,00
	C	0,40	0,55	0,25	0,50	0,25	0,50	0,00	0,00	0,40	0,55
Segmentados	I	36,00	11,19	40,75	22,23	20,80	10,21	20,20	9,07	22,33	11,04

C 36,80 15,21 36,50 3,42 39,75 12,82 43,00 2,94 32,80 8,87

Anexo 3 Média (M) e desvio padrão do volume globular (VG) contagem de hemácias (RBC) e hemoglobina(Hb) durante o período pré patente, patente (PP= pat 80, 60 e 40%) e o período convalescente (CV= cov 60 e 80%) dos bezerros inoculados (GI) com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle (GC).

Momentos		-4		-1		0		1		2		6		7		9		12		14		15		17		19		21	
Grupos		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
VG (%)	I	33,33	2,80	32,00	4,52	31,00	3,16	32,00	2,45	29,43	4,54	32,67	2,25	31,67	2,34	30,50	3,02	30,17	1,94	33,17	3,66	30,50	1,64	31,33	2,07	30,67	2,42	29,83	1,47
	C	30,17	1,72	32,83	3,31	28,67	1,97	31,50	3,39	31,00	1,67	31,00	2,61	29,67	3,01	29,33	1,63	29,83	1,47	33,00	1,67	30,17	2,32	30,83	1,17	30,67	2,66	29,83	2,56
RBC (x10 ⁶ /μL)	I	9,62	1,00	9,30	1,15	9,48	1,31	9,23	0,83	9,01	0,98	9,17	0,77	8,99	0,92	8,86	0,94	8,59	0,94	9,48	1,27	8,99	0,83	8,91	1,04	8,79	0,95	8,44	0,64
	C	9,18	0,79	9,42	0,97	9,45	1,05	9,27	0,91	9,38	0,78	9,03	1,03	8,82	0,94	8,84	0,62	8,92	0,68	9,52	0,77	9,11	0,85	9,10	0,74	9,09	0,91	8,80	0,91
Hemoglobina (g/dL)	I	11,12	1,17	10,55	1,26	10,87	1,40	10,67	0,90	10,45	1,02	10,48	0,74	10,37	0,95	10,38	0,93	9,87	0,92	11,10	1,37	10,37	0,80	10,33	1,12	10,12	1,03	9,92	0,79
	C	9,80	0,89	9,90	1,01	10,00	1,19	9,90	1,06	10,03	0,77	9,58	1,10	9,57	1,09	9,57	0,72	9,60	0,78	10,47	0,70	9,92	0,86	9,93	0,55	9,88	0,83	9,73	0,60
VCM	I	35,90	1,40	35,60	1,30	35,63	1,25	35,57	1,41	35,57	1,31	35,37	1,07	35,47	1,19	35,62	1,15	35,22	1,06	35,50	1,15	35,32	1,22	35,20	1,33	35,17	1,30	35,33	1,48
	C	33,70	1,18	33,58	1,13	33,62	1,15	33,60	1,24	33,68	1,29	33,47	0,96	33,65	1,04	33,67	1,11	33,78	1,05	34,05	1,01	33,82	0,97	33,83	1,01	33,80	0,91	33,88	0,95
MHC	I	11,58	0,54	11,35	0,50	11,48	0,56	11,58	0,54	11,60	0,54	11,47	0,42	11,55	0,46	11,75	0,57	11,52	0,35	11,73	0,45	11,57	0,48	11,63	0,46	11,52	0,42	11,77	0,38
	C	10,70	0,58	10,52	0,61	10,58	0,72	10,68	0,71	10,73	0,67	10,63	0,55	10,85	0,59	10,82	0,63	10,78	0,72	11,02	0,58	10,90	0,73	10,95	0,79	10,90	0,70	11,10	0,82
MCHC	I	32,22	0,83	31,90	0,73	32,27	0,72	32,55	0,95	32,67	0,72	32,35	0,55	32,55	0,73	33,00	1,07	32,70	0,50	33,05	0,60	32,70	0,88	33,05	1,07	32,77	0,69	33,27	1,07
	C	31,72	1,36	31,33	1,33	31,48	1,48	31,80	1,47	31,82	1,52	31,68	1,09	32,23	1,12	32,17	1,39	31,88	1,57	32,35	1,19	32,25	1,61	32,38	1,92	32,27	1,68	32,83	1,85

Valores individuais do volume globular do grupo inoculado e controle durante a fase de patência e convalescência dos bezerros inoculados (GI) com *A. marginale* e dos bezerros do grupo controle (GC).

	Momentos	Pat 80%	Pat 60%	Pat 40%	Cov 60%	Cov 80%
Animais do GI	9	24				26
	12	22	17	12	17	24
	19	24	19	14	23	30
	26	24	14	10	19	27
	32	21	17	11	18	23
	41	23	13	12	19	24
Animais do GC	1	27				27
	16	29	0,3	30	30	30
	21	31	28		29	30
	24	30	31	32	31	29

27	29	31	30	28	29
55	30	32	30	30	31
