

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL EM BEZERROS
HOLANDÊS PRIMOINFESTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2013

Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL EM BEZERROS
HOLANDÊS PRIMOINFESTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

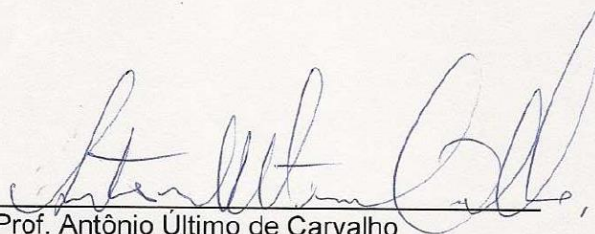
Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

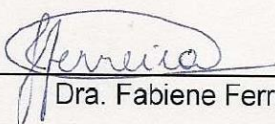
Orientador: Antônio Último de Carvalho
CO-Orientador: Elias Jorge Facury Filho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2013

Dissertação defendida e aprovada em 23 de Janeiro 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Antônio Último de Carvalho
Presidente



Dra. Fabiene Ferreira



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

“Sonhem, ainda que o sonho pareça impossível;
Suportem a dor, ainda que esta pareça insuportável;
Lutem, ainda que o inimigo pareça invencível;
Corram para onde o bravo não ousa ir;
Transformem o mal em bem,
Ainda que seja necessário caminhar mil milhas;
Amem o puro e inocente,
Ainda que seja inexistente;
E no final alcançarão aquela estrela,
Embora esta pareça inalcançável.”

-Miguel de Cervantes-

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me levar por caminhos necessários ao meu crescimento pessoal e profissional. Por me permitir compartilhar a vida com pessoas tão especiais. À Espiritualidade, por muitas vezes me auxiliar na certeza do bem como propósito.

À minha mãe, por toda a jornada, pela dedicação, pelos valores, exemplos e cuidados. Ao meu pai pela possibilidade de realização de um sonho, pelo incentivo nos estudos e pelo exemplo de dedicação à profissão.

Aos meus irmãos pela certeza da fortaleza que são; pela amizade e orgulho que me trazem.

À Patrícia, minha metade, pelo sorriso nos olhos, pelo exemplo de pessoa, por todos os momentos, por todos os desafios que juntos enfrentamos e iremos enfrentar, por todos os ensinamentos, por toda simplicidade complexa que é e por tornar minha jornada tão mais feliz.

À minha família Ferreira Moreia de Alencar Auler, pelas experiências vividas, pelo aprendizado, pelos exemplos e por serem parte de mim.

À 2004-2, por estarem sempre presentes mesmo quando distantes, trazendo boas memórias. À 2005-2, por me permitir encontrar pessoas tão especiais e, sobretudo, por permitir que eu encontrasse minha metade.

Aos amigos de Betim, por permitirem que amizades verdadeiras sobrevivam ao tempo, à ausência e à distância.

Aos meus orientadores Antônio Último de Carvalho e Elias Jorge Facury Filho, pelo convívio, pela confiança e pelo reforço diário na certeza do caminho escolhido. Por se traduzirem tão facilmente em personificações de exemplos pessoais e profissionais ao abraçarem a docência com tamanha entrega e humildade, transformando-se em nortes para nós. Permitindo-nos enxergar o quanto a retidão de caráter, o amor pelo que se faz, a simplicidade do escutar e a paciência em ensinar são inspiradores.

Aos professores Ana Luiza, Ângela, Fabiola, Guedes, Iran, Marcelo, Marcus, Monteiro, Mônica, Múcio, Paulo Paes, Rafael, Ronaldo, Sandra e Valentim pelos ensinamentos, exemplos e auxílios.

Aos amigos da Família Ruminantes Ana Carolina Werkema, Daniele Miranda, Emerson Alvarenga, Filipe Mendonça, Hélio Martins, José Zambrano, Marcela Gallegos, Moisés Freitas, Ronaldo Martins, Silvia Trindade e Tiago Facury, e em especial pelo auxílio

direto no experimento Arthur Prandi, Fernando Passon, Júlia Gomes, Juliana Lima, Leandro Caxito, Luciele Ferreira, Matheus Serafini, Pricilla Pozzatti e Rodrigo Meneses. A todos os estagiários que passaram pelo setor, nos auxiliando e estimulando a troca de conhecimentos.

À Paula Valente e ao Laboratório de Protozoologia Veterinária pelo fornecimento dos carrapatos, auxílio e convivência durante a realização deste experimento.

Aos residentes e técnicos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da EV-UFMG, pelos ensinamentos, paciência e auxílio.

Ao professor Geovanni Dantas Cassali e ao Laboratório de Patologia Comparada do ICB-UFMG, pelo auxílio e pela disponibilidade sempre que solicitado.

Aos professores Fernanda Almeida e Hélio Chiarini-Garcia e ao Laboratório de Biologia Estrutural e da Reprodução do ICB-UFMG, pelo auxílio e pela possibilidade de participar do experimento Paraíso.

À profa Marília, Marina Ferreira e ao Laboratório de Toxicologia Veterinária da EV-UFMG, pelo auxílio.

À Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, sobretudo ao Renato e ao Airton pelos diversos auxílios, principalmente no fornecimento de insumos.

A todos os funcionários da EV-UFMG, minha segunda casa, em especial à Luzete, Adão, João, Creuza, Eliane, Lili, Coco, Waguim, Carlão, Calixto, Fabim, Carlos, Edson, Garrafa, e do xerox Wagner, Helim e Tati pelo convívio e por facilitarem tanto o dia a dia na Escola.

À Fazenda São João, pela disponibilidade e parceria na disponibilização dos animais.

Aos animais, sobretudo aos ruminantes, por me permitirem a cada dia responder a um questionamento e ao mesmo tempo me fornecerem mais dois enigmas.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida e ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal pelo auxílio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
2.1.1. Classificação.....	18
2.1.2. Histórico.....	18
2.1.3. Ciclo de vida.....	19
2.2. Resposta dos bovinos à infestação pelo carrapato <i>R. microplus</i>	21
2.2.1. Resposta fisiológica.....	21
2.2.2. Anemia.....	23
2.2.3. Alterações nas proteínas séricas.....	25
2.2.4. Resposta leucocitária à inflamação.....	26
2.2.5. Linfonodos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Local e período.....	29
3.2. Animais experimentais.....	29
3.3. Infestação dos bezerros com larvas de <i>R. microplus</i>	30
3.4. Avaliação clínica, espessura da pele e espessura dos linfonodos dos bezerros infestados com <i>R. microplus</i>	31
3.5. Avaliação histológica da pele dos bezerros infestados com <i>R. microplus</i>	32
3.6. Coleta e processamento das amostras de sangue.....	34
3.6.1. Hemograma.....	35
3.6.2. Provas bioquímicas.....	36
3.6.3. Proteinograma.....	36

3.7. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Contagem de carrapatos e comportamento dos animais.....	38
4.2. Alterações relacionadas à anemia.....	41
4.3. Alterações relacionadas à inflamação.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. ANEXOS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato transaminase

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CSD – Cervical superficial direito

CSE – Cervical superficial esquerdo

EDTA – Etileno diamino tetracético ácido

FC – Frequência Cardíaca

FR – Frequência Respiratória

FOAL – Fosfatase Alcalina

g/dL – grama / decilitro

GGT – Gama glutamiltransferase

GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HE – Hematoxilina-eosina

IgM – Imunoglobulina M

IgE – Imunoglobulina E

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

MHC – Major histocompatibility complex

mL – Mililitro

μL - microlitro

PFA – Proteínas de fase aguda

PFAN – Proteínas de fase aguda negativas

SID – Sub-ilíaco direito

SIE – Sub-ilíaco esquerdo

TNF – Tumor necrosis factor

TNF α – Tumor necrosis factor alpha

TNF μ - Tumor necrosis factor mi

TPC – Tempo de perfusão capilar

VCM – Volume corpuscular médio

VG – Volume globular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
Figura 2- Representação da metodologia de avaliação da pele e linfonodos.....	33
Figura 3- Metodologia para avaliação histológica da pele.....	34
Figura 4- Contagem média de fêmeas $\geq 4,5$ mm por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	38
Figura 5- Escore de comportamento por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	39
Figura 6- Frequências cardíaca e respiratória por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	42
Figura 7- Hematócrito (%) por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	42
Figura 8- Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) e concentração plasmática de hemoglobina (g/dl) por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	43
Figura 9- Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	43
Figura 10- Escore de mucosas analisado por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	45
Figura 11- Temperatura retal média por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	46
Figura 12- Espessura da pele em cm por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	47
Figura 13- Fotomicrografia de infiltrado inflamatório perianexial observado no 37º dia pós-infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	48
Figura 14- Número médio de mastócitos em $0,628 \text{ mm}^2$ de área de pele por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	49

Figura 15- Espessura em cm dos linfonodos cervicais superficiais direito e esquerdo..	50
Figura 16- Espessura em cm dos linfonodos sub-ilíacos direito e esquerdo	51
Figura 17- Contagem de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos em esfregaços sanguíneos por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	52
Figura 18- Contagem de eosinófilos em esfregaços sanguíneos por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	53
Figura 19- Concentração sérica das proteínas totais e albumina, e relação entre as concentrações séricas da albumina e globulinas por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	54
Figura 20- Concentração sérica das globulinas por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	55
Figura 21- Concentração sérica de glicose por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato <i>R. B. microplus</i>	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Tabela 1. Hemograma (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de hemácias, VCM, CHCM e número de plaquetas) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	67
Anexo 2- Tabela 2. Leucometria diferencial (leucócitos totais, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	68
Anexo 3- Tabela 3. Proteinograma (proteína total, albumina, fibrinogênio e globulinas α_1 , α_2 , β , γ , albumina/globulina) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	69
Anexo 4- Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos (fósforo, magnésio, sódio, potássio) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	70
Anexo 5- Tabela 5. Parâmetros bioquímicos séricos (uréia e creatinina) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	71
Anexo 6- Tabela 6. Parâmetros bioquímicos séricos (AST, ALT, GGT, FoAl) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato <i>R. B. microplus</i>	72

RESUMO

Objetivou-se avaliar as alterações comportamentais, hematimétricas e a resposta inflamatória de bezerros da raça Holandês submetidos à primoinfecção experimental por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cinco bezerros holandês, aos cinco meses de vida, foram infestados experimentalmente, em três momentos distintos, com um total de 4500 larvas por animal. As larvas foram distribuídas em dois pontos na base dorso-caudal do pescoço e dois pontos paralelos próximos à base da cauda. Realizou-se, diariamente, exame clínico dos animais e mensuração da espessura da pele e dos linfonodos cervicais superficiais e sub-ilíacos direito e esquerdo. Biópsias de pele foram realizadas para avaliação histológica da resposta inflamatória local. Adicionalmente, coletaram-se amostras de sangue para análises hematimétricas, bioquímicas e proteinograma. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na contagem média de fêmeas $\geq 4,5$ mm nos picos de infestação, bem como no padrão comportamental e no escore de mucosas no decorrer da infestação. Houve variação ($p < 0,05$) das frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal e bioquímica sérica, entretanto, essas variações não apresentaram relação com os momentos de infestação. Não foram observadas diferenças no eritrograma e contagem média de mastócitos durante o período, apesar dos valores apresentarem variação condizente aos momentos de infestação ($p > 0,05$). Em contraste, essa variação não pôde ser observada nos achados do leucograma, mesmo para monócitos em que foram observadas diferenças entre alguns dias de tratamento ($p < 0,05$). No proteinograma, observaram-se diferenças estatísticas somente para as alfa globulinas, mais especificamente no 21º dia pós-infestação. Durante o período estudado, foi observada uma tendência de aumento da espessura da pele e dos linfonodos, sendo os valores mais elevados obtidos nos momentos finais da infestação ($p < 0,05$). Na análise histológica da pele, foi observado um discreto aumento de infiltrado inflamatório mononuclear perianexial após o terceiro pico de infestação. A baixa infestação de bezerros, da raça Holandês, pelo *R. microplus* é capaz de estimular uma resposta local e sistêmica, sem, contudo, produzir alterações significativas nos parâmetros clínicos e laboratoriais.

Palavras-chave: bovinos, carrapato, anemia, resposta inflamatória

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the behavioral and hematological changes and the inflammatory response of Holstein calves undergoing experimental primary *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. Five males Holstein calves, five months old, were experimentally infested at three different times. A total of 4500 larvae were placed on each calf. The larvae were distributed into two points in the dorsal-caudal base of the neck and two parallel points near the tail base. Clinical examination and measurements of the skin thickness and the left and right superficial cervical and subiliac lymph nodes were daily performed. Skin biopsies were made for histological evaluation of the local inflammatory response. In addition, blood samples for hematological, biochemical and serum proteinogram analyzes were collected. Statistical differences were found in the average count of females ≥ 4.5 mm as well as in the behavior pattern of the calves and mucosal score during the experimental period. There was significant variation ($p < 0.05$) of heart and respiratory rates, rectal temperature and serum biochemistry, however, these variations could not be associated with the time of infestation. There were no statistical differences in red blood cell counts and average mast cell counts during this period, although values had varied according to the infestation time for both variables ($p > 0.05$). In contrast, this trend could not be observed in leukogram, even in monocyte counts, which showed a significant variation among some days ($p < 0.05$). In serum proteinogram, statistical differences were observed only for alfa-globulins, more specifically at day 21 post-infestation. A trend of increasing skin thickness and lymph nodes size was observed during the experimental period, with the highest values obtained at the end of the infestation ($p < 0.05$). On histological analysis of the skin, there was a slight increase in mononuclear inflammatory infiltrate after the third peak of infestation. Low *R. microplus* infestation of calves can stimulate local and systemic host response without causing significant changes in clinical and laboratory parameters.

Key words: cattle, tick, anemia, inflammatory response

1- INTRODUÇÃO

Os carrapatos encontram-se entre os mais importantes vetores, sendo relacionados à saúde humana e de animais, tanto de produção quanto de companhia, por transmitirem grande variedade de organismos patogênicos (Jongejan e Uilenberg, 2004; Ghosh et al., 2007; De la Fuente, 2008).

Os carrapatos, ectoparasitas obrigatoriamente hematófagos, se encontram amplamente distribuídos nos rebanhos mundiais (De La Fuente, 2008), sendo responsáveis por perdas consideráveis na produção. O impacto econômico resultante das infestações é considerado um dos principais fatores limitantes para o sucesso da pecuária bovina, em várias regiões do mundo, mas principalmente em países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais (Graf et al., 2004; Jongejan e Uilenberg, 2004; Peter et al., 2005; de la Fuente et al., 2006; Jonsson, 2006).

No contexto mundial, as perdas geradas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representam cerca de 20-30% dos custos de produção (De la Fuente et al., 2006;

Ghosh et al., 2007). Estudos realizados na década de 80 (McCosker, 1979) apontaram, aproximadamente, US\$7 bilhões de dólares como sendo o valor dos gastos mundiais advindos do controle e das perdas na produção, decorrentes tanto das infestações por carrapatos como das doenças transmitidas por eles. Entretanto, de acordo com Jongejan e Uilenberg (2004), diversos trabalhos realizados desde aquela década demonstraram que estes valores estariam subestimados. Em estudo realizado por De Castro (1997), os gastos mundiais se aproximavam de US\$13,9 a US\$18,7 bilhões por ano. À semelhança dos estudos internacionais que avaliaram tal impacto, no Brasil, as pesquisas apontam uma variação dos gastos de US\$800 milhões a US\$3,9 bilhões de dólares por ano (Grisi et al., 2002; Martinez et al., 2006; Grisi et al., 2013 citado por Rodrigues e Leite, 2013).

Os prejuízos causados pelas infestações por carrapatos em bovinos estão relacionados à resposta inflamatória - local e sistêmica - do hospedeiro à picada; quadros de anemia em

decorrência da espoliação sanguínea ocasionada pelo repasto sanguíneo; gasto com produtos químicos e medicamentos (Jonsson, 2006); transmissão de diversos agentes patogênicos e infecções secundárias no sítio de ligação do carrapato ao hospedeiro (Jongejan e Uilenberg, 2004; Ghosh et al., 2007; De la Fuente et al., 2008); morte de animais susceptíveis (Martinez et al., 2006); depreciação do couro (De la Fuente et al., 2006), além do descarte e redução na produção de leite (Furlong et al., 1996; Rodrigues e Leite, 2013), no ganho de peso final (Bianchin et al., 2007) e na fertilidade do rebanho (Jonsson, 2006).

Além das perdas diretas e indiretas citadas anteriormente, é constante a observação a campo de animais jovens, recém-desmamados e introduzidos em piquetes coletivos, com alta reatividade dos linfonodos, principalmente linfonodos cervicais superficiais e sub-ilíacos. Em comum nesses animais, há a presença de infestações, em diferentes

graus, por *R. microplus*, sugerindo que tal fato esteja relacionado à resposta sistêmica observada (Carvalho e Facury Filho, Comunicação pessoal). Além disso, segundo Carvalho (Comunicação pessoal), devido à elevada incidência e ampla distribuição do carrapato *R. microplus* nas criações de bovinos, a infestação dos animais se tornou tão comum que passou a ser considerada um fato “normal” para os proprietários, que muitas vezes têm dificuldade de aceitar que perdas de produção e até mesmo casos de óbito aconteçam em decorrência da infestação. O baixo conhecimento do produtor sobre os efeitos negativos associados à infestação por carrapatos também foi relatado por Gonzales (1975), Furlong (1993), Rocha (1996) e Rocha (2005).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações comportamentais, hematimétricas e a resposta inflamatória de bezerros da raça Holandês submetidos à primoinfestação experimental por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1.1- Classificação

O Rhipicephalus (Boophilus) microplus pertence ao filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Parasitiformes, subordem Ixodida (Metastigmata), família Ixodidae, gênero *Rhipicephalus*, sub-gênero *Boophilus*, espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Flechtmann, 1990; Horak et al., 2002; Murrel e Barker, 2003).

Existem descritas 702 espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae (Guglielmone et al., 2000), que têm como características comuns o acentuado dimorfismo sexual e capítulo

na posição terminal (Arthur, 1960; Pereira et al., 2008), como observado na figura 1.

2.1.2- Histórico

De acordo com Hoogstraal (1985) citado por Delgado (2002), parasitas obrigatórios de répteis existentes no final do período paleolítico ou início do mesolítico (10000 a.C.) teriam evoluído, como uma forma de adaptação, na medida em que tais répteis foram se ramificando e habitando nichos terrestres e aquáticos. Tais evoluções teriam resultado em duas principais famílias: Argasidae e Ixodidae.

Subsequentemente a este período, mais precisamente no período terciário, os répteis foram substituídos por aves e mamíferos no papel de vertebrados

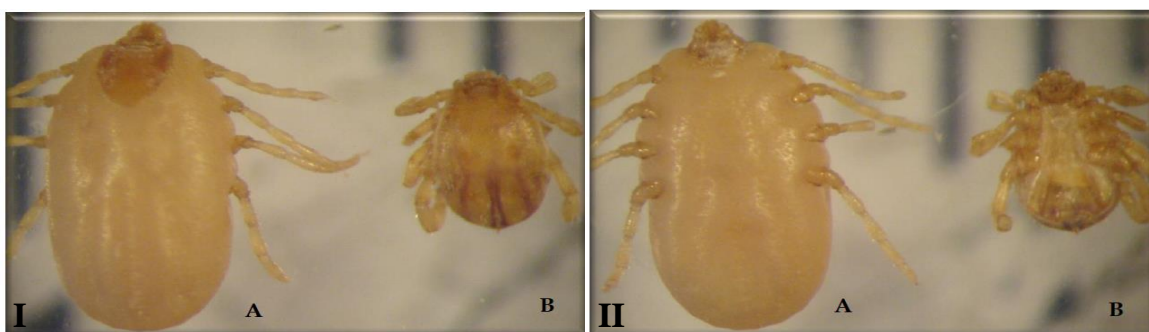


Figura 1. Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. I – Vista dorsal: A, Fêmea; B, Macho. II – Vista Ventral: A, Fêmea; B, Macho. Adaptado de Faccioli, 2011.

dominantes. Data-se desta época, o surgimento da espécie *R. microplus* na Ásia, mais notadamente na Índia e Ilha de Java (Nuñez et al., 1982), onde as características climáticas propiciaram condições favoráveis à sua sobrevivência e manutenção (Powel e Reid, 1982).

A comercialização de mercadorias e animais entre continentes, durante as expedições exploratórias descritas na história, ocasionou a disseminação do *R. microplus* e sua introdução na maioria das regiões tropicais e subtropicais (Nuñez et al., 1982). Atualmente, sua presença é observada mundialmente entre os Paralelos 30°S e 40°N, com exceção dos Estados Unidos da América (Cordovés, 1996; De la Fuente, 2008), onde foi erradicado em 1943 por táticas que associavam o controle químico dos carrapatos ao manejo da população de veados de cauda branca (Graham e Hourrigan, 1977 citado por Andreotti, 2002).

No Brasil, sua introdução parece ter acontecido em meados do século XVII com a chegada de animais vindos do Chile, via Rio Grande do Sul (Gonzáles, 1995). O carrapato *R. microplus*

encontra-se amplamente distribuído, com relatos de sua existência em 95,6% dos municípios brasileiros (Horn, 1983), sendo que em 66,04% destes, sua presença é observada durante o ano inteiro (Horn, 1984).

2.1.3- Ciclo de vida

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasita obrigatório de vertebrados, hematófago, que se encontra amplamente distribuído entre os rebanhos mundiais (Cordovés, 1997; De la Fuente, 2008). É um parasita monoxeno, isto é, depende de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (Arthur, 1960; Gonzáles, 1974), parasitando preferencialmente os bovinos, sendo o ectoparasita mais importante nessa espécie (Furlong et al., 2005). Entretanto, outras espécies animais como equinos, búfalos, ovinos, caprinos, suínos, veados, cães, gatos, coelhos, raposas, entre outros, podem ser utilizados como hospedeiros (Gonzáles, 1975).

Seu ciclo biológico pode ser dividido em duas fases complementares: a fase de vida livre ou não parasitária, e a fase de vida parasitária que compreende o

período em que o parasita se mantém no hospedeiro (Arthur, 1960; Gonzáles, 1974; Furlong, 1993).

A fase de vida livre inicia-se com a queda da teleógina do hospedeiro, que procura um lugar úmido ao abrigo do sol. Uma vez abrigada, inicia a digestão dos componentes do sangue, obtendo matéria-prima para a formação dos ovos. Os dois ou três dias iniciais após sua queda ao solo compreendem o período de pré-postura, seguido pelo período de ovipostura, com duração média de três a seis semanas, podendo cada fêmea produzir de 2000 a 3000 ovos. Dependendo das condições ambientais, ambos os períodos podem se estender por mais de 90 dias. No Brasil-Central, onde a temperatura e umidade são mais favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência do carrapato durante todo o ano, podem ocorrer até quatro gerações anuais (Furlong et al., 2005).

Subsequente ao período de postura inicia-se a fase de eclosão a qual dura em média de 22 a 30 dias, podendo, a exemplo das anteriores, se prolongar (Gonzales, 1974; Furlong 1993). Após a eclosão, as neolarvas permanecem no

chão por um período médio de dois a três dias, próximas às cascas dos ovos, aguardando o endurecimento da cutícula. Após este período, as larvas, agora infestantes, migram até a extremidade de folhas e arbustos (fototropismo positivo), onde aguardam a passagem do hospedeiro durante o dia, retornando ao solo ao entardecer. As larvas localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e pelo gradiente de concentração de CO₂ (Gonzáles, 1974; Furlong, 1993; Sonenshine, 1993).

A larva infestante, ao entrar em contato com o bovino, fixa-se nas regiões do corpo em que seu desenvolvimento é favorecido, dando início à fase parasitária (Gonzáles, 1993). As regiões de predileção para fixação das larvas são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, assim como pela dificuldade de acesso pelo hospedeiro, tais como: úbere, regiões perineal, perianal e vulvar, parte médio-lateral dos membros anteriores e posteriores e base do pescoço (Wagland, 1978).

Após se fixar ao hospedeiro, a larva passa a se chamar larva parasitária,

permanecendo assim, em média três dias, quando então se transforma em metalarva. Após o período de quatro dias, os instares sofrem ecdise, sendo então denominados ninfas. Tal estágio apresenta duração de três dias, culminando na transformação em metaninfa. Nesta fase, já existe diferenciação entre sexos, demandando, para os machos, em média três dias para sua transformação em meandro e, subsequentemente, em gonandro (dois dias), que pode permanecer no hospedeiro por mais de 38 dias. Para as fêmeas, a transformação de metaninfa em neógina acontece após quatro dias, seguida de três dias até partenógena e mais dois dias até teleógina. A queda das teleóginas inicia-se a partir do 19º dia da infestação, ocorrendo, em média, entre o 22º e 23º dias, quando então atingem o tamanho de oito a onze milímetros e o peso de 150-250 mg (González, 1993; Furlong, 1993; Rocha, 2005).

2.2- Resposta dos bovinos à infestação pelo carrapato *R. microplus*

2.2.1- Resposta fisiológica

Diversos autores relatam os efeitos locais e sistêmicos provenientes da infestação por *R. microplus*, tais como supressão do sistema imune (Wikel, 1996; Turni et al., 2002), modulação dos leucócitos (Titus et al., 2006), inibição do sistema complemento (Ribeiro e Spielman, 1986), reação inflamatória da pele (Allen et al., 1977; Carvalho et al., 2010) e anemia (Corrier et al., 1979; Hazari et al., 1991; Piper et al., 2010).

Carrapatos da família Ixodidae possuem longos períodos de alimentação, podendo ultrapassar 14 dias de duração. Esse hábito permite um amplo período de estimulação da resposta imune, tanto inata como adquirida (Ribeiro, 1987; Titus et al., 2006).

Após alcançarem o hospedeiro, as larvas se movimentam por um período de aproximadamente duas horas (Riek, 1965), quando então se fixam, iniciando, assim, a fase parasitária. Segundo Kemp et al. (1971), o número de fixações pode variar em função do grau de resistência do hospedeiro. Alguns autores relatam que a penetração do aparelho bucal do carrapato na pele estimula o

desenvolvimento de uma reação inflamatória local, sendo tal reação extremamente importante para a alimentação do parasita (Brossard et al., 1991; Veríssimo, 1991). A associação de mecanismos mecânicos (quelíceras) e químicos (enzimas citolíticas e queratinolíticas presentes na saliva) do parasita favorece a penetração de seu hipostômio na epiderme do hospedeiro, em regiões onde esta é composta apenas pela camada de Malpighi e pelo estrato córneo (Riek, 1965; Moorhouse e Tatchell, 1966).

Além da lesão mecânica, há a produção de cemento no local de fixação do parasita ao hospedeiro e inoculação de saliva no sítio de fixação (Tatchell et al., 1972; Carvalho et al., 2008). A saliva inoculada contém moléculas responsáveis pela destruição da matriz extracelular (Ribeiro et al., 2006). Tais enzimas hidrolíticas provocam uma necrose focal da derme e ruptura de capilares sanguíneos e linfáticos, resultando na formação de uma “cavidade alimentar dermal”, composta por tecido necrótico amorfo e componentes sanguíneos (Fonseca, 2000). Essa combinação entre os

eventos - irritação direta da epiderme, irritação química produzida por secreções salivares, hipersensibilidade às secreções e o trauma induzido pelo prurido - advindos da picada do carrapato, desencadeiam uma série de respostas no hospedeiro (Hazari et. al., 1991; Matzinger, 2002), como degranulação de mastócitos, aumento do número e concentração de mastócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos no sítio de ligação (Hazari et al., 1991; Inokuma et al., 1993; Ribeiro et al., 2006), além da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Algumas destas citocinas, como as interleucinas (IL1, IL6) e o fator de necrose tumoral (TNF), regulam a síntese de determinadas proteínas pelos hepatócitos, denominadas proteínas de fase aguda (Murata et al., 2004; Ceciliani et al., 2012). De acordo com Gabay e Kushner (1999), a inflamação local é a primeira resposta do sistema imune aos estímulos nocivos. Entretanto, quando infecções e injúrias sobrepõem as defesas locais, o organismo responde ativando uma série de mecanismos de defesa sistêmicos com o objetivo de restabelecer a

homeostase e promover a cura. Esses eventos sistêmicos são coletivamente denominados de reação de fase aguda (Murata et al., 2004). A reação de fase aguda pode ocorrer durante as infestações por carrapatos (Carvalho et al., 2008) em decorrência do repasto sanguíneo, sendo necessário para isso que o ínstar perfure a pele do hospedeiro.

Mudanças na composição das proteínas séricas, observadas após a injúria, representam apenas uma parte da resposta sistêmica desencadeada pelas citocinas anteriormente citadas. Observa-se também a ocorrência de febre, reatividade dos linfonodos, leucocitoses, hiperproteinemia, alterações endócrinas e redistribuição de elementos traços (Horadagoda et al., 1999; Simplício, 2011; Scott e Stockham, 2012).

2.2.2- Anemia

O *R. microplus* apresenta ritmo de alimentação definido, assim como ritmos de busca pelo hospedeiro, descolamento no hospedeiro, diapausa e postura de ovos (Oliver, 1989). As fêmeas apresentam um ciclo circadiano

de alimentação composto por períodos de salivação, ingestão e de repouso (Tatchell et al., 1972; Oliver, 1989). A atividade de sucção máxima ocorre durante a noite, diminuindo pela manhã e tornando-se quase ausente durante o dia. Este padrão comportamental é observado tanto no período de lenta alimentação das fases mais jovens quanto nas fases finais do ciclo em que ocorre um rápido ingurgitamento (Tatchell et al., 1972; Oliver, 1989). Segundo Bennett (1974) citado por Andreotti (2002), as larvas de *R. microplus* alimentam-se de plasma, sendo o sangue total utilizado apenas no momento que precede o rápido ingurgitamento das ninfas e fêmeas.

Após o acasalamento, as fêmeas iniciam o processo de alimentação e ingurgitamento com sangue. Durante a ingestão do sangue, as fêmeas separam a parte sólida (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) da parte líquida (plasma), devolvendo-a ao hospedeiro na forma de saliva. Dessa maneira, conseguem aumentar sua capacidade de armazenamento, retendo somente as proteínas que serão utilizadas na produção dos ovos (Furlong et al.,

2005). Tatchell e Moorhouse. (1968) citado por Tatchell et al. (1972) relatam que nas fases iniciais da vida adulta, as fêmeas de *R. microplus* consomem apenas 0,038 ml de sangue, quantidade esta muito inferior à observada por Tatchell et al. (1972) para o estágio final de ingurgitamento, no qual a quantidade ingerida por cada teleógina varia de 0,5 a 3 ml. Valores semelhantes foram descritos por Gonzáles (1975) e Furlong (1993).

A espoliação constante decorrente do repasto sanguíneo pode resultar em considerável perda sanguínea pelos hospedeiros, ocasionando quadros de anemia (Radostits et al., 2007). Define-se a anemia como um estado patológico em que a capacidade de transporte do oxigênio dos pulmões para os tecidos encontra-se reduzida (Cole et al., 1997). Esta redução é observada em função da diminuição do volume globular (VG) a níveis inferiores a 24%, redução do número de hemácias a valores menores que 5×10^6 céls/ μ L e/ou concentrações de hemoglobina menores que 8 g/dL (Cole et al., 1997). Diversos fatores como a idade do animal, estado físico em que este se encontra, qualidade da

alimentação, raça, tipo de sistema de produção em que o animal está inserido, além da duração e intensidade da infestação, estão relacionados ao grau de prejuízos que a hematofagia pode acarretar (Gonzáles, 1993).

A etiologia da anemia baseia-se na deficiência dos eritrócitos circulantes, podendo tal fato ser ocasionado basicamente por três formas: hemorragia, hemólise e/ou produção ineficiente de hemácias pelo organismo. Independente da causa, a anóxia anêmica é a anormalidade primária observada. Como resposta do organismo à anóxia tecidual, ocorre um aumento do débito cardíaco decorrente do incremento no volume de sangue/min e na frequência de batimentos/min, assim como uma diminuição no tempo de circulação e desvio do sangue periférico para a circulação esplâncnica. Caso esta anóxia tecidual aconteça de forma acentuada, a atividade respiratória pode sofrer um acréscimo moderado. Além disso, a diminuição da tensão de O_2 estimula a eritropoiese pela medula óssea (Radostits et. al., 2007).

A palidez das mucosas é o sinal proeminente na anemia, entretanto, esta pode ocorrer em diferentes graus sem alterações clínicas visíveis na coloração das mucosas. O grau de anemia observado nas infestações por *R. microplus* tem a sua intensidade relacionada ao grau de infestação a que o hospedeiro está submetido, sendo, principalmente na anemia crônica, os sinais clínicos observados de forma gradativa. Nos casos clínicos da anemia, observa-se palidez das mucosas, fraqueza muscular, intolerância ao exercício depressão e anorexia (Jones e Allison, 2007). A anemia, sobretudo a anemia crônica, pode resultar na dilatação cardíaca e na dilatação do anel do orifício atrioventricular. Observa-se que a dispneia não é acentuada, sendo o grau mais intenso de dificuldade respiratória caracterizada por um aumento na profundidade de respiração sem, contudo, elevar sua frequência (Radostits et. al., 2007).

2.2.3- Alterações nas proteínas séricas

Os dois principais tipos de proteínas encontradas no plasma são as globulinas e a albumina, sendo essa responsável

por 80% da pressão oncótica no sangue (Russel e Roussel, 2007; Thrall et al., 2007). Grande parte das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado a partir de aminoácidos, podendo também ocorrer síntese no sistema retículo endotelial (Kerr, 2002). As globulinas podem ser classificadas em alfa, beta e gamaglobulinas de acordo com sua mobilidade eletroforética (Scott e Stockham, 2012).

A fração alfa globulina é composta por uma globulina ligada à tiroxina, transcortina, lipoproteínas, ceruloplasmina, antitrombina III, alfa₁-glicoproteína ácida, haptoglobina e alfa₂-macroglobulina. Na fração beta globulina são encontradas outras lipoproteínas, transferrina, ferritina, proteína C-reativa, componentes do complemento, plasminogênio, e fibrinogênio (no plasma). Já na fração gamaglobulina são encontradas a maioria das imunoglobulinas, podendo algumas delas se estender para a região das beta globulinas, principalmente em respostas imunológicas com predominância de IgM (Thrall et al., 2007; Eckersall, 2010; Scott e Stockham, 2012).

A concentração das proteínas séricas é influenciada pelo equilíbrio hídrico e hormonal, estado nutricional, além de outros fatores relacionados ao status de saúde (Jain, 1993). Além de serem utilizadas na rotina clínica para avaliação da integridade hepática, função renal e, indiretamente, do status nutricional (Kaneko et al., 2008), algumas proteínas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA), são indicadores potenciais de doença ou bem-estar em animais individualmente ou no rebanho (Skinner, 2001; Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004, Ceciliani et al., 2012).

As PFA são sintetizadas pelos hepatócitos a partir de estímulos de citocinas, interleucinas (IL1, IL6) e do fator de necrose tumoral (TNF), em resposta a um processo nocivo ao organismo. Apresentam diversos efeitos como opsonização de bactérias, fungos e parasitas, leucocitose, ativação do sistema complemento, ativação de plaquetas, coagulação, entre outros. A resposta de fase aguda varia nas diversas espécies, sendo que uma proteína pode agir em maior, moderada ou menor intensidade, dependendo da

espécie animal (Horadagoda et al., 1999; Murata et al., 2004; Carvalho et al., 2008; Ceciliani et al., 2012). Segundo Taylor (2010), o aumento na concentração de fibrinogênio plasmático e haptoglobina, em ruminantes, pode ser um indicador mais sensível de um processo inflamatório agudo do que mudanças na contagem leucocitária como ocorre em outras espécies.

As PFA apresentam diferentes papéis na resposta inflamatória. Por desencadearem uma infinidade de reações que auxiliam na resposta do animal a qualquer evento estressante, as PFA possuem um alto valor diagnóstico e prognóstico (Cray et al., 2009), possuindo uma maior acurácia na distinção entre um quadro agudo ou crônico (Horadagoda et al., 1999). Sendo assim, mudanças neste perfil podem ser indicadores mais sensíveis de resolução e cura (Cray et al., 2009).

2.2.4- Resposta leucocitária à inflamação

A inflamação é a principal e mais comum causa de resposta leucocitária (Thrall et al., 2007). Os leucócitos são

as células de defesa do organismo, atuando nos processos inflamatórios e infecciosos que venham a ocorrer (Krumar et al., 2005). Nos mamíferos, os leucócitos podem ser subdivididos em dois grupos, sendo o primeiro denominado de granulócitos ou polimorfonucleares. Tal denominação deve-se ao fato de os integrantes deste grupo possuírem grânulos citoplasmáticos eosinofílicos (eosinófilo), basofílicos (basófilo) ou neutros (neutrófilo) e núcleo segmentado, quando estas células encontram-se maduras. Já no segundo grupo, composto por monócitos e linfócitos, é observada a ausência de grânulos no citoplasma e núcleo não segmentado, sendo, portanto, este grupo denominado agranulócitos ou mononucleares. Os mastócitos são considerados a parte, uma vez que dificilmente são observados em sua forma madura na circulação (Carvalho e Collares-Buzato, 2005; Jones e Allison, 2007; Thrall et al., 2007). Todas as células citadas anteriormente, com exceção dos linfócitos, são produzidas e maturadas na medula óssea (Scott e Stockham, 2012). Já os linfócitos apesar

de se originarem na medula óssea, sofrem maturação e proliferação em outros tecidos linfoides (Jones e Allison, 2007; Tizard, 2008).

Ao se iniciar o processo inflamatório, um conjunto de mediadores químicos dá início à uma série de orquestrados acontecimentos locais e sistêmicos a fim de proteger o organismo do dano sofrido. Em resposta a esses mediadores químicos, ocorre o recrutamento dos leucócitos ao sítio da inflamação. Para isto, é necessário que esses deixem o lúmen dos vasos sanguíneos, por meio da adesão às células endoteliais e posterior transmigração do endotélio, resultando em um acúmulo de células de defesa no local da injúria.

Diferentes estímulos e o tempo decorrido do início do processo estão relacionados ao tipo de leucócito presente na região. Nos processos inflamatórios agudos, os neutrófilos são as primeiras células de defesa a chegarem ao local. Por apresentarem uma reserva limitada de energia, realizam apenas um número limitado de eventos fagocíticos (Tizard, 2008). Os restos celulares provenientes da morte destes neutrófilos e do tecido lesionado

estimulam a migração para o local de linfócitos e monócitos. Neste momento, ocorre o término da fase aguda do processo inflamatório, podendo haver resolução completa, cicatrização pela substituição do tecido conjuntivo ou progressão para a fase crônica (Thrall et al., 2007). Na inflamação aguda, os eosinófilos e basófilos estão ausentes. Entretanto, nos processos em que há hipersensibilização mediada por IgE, aquelas células podem estar presentes, especialmente se existir lesão tecidual. Em ruminantes, o leucograma é uma importante ferramenta de auxílio ao exame clínico (Jones e Allison, 2007), sendo as principais respostas leucocitárias observadas nos momentos iniciais do processo inflamatório (Valli Veo, 2007). Nesta espécie, a contagem de leucócitos totais tende a apresentar valores mais altos que os valores de referência preconizados em bezerros com menos de seis meses de vida e adultos jovens, retornando a valores padrões após os três anos de idade (Kramer, 2000),

2.2.5- Linfonodos

Dentre os linfonodos distribuídos ao longo do corpo dos bovinos, será dado enfoque aos linfonodos cervicais superficiais e linfonodos sub-ilíacos.

A resposta imune deve ser cuidadosamente regulada a fim de se evitar danos ao organismo. Baseado neste contexto, os linfonodos possuem a função de fornecer um ambiente propício para a interação entre as células apresentadoras de antígenos e as células sensíveis aos antígenos (Tizard, 2008). A fim de atender a este requisito, o parênquima dos linfonodos é composto por coleções de células apresentadoras de antígeno, macrófagos, linfócitos B e T. Ao entrarem em contato com antígenos, estas células reagem montando uma resposta imunológica, na qual os macrófagos fagocitam os antígenos que chegam ao linfonodo trazidos pela linfa (Gartner e Hiatt, 2007).

Em bovinos, as orelhas, pescoço, peito e escápula constituem a área de drenagem dos linfonodos cervicais superficiais, linfonodos estes localizados cranialmente à articulação do ombro. A região posterior do tronco assim como o

segmento crânio-lateral da coxa pertencem à região drenada pelos linfonodos sub-ilíacos. Estes se encontram localizados na parte superior do terço inferior de uma linha imaginária traçada entre o íleo e a patela (Dirksen et al., 1993).

Segundo Dirksen et al. (1993), os linfonodos podem participar de processos patológicos dentro de sua área de drenagem, resultando em aumento de volume reativo ou metastático, sensibilidade dolorosa à palpação e mudança em sua consistência. Dessa forma, em caso de doença, a reatividade dos linfonodos pode indicar qual região do corpo está afetada. Esse aumento de volume, ocorre devido ao represamento dos linfócitos no interior dos linfonodos. Este represamento é ocasionado pela presença do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), resultante das interações locais entre mastócitos e antígenos presentes no linfonodo (Tizard, 2008).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento faz parte de um grupo de experimentos que tiveram seus procedimentos aprovados pelo Comitê

de Ética em Experimentação Animal (CETEA 276/10) da UFMG.

3.1- Local e período

O estudo foi conduzido na Clínica de Ruminantes, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no período de 20 de julho a 21 de setembro de 2012.

3.2- Animais experimentais

O grupo experimental foi composto por cinco bezerros machos, da raça Holandesa, com cinco meses de vida, advindos de uma fazenda de exploração leiteira situada na região metropolitana de Belo Horizonte. Após o nascimento, os bezerros foram transferidos para uma baía maternidade com piso de alvenaria, onde foram mantidos para realização da colostragem. Os animais permaneceram no local até o terceiro dia de vida, momento em que foram transportados para a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Após chegarem ao Galpão da Clínica de Ruminantes, foram alojados em instalação de

alvenaria e mantidos individualizados em sistema de *tie stall* até o término do experimento, quando completaram sete meses de idade. Os animais foram desmamados com 60 dias de vida, sendo fornecida dieta correspondente a 3,0% do peso vivo, composta por 80% de silagem de milho e 20% de ração para bezerros com 18% de proteína. A água foi fornecida *ad libitum*. Além disso, foi realizada suplementação mineral diária com 30g de sal mineral comercial.

3.3- Infestação dos bezerros com larvas de *R. microplus*

Com o intuito de evitar a ocorrência de infestações por carrapato após o nascimento, os animais foram conduzidos para baia coletiva (maternidade), com cama de feno e piso de alvenaria, permanecendo ali até o terceiro dia de vida. Após este período, até o término do experimento, os animais permaneceram em ambiente de alvenaria, individualizados em sistema de *tie stall*, sobre piso de borracha. Os animais foram mantidos livres de infestação por carrapatos mediante aplicação de banhos com produto

carrapaticida à base de cipermetrina (Flytick®, Vallée - 2L de calda/animal) a cada 15 dias. Estes banhos foram realizados até a metade do quarto mês de vida, quando se iniciou o experimento.

Paralelamente à criação dos bezerros, teleóginas de *R. microplus* colhidas de bovinos naturalmente infestados foram lavadas em água destilada, secas em papel toalha e individualizadas em placas de polietileno para realizarem a oviposição em estufas B.O.D. (Fanem, 347CD) a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 85% de umidade relativa. Decorridos 2 dias, iniciou-se a postura, sendo recolhidos somente ovos dos dois primeiros dias de postura, a fim de garantir a não contaminação desses por *Babesia* spp. (Mahoney e Mirre, 1971). Os ovos foram recolhidos com auxílio de uma espátula e transferidos para recipientes de vidro, fechados com algodão, identificados e mantidos em estufa B.O.D. no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Preventiva da EV-UFMG. Após 14 dias da eclosão, as larvas foram utilizadas para a infestação.

A infestação experimental foi realizada em três momentos distintos intervalados de sete dias sendo, dia 0, dia 7 e dia 14. Em cada infestação foram depositadas 1500 larvas por animal, distribuídas em dois pontos na base dorso-caudal do pescoço e dois pontos paralelos próximos à base da cauda. A metodologia adotada para o monitoramento da infestação baseou-se na contagem diária de todas as fêmeas adultas, $\geq 4,5$ mm de diâmetro, presentes no lado esquerdo dos bezerros como preconizado por Villares (1941) e, posteriormente, adaptado por Wilkinson (1955) e Wharton et al. (1970). As contagens foram realizadas diariamente, a partir do 15º dia do início da infestação, às seis horas da manhã (Hitchcock, 1955). A fim de classificar a infestação por animal, o resultado da contagem de fêmeas adultas ($\geq 4,5$ mm de diâmetro), acima descrito, foi multiplicado por dois (Oliveira, 1993). Para a categorização do nível de infestação, foi empregada a classificação para a raça holandesa conforme Veríssimo et al. (2004), na qual contagens de 0 a 25 teleóginas por animal são consideradas como baixa

infestação, 26 a 100, média infestação e acima de 100, alta infestação.

3.4– Avaliação clínica, espessura da pele e espessura dos linfonodos dos bezerros infestados com *R. microplus*

Durante o período experimental, foi realizado exame clínico diário dos animais pelo mesmo avaliador (Dirksen et al., 1993). Foram avaliados o comportamento, postura, apetite, e mensurados a temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória, mucosas, vasos episclerais e turgor de pele. Para a avaliação do comportamento, postura, apetite, mucosas e vasos episclerais foram empregados escores de 1 a 3. Para o comportamento, foi pontuado como escore 1 o comportamento classificado como normal, ou seja, animais calmos sem sinais de prurido ou irritação. O escore 2 foi utilizado para classificar aqueles animais que apresentaram uma agitação leve com presença de prurido e/ou lambedura discretas. O escore 3 foi caracterizado por uma maior irritabilidade, sendo observado aumento na frequência e intensidade com que os animais se coçavam e se lambiam. Para

os demais itens acima relacionados, o escore de 1 a 3 também foi aplicado, sendo atribuído aos valores abaixo do normal o escore 1, aos valores normais o escore 2 e aos valores aumentados o escore 3.

Com a utilização de um cutímetro (SUPRIVET®), foi aferida diariamente a espessura da pele, mediante medição de dobra cutânea na base caudo-ventral direita do pescoço, em área previamente demarcada por tricotomia. Além disso, foi realizada medição diária da espessura dos linfonodos cervicais superficiais direito e esquerdo e linfonodos sub-ilíacos direito e esquerdo, a partir do dia -4 (Figura 2).

A medida da espessura dos linfonodos foi obtida através da diferença entre a medição “A” e medição “B”, realizadas no ponto mais largo da região medial do linfonodo; Sendo “A” a medida do conjunto pele, musculatura e linfonodo e “B”, pele e musculatura.

3.5- Avaliação histológica da pele dos bezerros infestados com *R. microplus*

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e da Reprodução e no Laboratório de

Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG.

As biópsias de pele foram realizadas nos dias 0, 1, 10, 37 e 49. Os fragmentos de pele foram coletados da região caudo-ventral esquerda do pescoço, utilizando-se um punch de 6 mm de diâmetro (Figura 3), após prévia assepsia (iodo PVPI) e aplicação de anestésico local (2 mL de Cloridrato de Lidocaína a 2%, sem vasoconstritor). Ressalta-se que as áreas da pele onde foram realizadas as biópsias não continham carrapatos afixados.

Imediatamente após a coleta, os fragmentos de pele foram fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3 por 24 horas, sob temperatura de 4°C, e, posteriormente, processados para análise em microscopia de luz. Os fragmentos foram submetidos às etapas de desidratação em série crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), seguida das etapas de infiltração e inclusão definitiva em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica®).



Figura 2. Metodologia de avaliação da pele e linfonodos. (A) Apresentação da área de tricotomia na base caudo-ventral direita do pescoço, delimitada para aferição da espessura da pele. (B) Aproximação da área apresentada em A. (C) Linfonodo cervical superficial direito. (D) Padrão utilizado para mensuração do linfonodo cervical superficial direito com a utilização de um cutímetro. (E) Linfonodo sub-ilíaco esquerdo. (F) Padrão utilizado para mensuração do linfonodo cervical superficial direito com a utilização de um cutímetro.

Posteriormente, foram obtidos cortes histológicos de 3 μm de espessura que foram corados pelas técnicas de HE, para avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório e Azul de Toluidina Borato de Sódio para evidenciação e contagem de mastócitos.

A caracterização da evolução do infiltrado inflamatório foi realizada pela varredura horizontal do tecido corado em HE, em aumento final de 400x, utilizando Microscópio Olympus CX31. Nos tecidos corados em HE, também foi analisada a presença de outras alterações teciduais. Para a quantificação de mastócitos foram analisados 20 campos por lâmina, selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido corado

em Azul de Toluidina, em aumento final de 1000X, utilizando-se Microscópio Olympus CX31. Cada campo correspondeu a uma área de 0,0314 mm^2 , totalizando 0,628 mm^2 de área.

3.6- Coleta e processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram coletadas após antissepsia local com iodo PVPI, por meio de punção da veia jugular. Assumindo que a infestação se iniciou no dia “0”, as coletas ocorreram nos dias -8, -7, -5, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 21, 30, 39, 45 e 49, sendo obtidas, em cada dia de coleta, três amostras sanguíneas de cada animal. A primeira amostra foi coletada em tubo a vácuo de

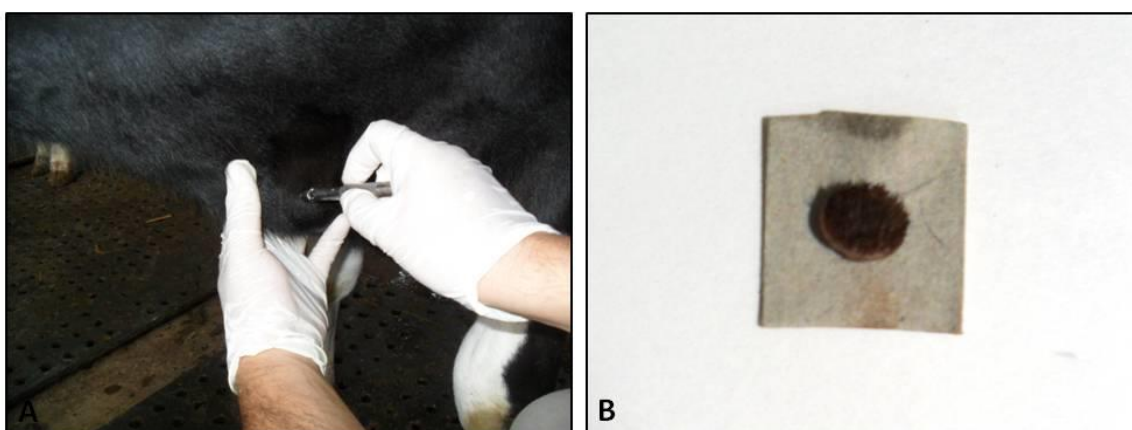


Figura 3. Metodologia para avaliação histológica da pele. (A) Biópsia de pele realizada com o auxílio de um punch, na região caudo-ventral esquerda do pescoço. (B) Fragmento de pele obtido após a biópsia.

cinco ml contendo solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% (para separação de plasma e realização do hemograma); a segunda amostra foi coletada em tubo a vácuo de cinco ml com ativador de coágulo (para separação do soro e realização das provas bioquímicas de função hepática e renal, bem como do proteinograma) e a terceira, em tubos a vácuo de cinco ml com Fluoreto de Sódio (para avaliação da glicemia). As amostras foram coletadas no período da manhã, após o fornecimento da dieta. O material obtido foi centrifugado (CentriBio 80-2B®) a 3500 rpm por dez minutos, à temperatura ambiente, sendo as amostras de soro e plasma aliquotadas em microtubos de congelamento e armazenadas a -20°C.

3.6.1- Hemograma

As contagens de hemácias, leucócitos e plaquetas foram realizadas em contador automático tipo impedância (Abacus Vet Júnior – Diatron®), padronizado para a espécie em estudo. Foram considerados os valores de leucócitos totais, hemácias, hemoglobina e plaquetas. A contagem diferencial de

leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue, realizados logo após cada coleta, em lâminas de vidro (25,4 x 76,2 mm), fixados ao ar, corados com corante hematológico rápido (Panótico Rápido – Newprov®) e analisados por microscopia de luz, conforme Harvey (2001).

A determinação do volume globular (VG) foi realizada a partir da técnica do microhematócrito, utilizando-se tubos capilares heparinizados (Glasscyto®) preenchidos com dois terços de sua capacidade com sangue homogeneizado. Estes tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por cinco minutos em centrífuga para microhematócrito (SIGMA I-15®), realizando-se em seguida a leitura dos valores em cartão de leitura para hematócrito (FANEM®). Os valores de VCM e CHCM foram posteriormente corrigidos. A concentração de fibrinogênio foi determinada pelo método de precipitação pelo calor, conforme descrito por Kaneko e Smith (1967) e padronizado por Jain (1993).

3.6.2- Provas Bioquímicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da EV-UFMG. Foram utilizadas amostras de soro previamente congeladas a -20°C em microtubos de congelamento. Avaliaram-se as concentrações de proteínas totais, albumina, glicose, uréia, creatinina, gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FOAL), alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), fósforo, magnésio, sódio e potássio. Com exceção de sódio e potássio, as demais provas foram realizadas em aparelho automático modelo Cobas Mira (Roche Analytical Instruments®), utilizando-se kits comerciais (Synermed®). Para os analitos sódio e potássio foi utilizada a técnica de fotometria de chamas (Corning-400).

3.6.3- Proteinograma

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica e de Toxicologia da EV-UFMG. As concentrações séricas das frações proteicas albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gamaglobulinas foram determinadas por eletroforese horizontal em gel de

agarose 12% e tampão TRIS (Kremers et al., 1967). Após aplicar 0,4 µl de cada soro no filme de agarose (CELMGEL®), esse foi colocado no porta filmes e o conjunto acoplado a uma cuba previamente preenchida com 80 ml de tampão Tris – pH 9,5 e temperatura entre 2 a 8° C – de forma que coincidissem os polos negativos do filme com os da cuba. Posteriormente, essa foi tampada e acoplada à fonte do aparelho SE-250 (Celm®). Foi aplicada uma voltagem de 100 volts por 30 minutos. Ao término desta etapa, os géis foram retirados das respectivas cubas e mergulhados durante cinco minutos em recipiente de vidro contendo 200 ml de solução corante negro de amido 0,1% em ácido acético a 5%. Após esse período, o filme foi colocado em outro recipiente de vidro contendo 200 ml de solução descorante de ácido acético a 5%, por igual período de tempo. Retirado o excesso de descorante, o filme foi submetido a uma corrente de ar aquecido (secador de cabelo), até que estivesse completamente seco. Uma vez seco, o filme foi colocado em um novo recipiente de vidro contendo 200 ml de solução descorante de ácido acético a

5%, permanecendo ali, até que o fundo do gel se tornasse transparente. Em seguida, o mesmo foi retirado do recipiente e novamente submetido a uma corrente de ar aquecido (secador de cabelo), até que estivesse completamente seco. A proporção de cada fração proteica foi estabelecida por meio do programa de informática SDS-60 do sistema SE-250 (CELM) após prévia leitura em scanner próprio. A concentração proteica (g/dl) foi determinada a partir da multiplicação do percentual de cada fração obtida pela concentração da proteína total.

3.7- Análise Estatística

Os dados foram avaliados no delineamento experimental em blocos ao acaso conforme modelo abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + C_j + e_{ij}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} = Observação do animal i no dia j

μ = Efeito médio geral

B_i = Efeito do bloco i , sendo i = animal de 1 a 5

C_j = Efeito do dia j , sendo j = -8, -7, -5, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 21, 30, 39, 45, 49

Todas as variáveis avaliadas foram submetidas ao teste de Lilliefors e

Bartlett para verificar a distribuição de normalidade e homocedasticidade de erros, respectivamente.

Devido à violação desses pressupostos, as variáveis VCM; Fibrinogênio e contagem média de fêmeas; e Albumina / Globulina foram transformadas pelas fórmulas $\text{Log}(Y)$, $\text{Log}(Y+1)$ e raiz quadrada, respectivamente. Os dados quantitativos que respeitaram os princípios de normalidade e homocedasticidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos resultados comparadas pelo teste de Scott-Knott (entre os dias de tratamentos), ao nível de significância de 5%. As variáveis quantitativas que violaram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, mesmo após a transformação dos dados, (temperatura retal, frequências cardíaca e respiratória, e eosinófilos) e as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn, adotando-se um nível de significância de 5%.

Para o processamento das análises utilizou-se os procedimentos dos Softwares Sistema de Análises Estatísticas (SAEG) versão 8.0 da

Universidade Federal de Viçosa e GraphPad Prisma versão 5.0.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em contagem de carrapatos e comportamento dos animais, alterações relacionadas à anemia e alterações relacionadas à inflamação.

4.1- Contagem de carrapatos e comportamento dos animais

Os dados referentes à contagem média de fêmeas $\geq 4,5$ mm e ao comportamento dos bezerros em relação

ao dia de infestação estão apresentados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) na contagem média de fêmeas $\geq 4,5$ mm nos dias condizentes aos picos de infestação, bem como mudanças no padrão comportamental no decorrer da infestação.

Na Figura 4, observa-se que os picos de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* seguem o ciclo da fase parasitária preconizado por Gonzáles (1993), uma vez que aconteceram entre o 21° e o 23° dias após as infestações (dias zero, sete e quatorze).

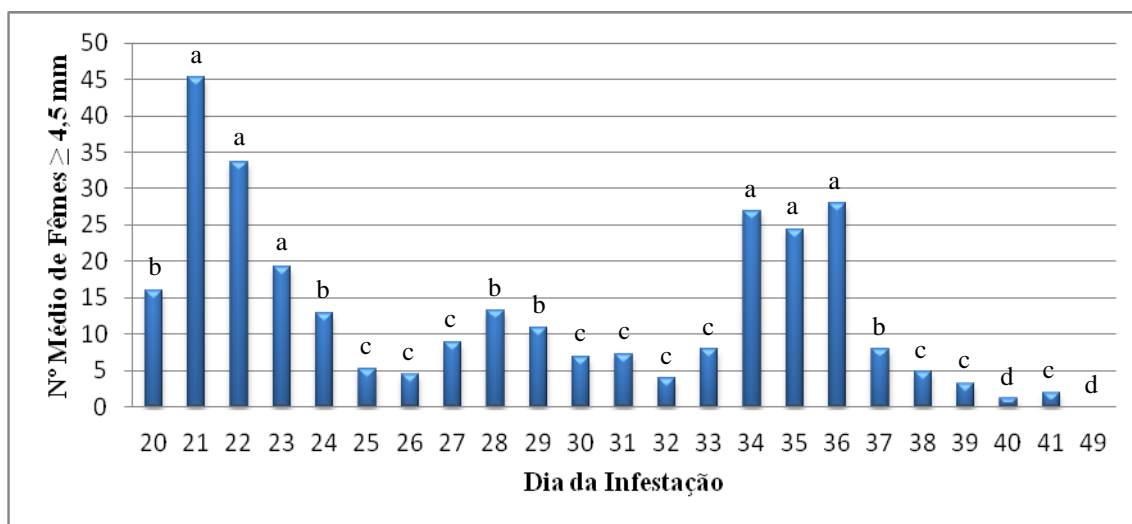


Figura 4. Contagem média de fêmeas $\geq 4,5$ mm por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas entre os dias de infestação indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Observa-se também que o número de fêmeas $\geq 4,5$ mm, obtido nos animais, ficou muito abaixo das 1500 larvas depositadas em cada um dos três dias de infestação.

No presente estudo, as porcentagens de fêmeas $\geq 4,5$ mm, em relação ao número de larvas depositadas sobre o animal nos dias das infestações, foram de 9,06% (20°-26° dia), 3,93% (27°-33° dia) e 6,86% (34°-41° dia). Essa diferença é citada pela literatura em decorrência das taxas de morte ou desprendimento dos ínstaes nas diversas etapas do ciclo biológico (Roberts, 1968a; Nuñez et al., 1972; Bennett, 1975b).

Na fase parasitária, ao contrário da fase de vida livre, os carrapatos são pouco afetados pelas condições ambientais (Hitchcock, 1955; Riek, 1965; Gonzáles, 1993). Entretanto, Roberts (1968b) afirma que os hospedeiros manifestam diferentes níveis de resistência a cada estágio da infestação pelo *R. microplus*, sendo que mais de 50% das larvas infestantes que alcançam o hospedeiro não atingem a fase adulta. De acordo com Kemp et al. (1971; 1976), no decorrer das primeiras 24 horas de infestação, as larvas podem realizar sucessivas tentativas de fixação no animal, tentativas essas que variam de acordo com o grau de resistência do

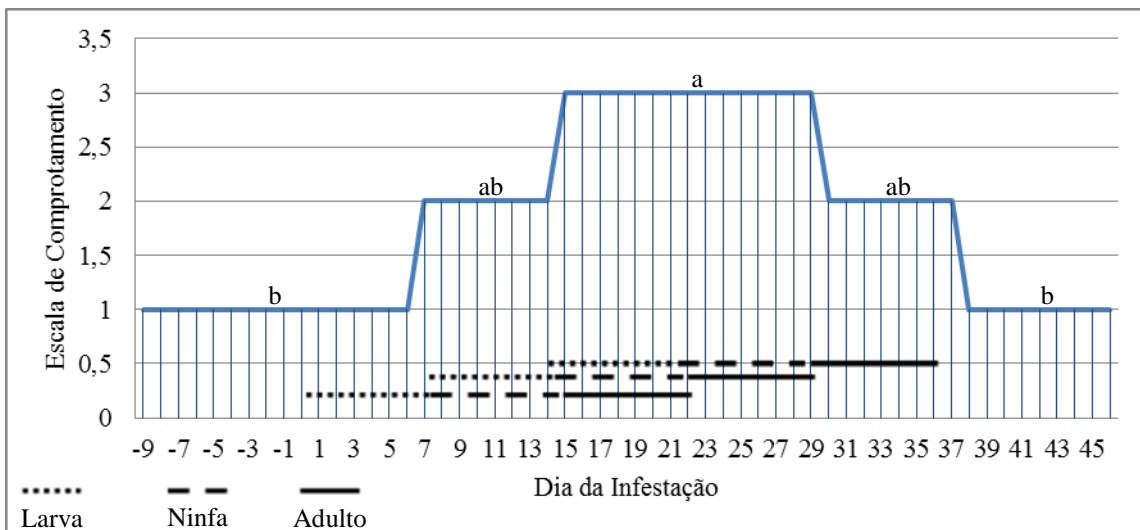


Figura 5. Escore de comportamento por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas entre os períodos de infestação indicam diferença estatística pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Escore 1: normal; Escore 2: agitação leve; Escore 3: agitação moderada.

hospedeiro. As curtas e frequentes fixações associadas à dessecação, decorrente do contato permanente com a pele dos bovinos, leva à morte de um grande número de larvas (Roberts, 1971; Kemp et al., 1976). Segundo Nuñez et al. (1972), aproximadamente 12,4% das larvas infestantes atingem a fase de ingurgitamento, sendo tal taxa de mortalidade também citada por Riek (1959) e diferente da descrita por Gonzales et. al. (1974) que observaram 7,83%. Bennet (1975a), estudando a mortalidade nos diferentes estágios do ciclo biológico, aponta perdas, tanto de larvas quanto de ninfas, principalmente nos períodos pré-muda, pelo fato de, nesses momentos, os ínstaes estarem fixados apenas pelo cimento, favorecendo, assim, sua remoção pelo hospedeiro.

Ao associar o ciclo biológico do *R. microplus* e seu comportamento parasitário a alguns fatos ocasionados no desenvolvimento do experimento, é possível levantar reflexões em relação ao padrão comportamental dos bezerros ao longo do período experimental. Ao se avaliar o comportamento dos bezerros (Figura 5), observa-se que do

início do experimento (dia -9) até o sétimo dia após a primeira infestação, os animais apresentaram comportamento normal (escore = 1). Nesta fase, os animais apresentavam-se calmos, sem sinais de prurido ou irritação. Observa-se que a quantidade de larvas utilizadas na 1ª infestação (1500 larvas) não foi suficiente para causar mudanças nos padrões de comportamento dos hospedeiros. Tal acontecimento pode ser parcialmente explicado pelo fato de os animais, por nunca terem sido expostos ao parasita, não apresentarem uma reação contrária à fixação das larvas, fixação essa que pode estimular o ato de lambedura, fricção ou prurido.

A partir do sétimo dia pós-infestação até o décimo quarto dia, observou-se um aumento no escore médio de comportamento (escore = 2), entretanto, sem diferença significativa ($p > 0,05$). Cabe ressaltar que, durante este período, ocorreu a transformação das larvas provenientes da primeira infestação em ninfas (7º e 8º dias do início da infestação) (Londt e Arthur, 1975; Gonzáles, 1993; Furlong et al., 2005), além da deposição de um total de mais

3000 larvas nos hospedeiros, divididas em duas infestações, nos dias sete e quatorze. Chama-se atenção ainda que após a ocorrência da muda, ocorre nova fixação do ínstar, que procura realizá-la próximo ao antigo local de permanência (Seifert et al., 1968). O aumento dos estímulos causados pelos fatos supracitados podem ter resultado na mudança no comportamento observado. Nova mudança comportamental foi observada a partir do 15º dia, sendo esta diferente do período inicial da infestação ($p > 0,05$). Além da repetição dos acontecimentos descritos no período do 7º ao 14º dia (muda de larvas para ninfas), o intervalo entre o 15º e o 29º dia contém a mudança das ninfas provenientes das infestações um e dois em fêmeas $\geq 4,5$ mm, o que é marcado por um aumento substancial do repasto sanguíneo, além da mudança do local de fixação destas (assim como o observado na mudança de larva para ninfa). Neste terceiro período comportamental, observou-se maior irritabilidade dos animais que passaram a se coçar e lambe de forma mais intensa e frequente.

Após o 29º dia de infestação, observou-se uma nova mudança comportamental, embora também não apresente significância estatística ($p > 0,05$). Esta redução no escore (escore = 2) pode ter sido acarretada pela diminuição dos níveis de infestação, uma vez que os picos de desprendimento das teleóginas referentes à primeira e segunda infestações ocorreram nos dias 21 e 28, respectivamente. A partir do 37º dia, o escore de comportamento atingiu o nível mais baixo, estando esta redução também relacionada à queda das teleóginas, provenientes da terceira infestação, nos dias 34, 35 e 36. Ao longo do período experimental, não foram observadas diferenças nos padrões da inspeção (condição física, condição corporal e postura), assim como do apetite.

4.2- Alterações relacionadas à anemia

Os dados referentes às frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) podem ser observados na Figura 6.

Houve variação significativa ($p < 0,05$) da FC e FR durante o período estudado, entretanto, as diferenças observadas entre os dias de tratamento não

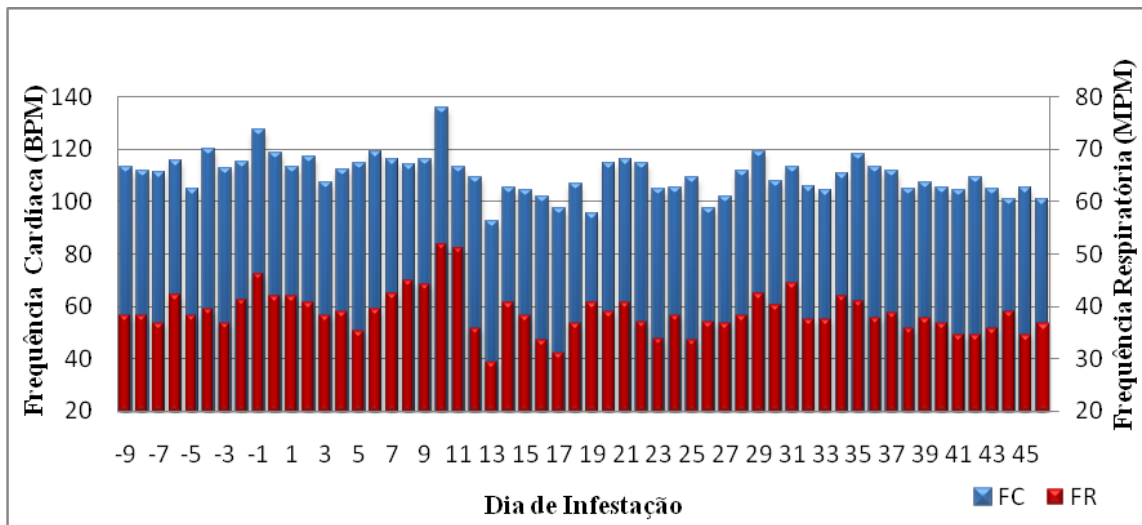


Figura 6. Frequências cardíaca e respiratória por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. BPM: batimentos por minuto; MPM: movimentos por minuto. Médias comparadas pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

apresentaram relação com os momentos de infestação, podendo essas alterações estarem relacionadas ao estresse durante o manejo dos animais.

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam os valores para hematócrito, concentração de hemoglobina, número total de hemácias e número de plaquetas.

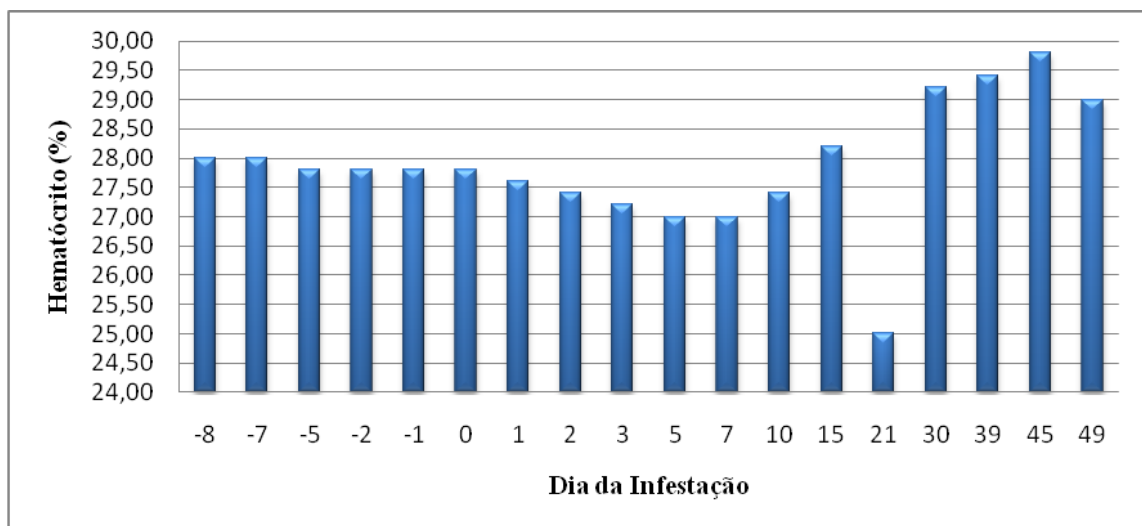


Figura 7. Hematócrito (%) por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média das porcentagens dos animais para cada dia de observação. Ausência de letras indica $p > 0,05$ pelo teste de Fisher.

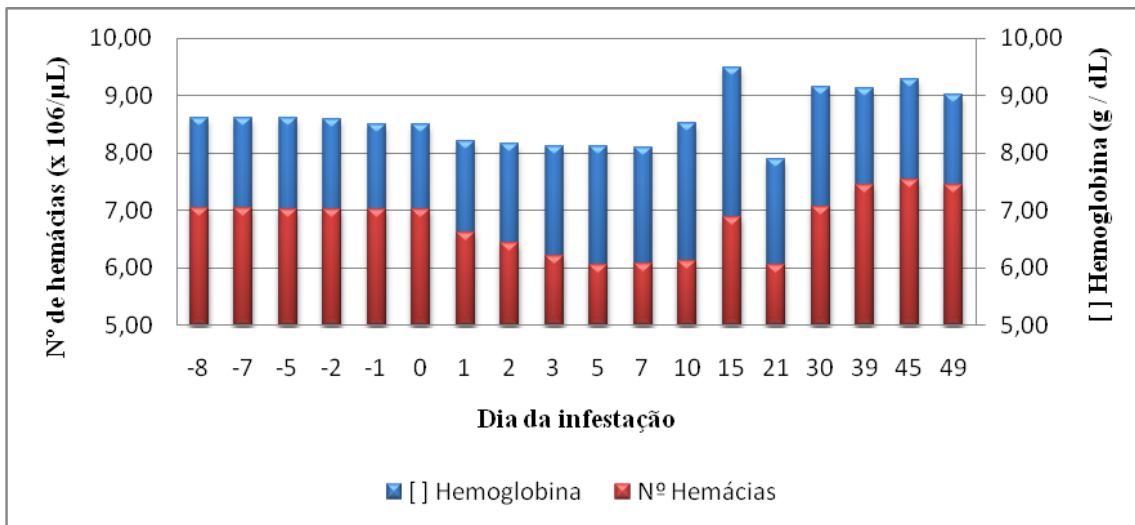


Figura 8. Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$) e concentração plasmática de hemoglobina (g/dl) por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Ausência de letras, para cada categoria, indica $p>0,05$ pelo teste Fisher.

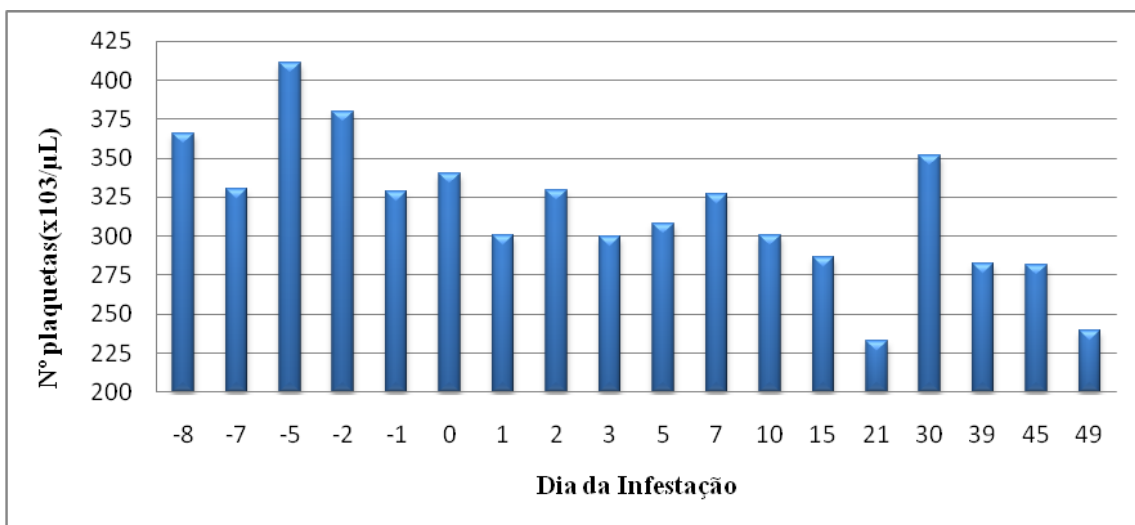


Figura 9. Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) por dia de infestação em bezerros holandeses primoinfectados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Ausência de letras indica $p>0,05$ pelo teste de Fisher.

Não foram observadas diferenças em nenhum dos itens anteriormente citados ($p>0,05$). Também não foram detectadas diferenças para os valores de

VCM e CHCM durante o período estudado (Tabela 1- Anexo 1).

Apesar dos resultados hematimétricos obtidos neste experimento não

apresentarem diferença ($p > 0,05$), eles indicam um comportamento condizente com os momentos de infestação. Acredita-se que a infestação de baixa intensidade utilizada no presente estudo favoreceu a permanência dos parâmetros hematimétricos dentro dos valores fisiológicos. Ressalta-se a importância desses achados, uma vez que corroboram de forma aplicada os trabalhos produzidos por Mahoney e Ross (1972), Mahoney (1979) e Smith (1983) que sugerem, através de modelos matemáticos, a manutenção de 10 a 40 teleóginas por animal/ dia como sendo uma taxa de infestação adequada em animais *Bos taurus*. Essa taxa seria suficiente para manter um nível adequado de proteção do rebanho contra *Babesia* spp., gerando uma estabilidade enzoótica, sem, contudo, acarretar prejuízos econômicos significativos ao sistema de produção.

A ligeira queda na taxa de ganho de peso dos animais seria compensada pela diminuição significativa do risco de ocorrer surtos de babesiose no rebanho. Observa-se que os números de teleóginas citados pelos autores estão próximos aos observados no presente

estudo, sugerindo que, além de influenciar minimamente a taxa de ganho de peso dos animais (Smith, 1983), a baixa infestação utilizada não foi capaz de alterar os parâmetros hematimétricos avaliados.

São escassos os trabalhos na literatura que avaliaram as alterações hematimétricas causadas pelos carrapatos a seus hospedeiros. Em sua maioria, os trabalhos que enfocam os prejuízos ao hospedeiro restringem-se à avaliação do consumo voluntário e do ganho de peso. Alguns estudos relatam as alterações hematimétricas observadas nos quadros de anemia, assim como mortes decorrentes da intensa espoliação sanguínea causada por altas infestações por *R. microplus* (Riek, 1957; O'Kelly e Seifert, 1969; O'Kelly et al., 1971; Corrier et al., 1979).

Riek (1957), trabalhando com infestações artificiais em *Bos taurus*, relata a ocorrência de anemia nos animais parasitados, sendo tal efeito mais pronunciado nos animais que apresentaram baixas condições corporais. O autor descreve uma queda de 66% no hematócrito inicial do grupo com baixa condição corporal, quando

estes foram submetidos à infestação por 50000 larvas, passando o VG de 34% para 15%. Entretanto, no grupo com boa condição física, tal exposição resultou em uma queda no hematócrito de 2% a 3% do valor inicial. Esta infestação foi classificada pelo autor como sendo uma infestação muito alta, resultando em uma contagem de aproximadamente 2500 fêmeas adultas. Comportamentos similares foram encontrados por O'Kelly e Seifert (1969), em que animais alimentados com uma dieta pobre apresentaram quedas de 22% no hematócrito, quando submetidos a cinco

infestações contendo 0,5 gramas de larvas cada.

4.3- Alterações relacionadas à inflamação

Houve um aumento do escore de mucosas nos dias próximos e durante o primeiro e terceiro picos de infestação (Figura 10). Não foram observadas alterações dos vasos episclerais, turgor de pele e no tempo de perfusão capilar (TPC), que permaneceram normais durante todo o período estudado.

Os dados referentes à temperatura retal (°C) podem ser observados na Figura 11.

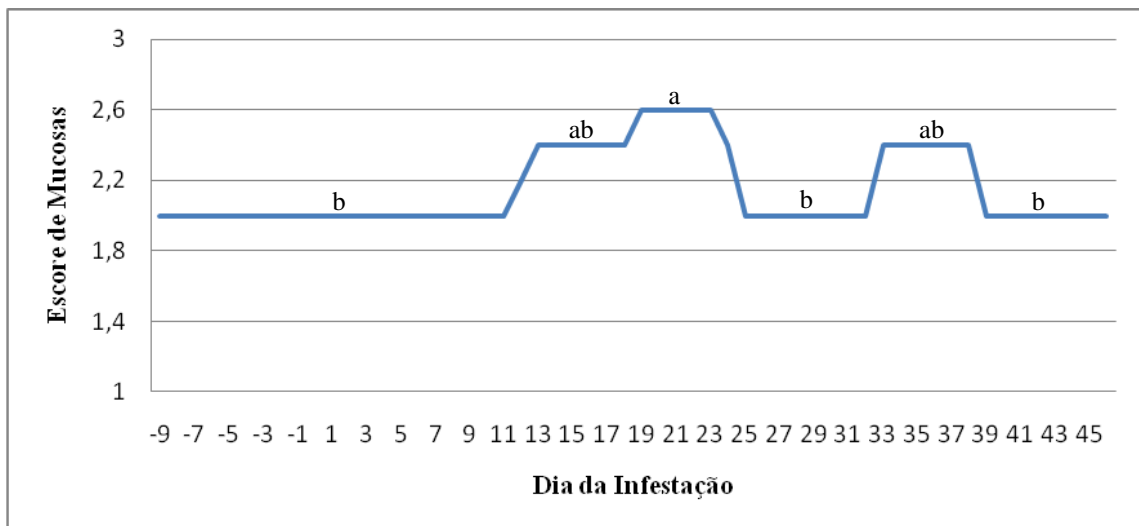


Figura 10. Escore de mucosas analisado por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de infestação. Letras distintas entre os períodos de infestação indicam diferença estatística pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Escore 1: hipocoradas; Escore 2: normocoradas; Escore 3: hiperacoradas.

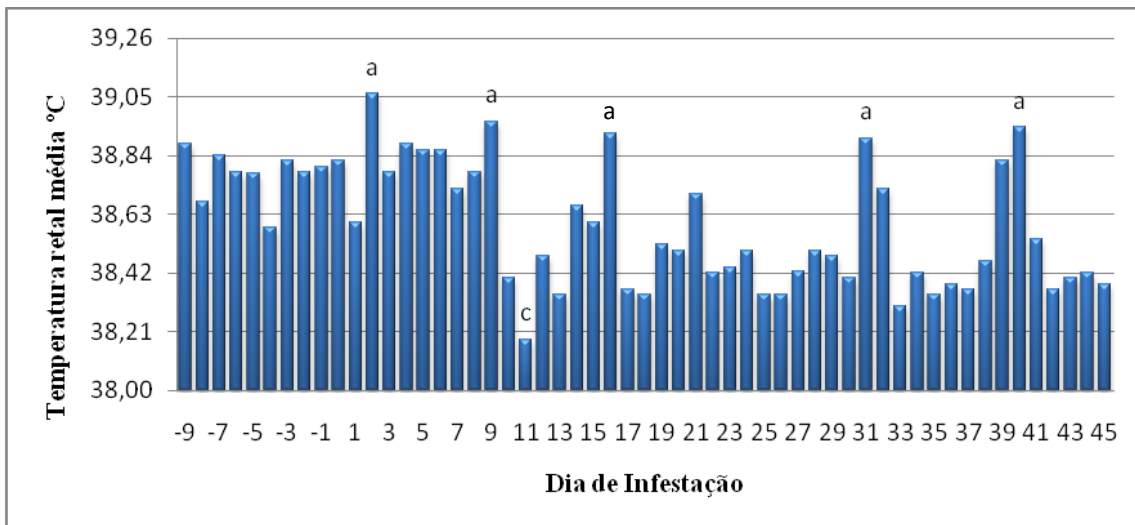


Figura 11. Temperatura retal média por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas entre os dias de infestação indicam diferença estatística para os demais dias do período experimental pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

Apesar das temperaturas observadas ao longo do período permanecerem dentro dos limites fisiológicos descritos por Robinson (2001), houve diferença em alguns momentos avaliados, quando comparados aos valores médios observados.

Chama-se atenção para os aumentos de temperatura ($p < 0,05$), ocorridos nos dias dois ($39,06^{\circ}\text{C}$), nove ($38,96^{\circ}\text{C}$) e dezesseis ($38,92^{\circ}\text{C}$), apesar dos mesmos permanecerem dentro dos limites fisiológicos para espécie bovina (Robinson, 2001). Esses três momentos ocorreram dois dias após cada infestação do hospedeiro com 1500

larvas. Sendo assim, o discreto aumento da temperatura nos dias citados pode estar relacionado aos dias iniciais das infestações. A reação inflamatória local desencadeada pela penetração do aparelho bucal do carrapato na pele envolve, dentre uma série de respostas no hospedeiro, a produção de citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) pró-inflamatórias, que atuam na mediação do processo de elevação da temperatura corporal (Janeway et al., 2001). Este processo inflamatório também pode ser responsável pelo aumento no escore das mucosas, observado na Figura 10.

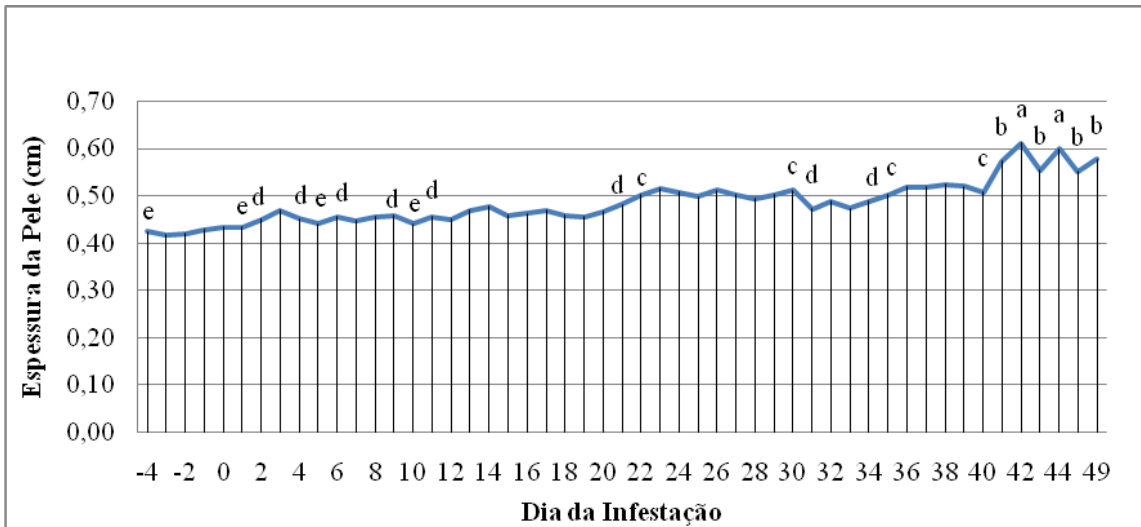


Figura 12. Espessura da pele em cm por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas entre os dias de infestação indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). O intervalo compreendido entre duas letras iguais indica ausência de diferença estatística no período.

Durante o período estudado, foi observado um aumento progressivo da espessura da pele, sendo os valores máximos obtidos nos momentos finais da infestação (Figura 12). Uma elevação acentuada da espessura foi observada entre os dias 40 e 41 (0,57 cm), atingindo seu maior valor no dia 42 (0,61 cm), momento em que a contagem média de teleóginas foi próxima de zero. O maior espessamento permaneceu relativamente constante até o último dia de avaliação, dia 49 (0,58 cm). Tal fato condiz com uma resposta tardia da pele à infestação pelo *R. microplus*, considerando que o nível de

infestação utilizado não foi suficiente para causar uma resposta inflamatória aguda significativa, como pôde ser observado pelos demais resultados apresentados.

Na análise histológica da pele, realizada pela coloração HE, não foram observadas alterações na população de células inflamatórias presente na derme, nas duas primeiras coletas após a infestação. Entretanto, no 37º dia pós-infestação, foi observado um discreto aumento de células mononucleares (linfócitos e macrófagos), formando pequenos focos de infiltrado inflamatório perianexiais (Figura 13).

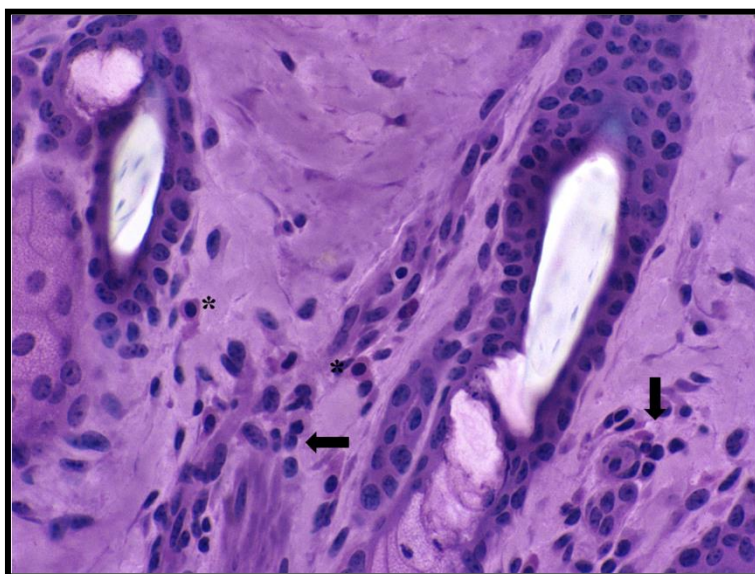


Figura 13. Fotomicrografia de infiltrado inflamatório perianexial observado no 37º dia pós-infestação, em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. As setas indicam os focos de células inflamatórias mononucleares (linfócitos e macrófago). (*) Mastócitos. Coloração HE. 400X.

Essa alteração não se manteve no 49º dia pós-infestação, no qual não foram observadas diferenças em relação ao dia 0 (imediatamente antes da infestação).

Em todos os dias analisados, nenhuma outra alteração tecidual relacionada à resposta inflamatória local foi observada. Esta ausência de alterações levou à uma lacuna relacionada ao acentuado espessamento da pele observado nos últimos dias de infestação.

Devido à dificuldade em se diferenciar mastócitos em tecidos corados por HE, o emprego da coloração azul de toluidina borato de sódio foi essencial para evidenciação e contagem dos

mastócitos ao longo do período de infestação (Figura 14).

As variações na contagem média de mastócitos observadas entre os dias de avaliação não apresentaram diferenças, apesar de seguirem um comportamento de aumento em função do avançar do ciclo e do aumento da infestação. Os valores encontrados no presente estudo foram superiores aos encontrados na literatura para contagens médias de mastócitos em bovinos da raça Holandês. Moraes et al. (1992), trabalhando com animais Holandês, Gir e cruzados (F1), encontraram valores médios de 43,1 mastócitos por mm^2 de área de pele.

Sartor et al. (1997), estudando os mesmos três diferentes grupos, encontraram valores médios de 30 mastócitos por mm^2 de área de pele, no grupo de animais da raça Holandês. Veríssimo et al. (2008), avaliando a produção de mastócitos em raças e níveis de infestação diferentes encontraram valores médios de 177,3 e 122,8 mastócitos por mm^2 de área de pele, em animais da raça Holandês em baixas e altas infestações, respectivamente. Cabe ressaltar que, nestes trabalhos, foram utilizados animais com idade média de 20 meses. Segundo Sahibi et al. (1997), em infestações a campo, a susceptibilidade

dos animais ao carrapato parece aumentar com a idade do hospedeiro, muito embora a raça pareça exercer maiores influências. Veríssimo et al. (2008) ponderam que a dinâmica dos mastócitos na pele é influenciada pela idade dos animais, sugerindo que sejam realizados mais estudos para um melhor entendimento deste processo. As diferenças observadas na contagem média de mastócitos entre o presente estudo e a literatura podem ser explicadas por diferenças existentes entre sexo, raça, idade, intensidade de infestação e local da biópsia (Moraes et al., 1992; Sartor et al., 1997).

Os dados referentes à espessura dos

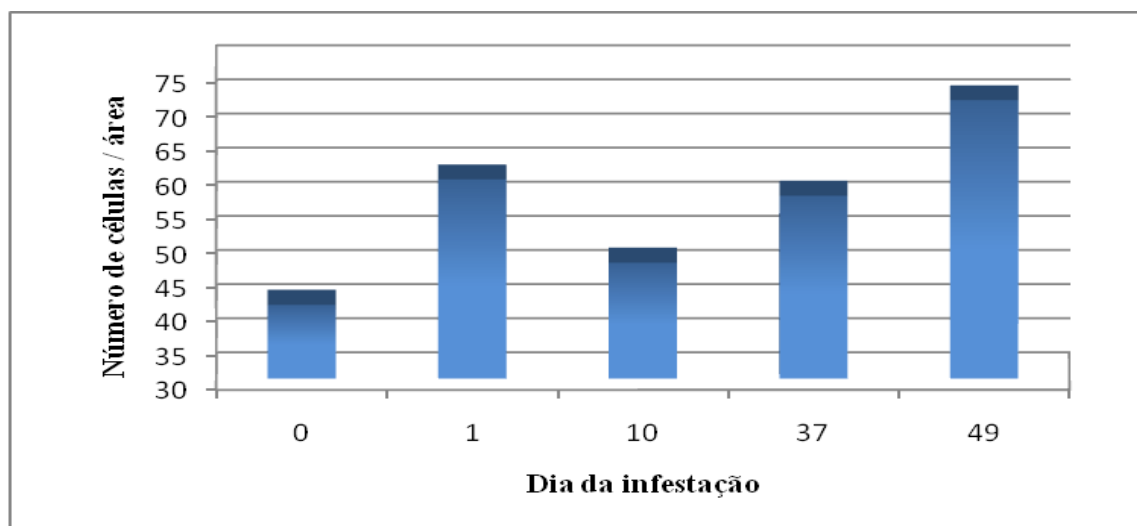


Figura 14. Número médio de mastócitos em $0,628 \text{ mm}^2$ de área de pele por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Ausência de letras indica $p > 0,05$ pelo Fisher.

linfonodos cervicais superficiais direito (CSD) e esquerdo (CSE) e linfonodos sub-ilíacos direito (SID) e esquerdo (SIE) estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Foram observados comportamentos semelhantes em ambos os grupos de linfonodos, sendo um aumento significativo observado a partir do 17º dia (CSE), 18º dia (CSD), 12º e 18º dias (SIE) e 21º dia (SID). Estes comportamentos coincidem com o aumento no número de parasitas em

decorrência das infestações realizadas nos dias 0, 7 e 14, além do aumento da atividade de repasto sanguíneo das ninfas e fêmeas adultas a partir do 16º dia, baseando-se no ciclo biológico descrito por Furlong (1993). O maior valor inicial apresentado pelo linfonodo SID se deve à aplicação subcutânea de vacina anti-*clostridium*, realizada na região dorsal do costado (lado direito), próxima a 10ª costela.

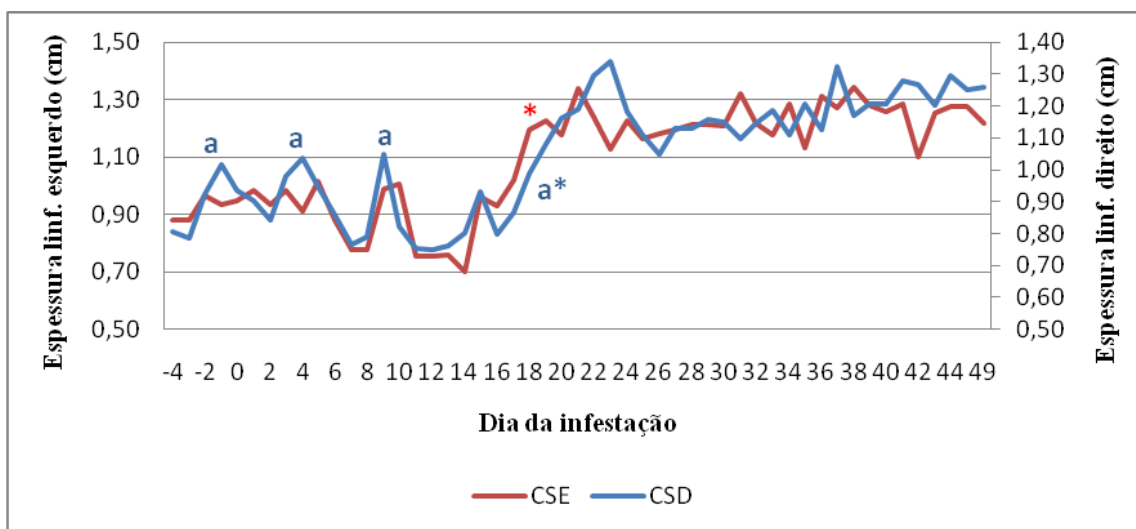


Figura 15. Espessura em cm dos linfonodos cervicais superficiais direito e esquerdo. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Para o linfonodo cervical superficial direito (CSD), (a) em azul indica os dias em que foram observadas diferenças estatísticas com o restante do período (dia -4 a 18); (a*) indica o momento (dia 19 a 49) a partir do qual é observada diferença estatística com o período anterior (dias -4 a 18). Para o linfonodo cervical superficial esquerdo (CSE), (*) em vermelho indica o momento a partir do qual é observada diferença estatística com o período anterior: (dias -4 a 17 e dias 18 a 49). Dados avaliados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

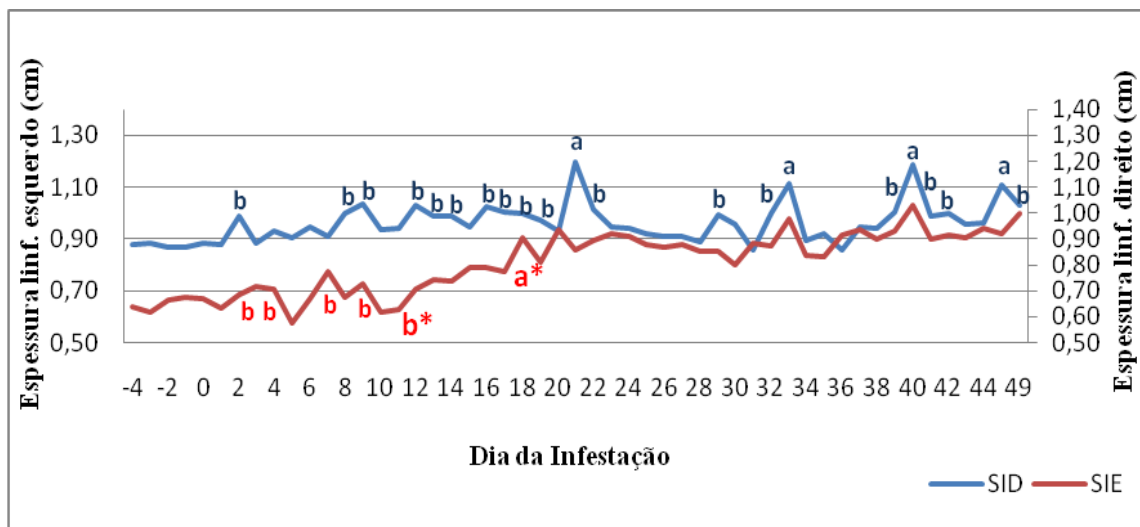


Figura 16. Espessura em cm dos linfonodos sub-ilíacos direito e esquerdo. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Para o linfonodo sub-ilíaco direito (SID), letras distintas em azul indicam os dias em que foram observadas diferenças estatísticas no período estudado. Para o linfonodo sub-ilíaco esquerdo (SIE), (b) em vermelho indica os dias em que foram observadas diferenças estatísticas no período (dia -4 a 11); (b*) em vermelho indica o momento (dia 12 a 17) a partir do qual é observada diferença estatística com o período anterior: (dias -4 a 11); (a*) em vermelho indica o momento (dia 18 a 49) a partir do qual é observada diferença estatística com os períodos anteriores: (dias -4 a 11 e 12 a 17). Dados avaliados pelo teste pelo de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Como já mencionado, a fixação do carrapato em seus diferentes estágios de vida parasitária e seu desenvolvimento baseado no repasto sanguíneo induzem uma complexa resposta imune no hospedeiro. Resposta essa que pode variar em duração e intensidade, de acordo com o nível de infestação, o grau de resistência do hospedeiro e a ordem de exposição do hospedeiro ao agente (Engracia Filho et al., 2006; Piper et al., 2010). Tal resposta envolve uma complexa e orquestrada série de

eventos, apresentando uma gama de protagonistas presentes no organismo como células apresentadoras de antígeno, linfócitos-T, linfócitos-B, anticorpos, citocinas, sistema complemento, neutrófilos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, e uma grande variedade de moléculas bioativas (Brown et al, 1982; Brown et al., 1984; Wikel, 1994; Wikel, 1996; Brossard e Wikel, 1997; Hajnicka et al, 2001; Brossard e Wikel, 2004). Dentre estes, Green et al. (1983) ressaltam que os

linfócitos são elementos-chave nas funções efetoras e de regulação do sistema imune, incluindo a produção de anticorpos, hipersensibilidade tardia e produção de linfócitos T citotóxicos. Ganapamo et al. (1997), trabalhando com camundongos BALB/c, observaram que repetidas infestações com ninfas de *Ixodes ricinus* estimularam a migração de linfócitos dos linfonodos para o local da injúria. Este aporte levou a uma produção significativa de fator estimulador de macrófago (GM-CSF) e de TNF- μ . Segundo Heufler et al. (1988), o GM-CSF induz tanto a maturação das células de Langerhans na epiderme quanto a

alta expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. O TNF- μ , por sua vez, desempenha papel no controle da migração das células apresentadoras de antígeno para os linfonodos regionais (Cumberbatch e Kimber, 1995). Ambas atuam conjuntamente na defesa do organismo, propiciando um aumento reativo dos linfonodos.

A seguir, são apresentados os valores para leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos (Figura 17) e eosinófilos (Figura 18) (Tabela 2 – Anexo 2).

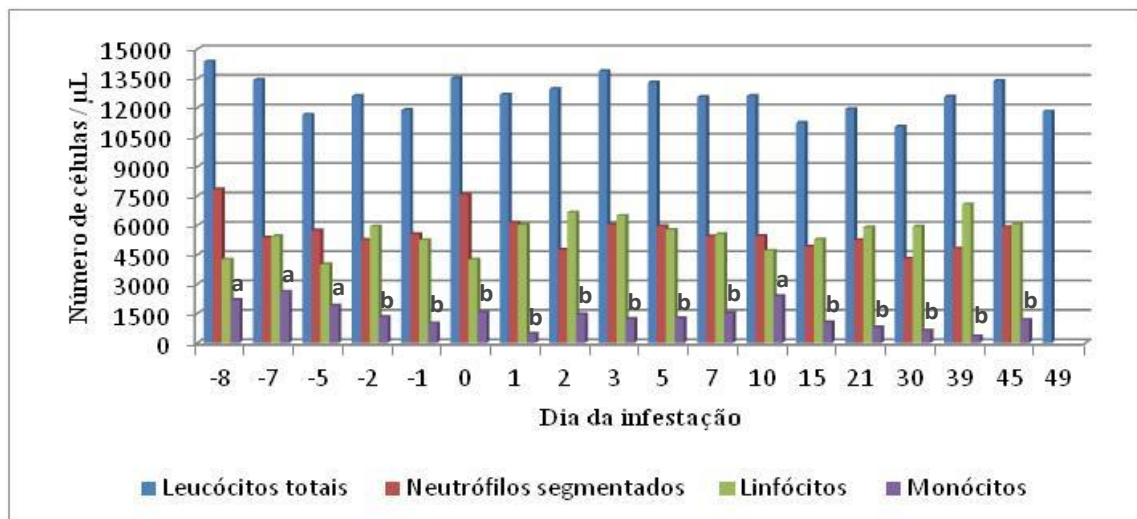


Figura 17. Contagem de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos em esfregaços sanguíneos por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas entre os dias de infestação, para cada categoria, indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Ausência de letras, para cada categoria, indica $p > 0,05$ pelo teste de Fisher.

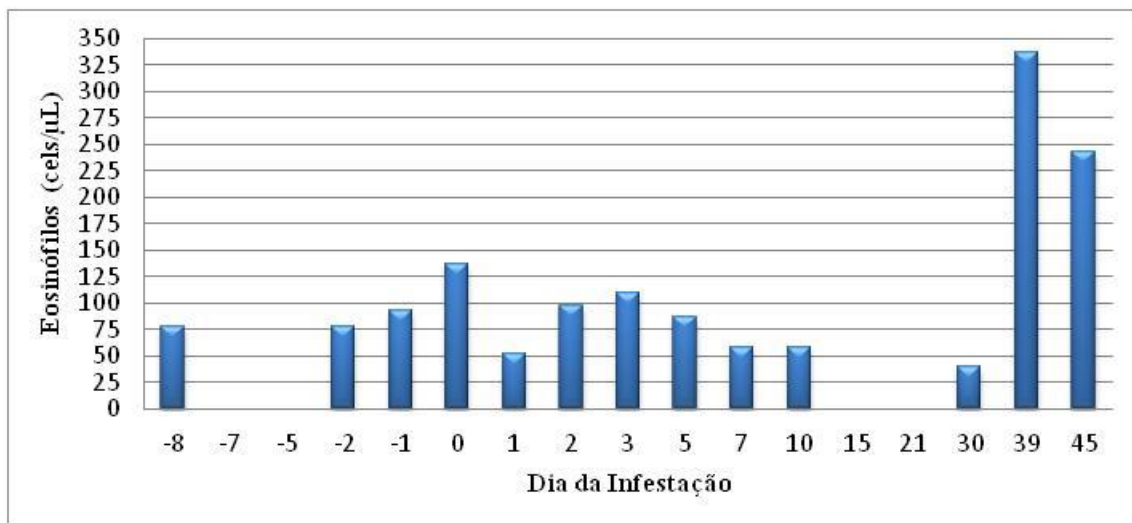


Figura 18. Contagem de eosinófilos em esfregaços sanguíneos por dia de infestação em bezerros holandês primoinfectados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Ausência de letras indica $p > 0,05$ pelo teste de Friedman com pós-teste de Dunn.

Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) somente para monócitos, especificamente nos dias -8, -7, -5 e 10. Ressalta-se aqui a capacidade do parasita em modular a resposta do hospedeiro, a resposta inflamatória branda do *Bos Taurus* e a baixa infestação observada no presente estudo. Segundo Jones e Allison (2007) e Thrall et al. (2007), o leucograma apresenta um valor diagnóstico limitado em ruminantes, devido à capacidade destes em compensar rapidamente as alterações de leucocitose ou leucopenia. Apesar de os valores de leucócitos totais apresentarem-se acima dos valores de

referência descritos por Kaneko et al (2008), estes podem ter sido influenciados por diversos fatores como a idade dos animais, o estresse no momento da coleta assim como por fatores relacionados ao ambiente (Jones e Allison, 2007; Thrall et al., 2007). As Figuras 19 e 20 apresentam os valores para proteína total, albumina e globulinas. A proteína total se manteve constante e dentro dos valores fisiológicos da espécie, ao longo de todo o processo (Tabela 3 – Anexo 3). Foram observadas diferenças somente nas alfa globulinas ($p < 0,05$), mais

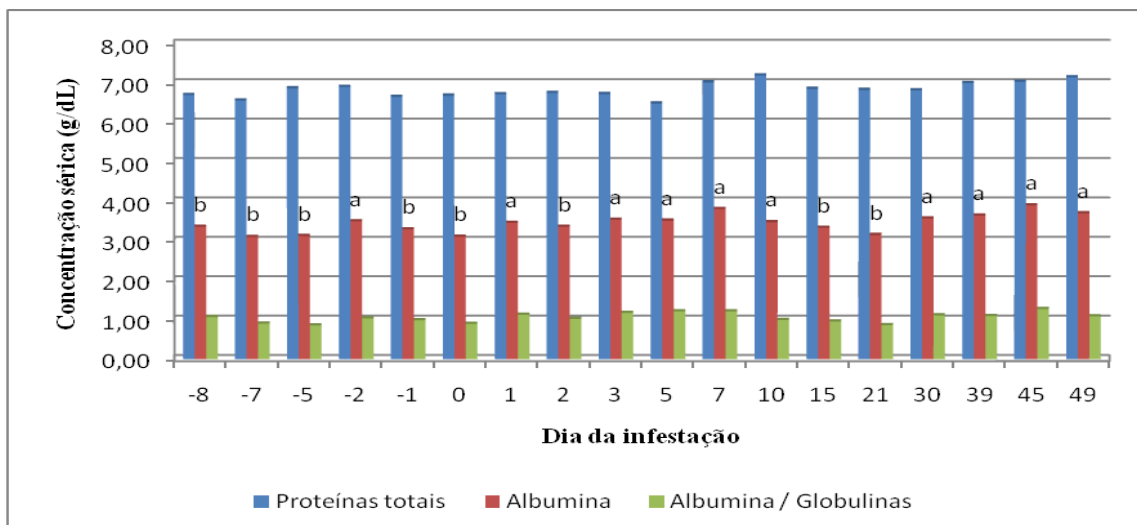


Figura 19. Concentração sérica das proteínas totais e albumina, e relação entre as concentrações séricas da albumina e globulinas por dia de infestação em bezerros holandês primoinfectados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas na categoria indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Ausência de letras, para cada categoria, indica $p > 0,05$ pelo teste de Fisher.

especificamente no 21º dia pós-infestação.

Alterações nos valores das frações podem não ser percebidas no valor da proteína total, uma vez que o aumento de uma fração pode ser compensado pela diminuição de outra (Jones e Allison, 2007; Thrall et al., 2007; Scott e Stockham, 2012). Jain (1993) ressalta que a concentração das proteínas séricas é influenciada pelo equilíbrio hídrico e hormonal, estado nutricional, além de outros fatores relacionados ao *status* de saúde.

Dentre as proteínas de fase aguda contidas na fração das alfa globulinas, nos bovinos, destacam-se a haptoglobina e a alfa₁-glicoproteína ácida. Tais proteínas podem ter seus valores aumentados em processos inflamatórios agudos, em decorrência da atuação de citocinas pró-inflamatórias, produzidas pela reação inflamatória, nos hepatócitos (Thrall et al., 2007; Eckersall et al., 2010; Ceciliani et al., 2012). O comportamento observado no presente trabalho foi relatado também nos

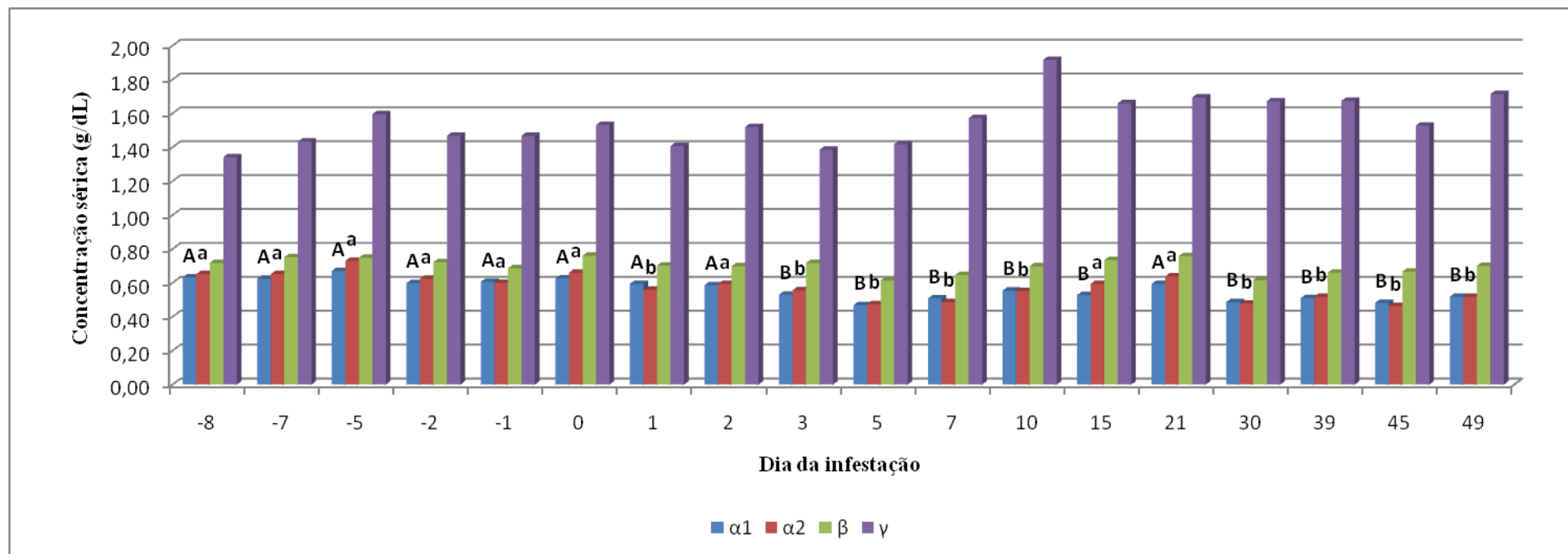


Figura 20. Concentração sérica das globulinas por dia de infestação em bezerros holandês primoinfestados com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. α1 – alfa globulina 1; α2 – alfa globulina 2; β – beta globulina; γ – gama globulina. Letras distintas na categoria, maiúsculas para α1-globulina e minúsculas para α2-globulinas, indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Ausência de letras, para cada categoria, indica $p > 0,05$ pelo teste de Fisher.

experimentos realizados por Hazari et al. (1991), Horadagoda et al. (1999) e Carvalho et al. (2008), sendo, entretanto, os valores de alfa globulinas observados neste estudo relativamente maiores.

Em relação à bioquímica sérica, apesar das diferenças significativas apresentadas ao longo do período experimental, os valores observados se encontram dentro dos limites fisiológicos descritos para a espécie (Tabelas 4, 5 e 6 – Anexos 4, 5 e 6) (Kaneko et al., 2008). Com exceção da glicose (Figura 21), os demais análises não tiveram seus níveis alterados em relação aos momentos de infestação.

Apesar de os valores encontrados permanecerem dentro dos limites fisiológicos para a espécie bovina, observa-se um aumento na glicemia ($p < 0,05$) a partir do 7º dia pós-infestação. Aumentos na glicemia estão relacionados a quadros de estresse (Jones e Allison, 2007; Thrall et al., 2007; Scott e Stockham, 2012), podendo estes achados estarem relacionados com o aumento e progressão da infestação a partir do dia 7 pós infestação.

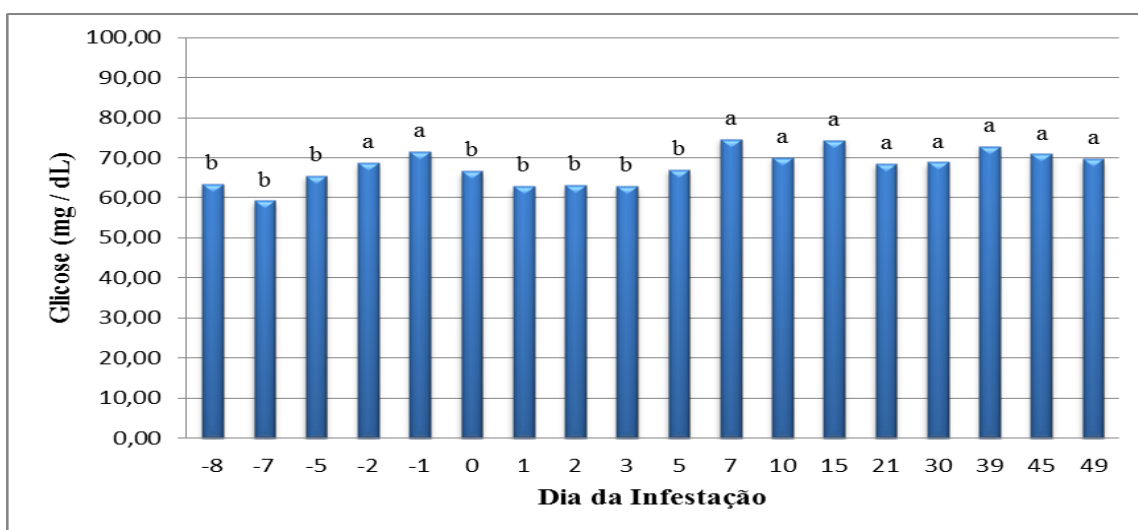


Figura 21. Concentração sérica de glicose por dia de infestação em bezerras holandesas primoinfectadas com o carrapato *R. B. microplus*. Os dados são apresentados pela média dos animais para cada dia de observação. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

5- Considerações finais

Ressalta-se a importância da manutenção de um nível seguro de teleóginas de *R. microplus* no rebanho, de forma a evitar perdas significativas, e garantir uma estabilidade enzoótica, principalmente em relação à *Babesia* sp.

6- Conclusão

A baixa infestação de bezerros, da raça Holandês, pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é capaz de estimular uma resposta local e sistêmica, sem, contudo, produzir alterações significativas nos parâmetros clínicos e laboratoriais.

7- Referências Bibliográficas

ALLEN, J.R.; DOUBE, B.M.; KEMP, D.H. Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus* Neumann. *Can. J. Comp. Med.*, v. 41, p. 26-35, 1977.

ANDREOTTI, R. *Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIS) presentes em larvas de carrapatos Boophilus microplus e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos*. 2002. 98f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

ARTHUR, D. R. *Ticks: A monograph of the Ixodoidea on the genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma,*

Boophilus and Margaropus. London: Cambridge University Press, 1960. 374 p.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarol.*, v. 16, p. 250-257, 1974.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). I. Mortality during the developmental cycle. *Acarol.*, v. 16, p. 643-650, 1975a.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). I. Distribution of the states during development. *Acarol.*, v. 17, p. 43-52, 1975b.

BIANCHIN, I.; CATTO, B.J.; KICHEL, N.A. et al. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos Taurus Taurus* x *Bos Taurus indicus*) in the central region of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 39, p. 287-296, 2007.

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

BROSSARD, M; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. *Parasitol.*, v. 129, p. 161-176, 2004.

BROSSARD, M; RUTTI, B; HAUG, T. Immunological relationships between host and ixodid ticks. In: TOFT, C.A.; AESCHLIMANN, A.; BOLIS, L. *Parasite-Host Associations: Coexistence or Conflict*, Oxford:

Oxford University Press, 1991. 177-200.

BROWN, S.J.; BARKER, R.W.; ASKENASE, P.W. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophils infiltrates. *Vet. Parasitol.*, v. 16, p. 147-165, 1984.

BROWN, S.J.; GALLI, S.J.; GLEICH, G.J. et al. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea-pigs. *J. Immunol.*, v. 129, p. 790-796, 1982.

CARVALHO, W.A.; BECHARA, G.H.; MORÉ D.D. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Exp. Parasitol.* v. 118, p. 587-591, 2008.

CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. *Células: uma abordagem multidisciplinar. 1. Ed. Barueri: Manole, 2005. 451p.*

CARVALHO, W.A.; FRANZIN, A.M.; ABATEPAULO, A.R.R. et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet. Parasitol.*, v. 167, p. 260-273, 2010.

CECIALINI, F.; CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D. et al. Acute phase

proteins in ruminants. *J. Proteomics*, v. 75, p. 4207-4231, 2012.

COLE, D.J.; ROUSSEL, A.J.; WHITNEY, M.S. Interpreting a bovine CBC: collecting and sample and evaluating the erythron. *Vet. Med.*, v.92, p.460-468, 1997.

CORDOVÉS, C. O. *Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Gralha, 1996. 130p.*

CORDOVÉS, C. O. *Carrapato: controle ou erradicação. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 1997. 140p.*

CORRIER, D.E.; VIZCAINO, O.; TERRY, M. et al. Mortality, weight loss and anemia in *Bos Taurus* calves exposed to *Boophilus microplus* ticks in the tropics of Colombia. *Trop. Anim. Health and Prod.*, v. 11, n. 1, p. 215-221. 1979.

CRAY, C.; ZALAS, J.; ALTMAN, N.H. Acute Phase Response in animals: A Review. *Comp. Med.*, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

CUMBERBATCH M.; KIMBER I. Tumour necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes for optimal contact sensitization. *Immunol.*, v. 84, p. 31-35, 1995.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.*, v. 71, n. 2-3, p. 77-97, 1997.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V. et al. Autocidal control

of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 344, p. 332–338, 2006.

DE LA FUENTE, J. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.*, v. 13, p. 6938–6946, 2008.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J.M. et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.*, v. 13, p. 6938-6946, 2008.

DELGADO, F.E.F. *Avaliação do controle estratégico do **Boophilus microplus** (Canestrini, 1887), pelo Programa BABSIM, em propriedades dos Campos das Vertentes e Sul de Minas.* 2002. 29p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DIRKSEN, G.; GRUMDER, H.D.; STOBER, M. *Exame clínico dos bovinos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 3 ed. 1993. 419p.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.*, v. 185, p. 23-27, 2010.

ENGRACIA FILHO, J.R.; BECHARA, G.H.; TEODORO, R.L. Dermal mast cell counts in F2 Holstein x Gir crossbred cattle artificially infested with the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Ann. N Y Acad. Sci.* v. 1081, p. 476–478, 2006.

FACCIOLI, V. *Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de la colección de invertebrados del museo providencional de ciências naturales Florentino Ameghino.* Santa Fé: Florentino Ameghino, 2011. 38p.

FLECHTMANN, C.H.W. *Ácaros de importância Médico Veterinária.* 2 ed. São Paulo: Nobel; 1990.

FONSECA, A. H. *Patogenia dos carrapatos nos animais e nos seres humanos.* Rev. do CFMV. v. 19, p. 34–38, 2000.

FURLONG, J. *Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil,* Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1993. n. 8, Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG, p.49-61.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L. L. et al. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on feed intake and milk yield of Holstein X Zebu crossbred cows. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, n. 15., 1996, Campo Grande. Anais...Campo Grande: APCV, 1996. p. 340.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. *Carrapato: problemas e soluções.* 1. ed. Juiz de Fora: EMBRAPA Juiz de Fora, 2005. 65p.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, v. 340, p. 448–54, 1999.

GANAPAMO, F.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction

- through its ability to simulate CD4 cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site. *Parasitol.*, v. 115, p. 91-96, 1997.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Tratado de histologia em cores*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 576p.
- GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M.P. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J. Vector Borne Dis.*, v. 44, p. 79–89, 2007.
- GONZALES, J.C. *O carrapato do boi: vida, resistência e controle*. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.
- GONZALES, J.C. *O controle dos carrapatos dos bovinos*. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104p.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. Porto Alegre: Edição do Autor, 1993. 80p.
- GONZALES, J. C. *O controle do carrapato do boi*. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.
- GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N. et al. Tick control: an industry point of view. *Parasitol.*, v. 129, suppl. S1, p. S427–S442, 2004.
- GRAHAM, O. H.; HOURRIGAN, J. L. Eradication programs for the arthropod parasite of livestock. *J. Med. Entomol.*, v. 13, n. 1, p. 629-659, 1977.
- GREEN, D. R.; FLOOD, P. M.; GERSHON, R. K. Immunoregulatory T-cell pathways. *Annu. Rev. Immunol.* v. 1, p. 439-463, 1983.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R. et al. Impacto econômico das parasitoses em bovinos no Brasil. Campo Grande, 13 de abril de 2013. Palestra proferida na Conferência Nacional para Atualização das Perdas Econômicas pelas Parasitoses, EMBRAPA/CNPQC.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, v. 125, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; MUÑOZ COBEÑAS, M.E. et al. Moxidectin pouron for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, v. 87, n. 3, p. 237-241, 2000.
- HAJNICKA, V.; KOCÁKOVA, P.; SLAVIKOVA, M. et al. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.*, v. 23, p. 483–489, 2001.
- HARVEY, J.W. *Atlas of veterinary hematology*. Philadelphia: Saunders, 2001. 228p
- HAZARI, M.M.; MISRA, S.C.; PANDA, M.R. et al. Host's response to heavy *Boophilus microplus* infestation. *Ind. Vet. J.*, v.68, n.5, p.409-412, 1991.
- HEUFLER, C.; KOCH, F.; SCULER, G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine

- epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, v.167, p.700-705, 1988.
- HITCHCOCK LF. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Aust J. Zool.*, v.3, p.145–55, 1955.
- HOOGSTAL, H. Argasid and nuttallied ticks as parasites and vectors. *Adv. Parasitol.*, v.1, n.24, p.135-238, 1985.
- HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.; GIBBS, H.A. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.*, v.144, p.437–441, 1999.
- HORAK, I.G.; CAMICAS, J.L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* v. 28, p. 27–54. 2002.
- HORN, S.C. *Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos*. Brasília, 1983. Boletim da Defesa Sanitária Animal, 29 p.
- HORN, S.C. *O couro e seus problemas*. Brasília, 1984. Boletim da Defesa Sanitária Animal, 40p.
- INOKUMA, H.; KERLIN, R.L.; KEMP, D.H. et al. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Vet. Parasitol.* v. 47, p. 107–118, 1993.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Pennsylvania: Lea e Febiger. 1993. 417p.
- JANEWAY, C.A. Jr.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. *Immunobiology*. 5. Ed. New York: Garland Publishing, 2001.
- JONES, M.L.; ALLISON, R.W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 23, p. 377-402, 2007.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitol.*, v. 129, suppl. S1, p. S3-14, 2004.
- JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.*, v. 137, n. 1-2, p. 1-10, 2006.
- KANEKO, J.J.; SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. *Calif. Vet.*, v. 21, p. 21-24, 1967.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2008, 932p.
- KEMP, D.H.; TATCHELL, R.J. The mechanism of feeding and salivation in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Parasitol. Res.* v.37, p.55–69, 1971.
- KEMP, D.H.; KOUDSTAAL, D.; ROBERTS, J.A. et al. *Boophilus microplus*: The effect of host resistance

on larval attachments and growth. *Parasitol.*, v.73, p.123-136, 1976.

KERR, M. G. *Veterinary Laboratory Medicine: clinical Biochemistry and Haematology*. 2. ed., Oxford: Blackwell Science, 2002, 386p.

KRAMER, J. *Normal hematology of cattle, sheep and goats*. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000.

KREMERS, B., BRIERE, R.O., BATASAKIS, J.G. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. *Am. J. Med. Technol.*, v.33, p.28-34, 1967.

KRUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Robbins e Cotran Patologia – Bases patológicas das doenças*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

LONDT, J.G.H.; ARTHUR, D.R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). *J. Entomol. Soc. Sth Afric.*, Pretoria, v. 38, p. 321- 340, 1975.

MAHONEY, D.F. The epidemiology of babesiosis. Annual Conference Australian Veterinary Association, n.56, 1979, Townsville. Anais... Townsville. p. 9-10.

MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. Bovine babesiosis; estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Ann Trop. Med. Parasitol.*, v.65, n.3, p.309-317, 1971.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.F. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v. 48, p. 292-298, 1972.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S. et al. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet. Mol. Res.*, v. 5, p. 513–524, 2006.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, v.296, p.301-305, 2002.

McCOSKER, P.J. Global aspects of the management and control of ticks of veterinary importance. *Rec. Adv. Acarol.* v. 2, p. 45-53, 1979.

MOORHOUSE, D.E.; TATCHELL; R.J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini): a study in host-parasite relations. Part I. Attachment to the host. *Parasitol.*, v. 56, p. 623-632, 1966.

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

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

- MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *System. Parasitol.*, v. 56, p. 169-172, 2003.
- NUÑES J.L.; MUÑOZ COBENAS M.E.; MOLTEDO H.L. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. 1a ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 34p.
- NUÑES, J. L.; PUGLIESE, M. E.; HAYES, R. P. *Boophilus microplus*: estudio sobre los estadios parasitarios del ciclo biológico. *Rev. Med. Vet.*, v. 53, p. 19-34, 1972.
- O'KELLY, J.C.; SEIFERT, G.W. Relationships between resistance to *Boophilus microplus*, nutritional status and blood composition in Shorthorn x Hereford cattle. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 22, p. 1497-1499, 1969.
- O'KELLY, J.C.; SEEBECK, R.M.; SPRINGELL, P.H. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*). II. Changes in blood composition. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.24, p.381-389, 1971.
- OLIVER, J.H. Biology and systematics of Ticks (Acari: Ixodidae). *Ann. Rev. Ecol. System.*, v. 20, p. 397-430, 1989.
- OLIVEIRA, P.R. 1993. Controle estratégico do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos de propriedades rurais dos municípios de Lavras e Entre Rio de Minas. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 97 pp.
- PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. 2008. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* In Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM 2008. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Biologia, Controle e Resistência, Medvet, São Paulo, 15-54 pp.
- PETER, R.J.; VAN DEN BOSSCHE, P.; PENZHORN, B.L. et al. Tick, fly, and mosquito control – Lessons from the past, solutions for the future. *Vet. Parasitol.*, v. 132, p. 205-215, 2005.
- PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, v. 35, p.163-187, 2004.
- PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *Int. J. Parasitol.* v. 40, p. 431-441, 2010.
- POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. *Queensl. Agric. J.*, v.108, n.6, p.279-300, 1982.
- 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*. 10. ed., Philadelphia:Elsevier, 2007, 2156p.
- RIBEIRO, J.M. Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.* v. 64, p. 347-353, 1987.

- RIBEIRO, J.M.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I.M. et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 36, p. 111–129, 2006.
- RIBEIRO, J. M. C.; SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: Salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.*, v. 62, p. 292-297, 1986.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. I. Tick anaemia. *Aust. J. Agric. Res.*, v.8, p.209-214, 1957.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. *Aust. J. Agric. Res.*, v.10, p.604–613, 1959.
- RIEK, R. F. The cattle tick and fever. *Aust. Vet. J.*, v. 41, p. 211-215, 1965.
- ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *J. Parasitol.*, v.54, p.657-662, 1968a
- ROBERTS, J. A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J. Parasitol.*, v.54, n.4, p.667-673, 1968b.
- ROBERTS, J. A. Behavior of larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini), on cattle of differing degrees of resistance. *J. Parasitol.*, v.57, n.3, p.651-656, 1971.
- ROBINSON, E.N. Termoregulação. In: Cunningham, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 51, p.247-435.
- ROCHA, C.M.B.M. *Caracterização da percepção dos produtores de leite do município de Divinópolis/MG sobre a importância do carrapato Boophilus microplus e fatores determinantes das formas de combate utilizadas*. 1995. 205f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ROCHA, C.M.B.M.; *Percepção e atitude de produtores de leite de Minas gerais de diferentes extratos de produção em relação ao Boophilus microplus*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- ROCHA, C.M.B.M.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. Percepção dos produtores de leite do município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. *Cienc. Rural*, v.36, n.4, p.1235-1242, 2006.
- RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. Impacto econômico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimativa de redução de produção de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.5, p.1570-1572, 2013.
- RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, v.23 p.403–426, 2007.

- SAEG. 2000. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. UFV, Viçosa.
- SAHIBI, H; RHALEM. A.; TIKKI, N. et al. Hyalomma ticks: bovine resistance under field conditions as related to host age and breed. *Parasite.*, v.4, n.2, p.159-165, 1997.
- SARTOR I.F.; FACCINI J.L.H.; SEQUEIRA J.L. et al. Estudo histológico da pele de bovinos resistentes e suscetíveis ao carrapato *Boophilus microplus* no local de fixação da larva. *Vet. e Zootec.*, v.9, p. 27-47, 1997.
- SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 744p.
- SEIFERT, G.W.; SPRINGELL, P.H.; TATCHELL, R.J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adults of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitol.* v.58, p.415-430, 1968.
- SIMPLICIO, K.M.M.G. (2011). *Leucograma e proteínas de fase aguda de ruminantes domésticos sadios e enfermos*. 119f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, 2011.
- SKINNER, J.G. International standardization of acute phase proteins. Special Report. *Vet. Clin. Pathol.*, v.30, n. 1, p. 02-07, 2001.
- SMITH, R.D. *Babesia bovis*: Computer Simulation of the Relationship between the Tick Vector, Parasite, and Bovine Host. *Exp. Parasitol.*, v.56, p.27-40, 1983.
- SONENSHINE, D. E. *Biology of Ticks*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 1993. 447p.
- TATCHELL, R.J.; MOORHOUSE, D.E. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host–tissue changes. *Parasitol.*, v. 58, p. 441–459, 1968.
- TATCHELL. R.J.; CARNELL, R.; KEMP, D.H. Electrical studies on the feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Z. Parasitenk.*, v. 38, p. 32-44, 1972.
- TAYLOR, J.A. *Leucocyte responses in ruminants*. In. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p.391-404.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 1. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2007. 776p.
- TITUS, R.G.; BISHOP, J.V.; MEJIA, J.S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.*, v. 28, p. 131-141, 2006.
- TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária – uma introdução*. 8. ed. Roca: São Paulo. 587p. 2008.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* v.24, p.355–361, 2002.

VALLI VEO. *Veterinary Comparative Hematopathology*. Ames: Blackwell. 2007. 300p.

VERÍSSIMO, C.J. *Resistência e suscetibilidade de bovinos Leiteiros mestiços ao carrapato Boophilus microplus*. 1991. 169p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo.

VERÍSSIMO, C.J.; BECHARA, G.H.; MUKAI, L.S. Mast cell counts correlate with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick load in different cattle breeds. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.1, n.2, p.81 – 87, 2008.

VERÍSSIMO, C.J.; LARA, M.A.C.; ARCARO, J.R.P.; DEODATO, A.P.; BECHARA, G.H. 2004. Associação entre marcadores protéicos e grau de infestação pelo carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Canestrini, 1887, em bovinos. *Anais ZOOTEC, Abz & Upis*, Brasília, DF, 1-5.

VILLARES, J.B. *Zootechnic climatology III. Contribution to the study of genetic resistance and susceptibility of cattle to Boophilus microplus*. 1941. *Boletim de Industria Animal*, 86p.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle, 2. The dynamics of resistance in previously unexposed and exposed cattle (beef cattle). *Aust.J.Agric.Res.*, v. 29, n. 2, p. 395-400, 1978.

WHARTHON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G; Resistance to the cattle tick, *B. microplus*, in a herd of Australian llawarra x Shorthorn cattle: its assessment and herdability. *Aust. J. Agric. Res.*, v.21, n.1, p.163-81, 1970.

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

WIKEL, S.K.; RAMACHANDRA, R.N.; BERGMAN, K.D. Tick-induced modulation of the host immune response. *Int. J. Parasitol.*, v.24, p.59-66, 1994.

WILKINSON, P.R. Observations on infestation of undipped cattle of british breeds with the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.*, v.6, p.655-665, 1955.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 1. Hemograma (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de hemácias, VCM, CHCM e número de plaquetas) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
-8	28,00 \pm 2,24 a	8,62 \pm 0,66 a	7,03 \pm 0,69 a	39,90 \pm 1,75 a	30,81 \pm 1,26 a	365,80 \pm 155,56 a
-7	28,00 \pm 2,55 a	8,60 \pm 0,60 a	7,03 \pm 0,69 a	39,87 \pm 1,40 a	30,79 \pm 1,58 a	330,40 \pm 60,83 a
-5	27,80 \pm 3,19 a	8,62 \pm 1,02 a	7,02 \pm 0,87 a	39,75 \pm 3,88 a	31,03 \pm 1,31 a	411,20 \pm 75,67 a
-2	27,80 \pm 2,59 a	8,58 \pm 0,99 a	7,02 \pm 0,96 a	39,88 \pm 3,65 a	30,83 \pm 1,25 a	379,80 \pm 100,76 a
-1	27,80 \pm 2,28 a	8,50 \pm 0,69 a	7,02 \pm 0,84 a	39,80 \pm 3,20 a	30,60 \pm 1,39 a	328,60 \pm 72,84 a
0	27,80 \pm 2,28 a	8,50 \pm 0,54 a	7,02 \pm 0,77 a	39,75 \pm 2,88 a	30,62 \pm 1,00 a	340,00 \pm 103,30 a
1	27,60 \pm 2,19 a	8,20 \pm 0,71 a	6,61 \pm 0,60 a	41,85 \pm 3,08 a	29,72 \pm 1,32 a	300,60 \pm 78,76 a
2	27,40 \pm 2,19 a	8,16 \pm 1,21 a	6,44 \pm 1,09 a	43,15 \pm 4,92 a	29,69 \pm 2,45 a	329,40 \pm 116,61 a
3	27,20 \pm 1,92 a	8,12 \pm 1,06 a	6,20 \pm 0,97 a	44,43 \pm 5,30 a	29,78 \pm 2,29 a	300,00 \pm 105,15 a
5	27,00 \pm 2,24 a	8,12 \pm 0,83 a	6,05 \pm 1,06 a	45,37 \pm 5,59 a	30,05 \pm 1,42 a	307,80 \pm 109,82 a
7	27,00 \pm 3,32 a	8,10 \pm 1,01 a	6,06 \pm 1,40 a	45,78 \pm 7,49 a	30,01 \pm 1,24 a	326,60 \pm 141,81 a
10	27,40 \pm 2,30 a	8,52 \pm 1,48 a	6,12 \pm 1,88 a	48,98 \pm 18,20 a	30,94 \pm 3,51 a	300,20 \pm 101,07 a
15	28,20 \pm 3,11 a	9,48 \pm 0,76 a	6,88 \pm 1,08 a	41,85 \pm 8,53 a	33,81 \pm 2,95 a	286,20 \pm 102,35 a
21	25,00 \pm 4,18 a	7,90 \pm 1,49 a	6,05 \pm 1,42 a	41,91 \pm 3,79 a	31,52 \pm 1,14 a	232,80 \pm 98,06 a
30	29,20 \pm 2,86 a	9,14 \pm 1,00 a	7,05 \pm 0,99 a	41,75 \pm 4,11 a	31,27 \pm 0,61 a	352,00 \pm 102,72 a
39	29,40 \pm 3,29 a	9,12 \pm 1,02 a	7,45 \pm 0,60 a	39,44 \pm 2,47 a	31,02 \pm 0,31 a	282,60 \pm 90,73 a
45	29,80 \pm 2,17 a	9,28 \pm 0,85 a	7,53 \pm 0,81 a	39,72 \pm 2,17 a	31,11 \pm 0,76 a	281,80 \pm 87,82 a
49	29,00 \pm 3,67 a	9,02 \pm 1,12 a	7,43 \pm 1,05 a	39,14 \pm 2,24 a	31,12 \pm 0,81 a	239,60 \pm 97,62 a

Valores expressos como média e desvio-padrão. Os dados são expressos como a média dos animais em cada dia de tratamento. VCM, volume corpuscular médio; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

ANEXO 2

Tabela 2. Leucometria diferencial (leucócitos totais, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos) de bezerros holandeses submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	Leucócitos totais (cél/s/ μ l)	Segmentados (cél/s/ μ l)	Eosinófilos (cél/s/ μ l)	Linfócitos (cél/s/ μ l)	Monócitos (cél/s/ μ l)
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
-8	14374 \pm 4036 a	7843 \pm 3010 a	77 \pm 132 a	4260 \pm 2313 a	2192 \pm 1021 a
-7	13440 \pm 3411 a	5380 \pm 1634 a	0	5449 \pm 1885 a	2609 \pm 1400 a
-5	11660 \pm 3561 a	5750 \pm 3414 a	0	4011 \pm 557 a	1897 \pm 1117 a
-2	12614 \pm 2993 a	5268 \pm 1974 a	77 \pm 173 a	5951 \pm 2184 a	1315 \pm 623 b
-1	11898 \pm 2273 a	5554 \pm 1833 a	92 \pm 131 a	5249 \pm 1560 a	1001 \pm 567 b
0	13520 \pm 2395 a	7564 \pm 2616 a	136 \pm 195 a	4258 \pm 1757 a	1560 \pm 1366 b
1	12688 \pm 2399 a	6145 \pm 1553 a	52 \pm 117 a	6031 \pm 1869 a	458 \pm 230 b
2	12970 \pm 2956 a	4749 \pm 2136 a	98 \pm 134 a	6664 \pm 2148 a	1458 \pm 1157 b
3	13876 \pm 3519 a	6045 \pm 2433 a	109 \pm 245 a	6495 \pm 2301 a	1226 \pm 1175 b
5	13300 \pm 2947 a	5957 \pm 3022 a	87 \pm 195 a	5773 \pm 1438 a	1264 \pm 1525 b
7	12560 \pm 1878 a	5436 \pm 1632 a	57 \pm 128 a	5555 \pm 968 a	1510 \pm 452 b
10	12616 \pm 3142 a	5457 \pm 2733 a	57 \pm 128 a	4708 \pm 1656 a	2393 \pm 1528 a
15	11242 \pm 3741 a	4913 \pm 3277 a	0	5284 \pm 1241 a	1044 \pm 577 b
21	11952 \pm 2590 a	5249 \pm 3062 a	0	5902 \pm 1884 a	800 \pm 535 b
30	11046 \pm 2258 a	4298 \pm 3491 a	39 \pm 88 a	5938 \pm 2086 a	619 \pm 786 b
39	12580 \pm 2125 a	4825 \pm 1096 a	337 \pm 524 a	7078 \pm 2136 a	339 \pm 282 b
45	13380 \pm 2386 a	5903 \pm 1858 a	243 \pm 544 a	6062 \pm 1563 a	1171 \pm 1054 b
49	11816 \pm 2677 a	-	-	-	-

Valores expressos como média e desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média dos animais em cada dia de tratamento. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott- knott ($p < 0,05$).

ANEXO 3

Tabela 3. Proteinograma (proteína total, albumina, fibrinogênio e globulinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , albumina/globulina) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	PT (g/d)	Alb (g/dl)	Fibr (mg/dl)	$\alpha 1$ (g/dl)	$\alpha 2$ (g/dl)	β (g/dl)	γ (g/dl)	Alb/Glob (g/dl)
	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$	$\bar{x} \pm dp$
-8	6,71 \pm 0,87 a	3,36 \pm 0,23 b	480,00 \pm 277,49 a	0,63 \pm 0,11 a	0,65 \pm 0,09 a	0,72 \pm 0,16 a	1,34 \pm 0,65 a	1,07 \pm 0,29 a
-7	6,56 \pm 0,98 a	3,10 \pm 0,50 b	520,00 \pm 192,35 a	0,62 \pm 0,09 a	0,65 \pm 0,09 a	0,75 \pm 0,08 a	1,43 \pm 0,50 a	0,90 \pm 0,10 a
-5	6,87 \pm 0,90 a	3,13 \pm 0,22 b	340,00 \pm 89,44 a	0,67 \pm 0,11 a	0,73 \pm 0,15 a	0,75 \pm 0,07 a	1,60 \pm 0,65 a	0,86 \pm 0,15 a
-2	6,91 \pm 0,42 a	3,50 \pm 0,36 a	620,00 \pm 148,32 a	0,60 \pm 0,09 a	0,62 \pm 0,15 a	0,72 \pm 0,14 a	1,47 \pm 0,36 a	1,03 \pm 0,15 a
-1	6,66 \pm 0,76 a	3,29 \pm 0,37 b	400,00 \pm 122,47 a	0,61 \pm 0,06 a	0,60 \pm 0,16 a	0,60 \pm 0,08 a	1,47 \pm 0,50 a	0,99 \pm 0,08 a
0	6,69 \pm 0,75 a	3,11 \pm 0,24 b	320,00 \pm 44,72 a	0,63 \pm 0,10 a	0,66 \pm 0,08 a	0,76 \pm 0,10 a	1,53 \pm 0,55 a	0,90 \pm 0,18 a
1	6,73 \pm 0,84 a	3,46 \pm 0,27 a	360,00 \pm 134,16 a	0,59 \pm 0,11 a	0,56 \pm 0,11 b	0,70 \pm 0,19 a	1,41 \pm 0,60 a	1,13 \pm 0,31 a
2	6,76 \pm 0,81 a	3,36 \pm 0,47 b	280,00 \pm 83,67 a	0,59 \pm 0,10 a	0,59 \pm 0,12 a	0,70 \pm 0,16 a	1,52 \pm 0,50 a	1,02 \pm 0,27 a
3	6,73 \pm 0,65 a	3,54 \pm 0,32 a	360,00 \pm 89,44 a	0,53 \pm 0,08 b	0,56 \pm 0,14 b	0,72 \pm 0,11 a	1,39 \pm 0,53 a	1,18 \pm 0,41 a
5	6,49 \pm 0,57 a	3,52 \pm 0,59 a	300,00 \pm 70,71 a	0,47 \pm 0,13 b	0,47 \pm 0,14 b	0,61 \pm 0,08 a	1,42 \pm 0,46 a	1,22 \pm 0,37 a
7	7,03 \pm 0,52 a	3,81 \pm 0,40 a	360,00 \pm 54,77 a	0,51 \pm 0,09 b	0,49 \pm 0,17 b	0,65 \pm 0,07 a	1,57 \pm 0,48 a	1,22 \pm 0,27 a
10	7,20 \pm 0,37 a	3,48 \pm 1,00 a	240,00 \pm 89,44 a	0,55 \pm 0,17 b	0,55 \pm 0,18 b	0,70 \pm 0,15 a	1,92 \pm 0,34 a	1,00 \pm 0,46 a
15	6,86 \pm 0,27 a	3,34 \pm 0,17 b	360,00 \pm 89,44 a	0,53 \pm 0,05 b	0,59 \pm 0,08 a	0,73 \pm 0,08 a	1,66 \pm 0,31 a	0,96 \pm 0,13 a
21	6,83 \pm 0,22 a	3,15 \pm 0,31 b	400,00 \pm 141,42 a	0,59 \pm 0,05 a	0,64 \pm 0,07 a	0,76 \pm 0,05 a	1,69 \pm 0,25 a	0,86 \pm 0,13 a
30	6,82 \pm 0,21 a	3,57 \pm 0,34 a	360,00 \pm 89,44 a	0,49 \pm 0,07 b	0,48 \pm 0,15 b	0,62 \pm 0,07 a	1,67 \pm 0,20 a	1,11 \pm 0,20 a
39	7,01 \pm 0,33 a	3,64 \pm 0,52 a	360,00 \pm 167,33 a	0,51 \pm 0,04 b	0,52 \pm 0,12 b	0,66 \pm 0,12 a	1,67 \pm 0,25 a	1,10 \pm 0,23 a
45	7,04 \pm 0,52 a	3,90 \pm 0,66 a	360,00 \pm 89,44 a	0,48 \pm 0,13 b	0,46 \pm 0,17 b	0,67 \pm 0,11 a	1,53 \pm 0,18 a	1,27 \pm 0,34 a
49	7,15 \pm 0,42 a	3,70 \pm 0,54 a	220,00 \pm 83,67 a	0,52 \pm 0,03 b	0,52 \pm 0,11 b	0,70 \pm 0,09 a	1,71 \pm 0,34 a	1,09 \pm 0,22 a

Valores expressos como média e desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média dos animais em cada dia de tratamento. PT, Proteínas totais; Alb, Albumina; Fibr, Fibrinogênio; $\alpha 1$, $\alpha 1$ -globulina; $\alpha 2$, $\alpha 2$ -globulina; β , β -globulina; γ , γ -globulina; Alb/Glob, Albumina/Globulina. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

ANEXO 4

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos (fósforo, magnésio, sódio, potássio) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	Fósforo (mg/dl)	Magnésio (mg/dl)	Sódio	Potássio
	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$
-8	9,91 ± 1,38 b	2,46 ± 0,21 c	170,80 ± 16,95 c	5,00 ± 0,47 b
-7	9,32 ± 1,54 b	2,42 ± 0,28 c	198,40 ± 13,37 a	5,0 ± 0,66 b
-5	8,73 ± 1,91 b	2,69 ± 0,30 b	200,80 ± 18,20 a	5,08 ± 0,53 b
-2	9,18 ± 0,68 b	2,68 ± 0,17 b	185,60 ± 8,29 b	4,96 ± 0,46 b
-1	9,36 ± 1,76 b	2,70 ± 0,12 b	182,80 ± 4,15 b	4,70 ± 0,44 c
0	9,42 ± 0,57 b	2,46 ± 0,12 c	178,80 ± 15,01 b	4,22 ± 0,83 c
1	9,50 ± 1,74 b	2,44 ± 0,13 c	174,00 ± 13,71 b	4,30 ± 1,41 c
2	10,01 ± 1,25 b	2,36 ± 0,08 c	193,60 ± 3,58 a	6,62 ± 0,53 a
3	9,21 ± 1,48 b	2,64 ± 0,10 b	204,80 ± 14,18 a	6,70 ± 0,49 a
5	10,24 ± 0,81 a	2,71 ± 0,19 b	193,60 ± 6,23 a	6,42 ± 0,41 a
7	10,97 ± 1,70 a	2,62 ± 0,33 b	181,20 ± 5,02 b	6,22 ± 0,52 a
10	9,50 ± 1,38 b	2,62 ± 0,20 b	181,60 ± 10,04 b	5,34 ± 0,42 b
15	9,34 ± 0,77 b	2,40 ± 0,17 c	181,60 ± 3,29 b	5,44 ± 0,38 b
21	9,85 ± 0,88 b	2,30 ± 0,27 c	175,60 ± 11,26 b	5,36 ± 0,51 b
30	10,81 ± 0,57 a	2,62 ± 0,34 b	166,40 ± 19,41 c	5,18 ± 0,27 b
39	9,47 ± 1,72 b	2,72 ± 0,13 b	170,40 ± 30,54 c	4,80 ± 0,67 b
45	11,55 ± 1,71 a	3,05 ± 0,22 a	153,20 ± 8,67 c	4,64 ± 0,52 c
49	10,70 ± 1,02 a	2,94 ± 0,21 a	166,80 ± 11,37 c	5,38 ± 0,37 b

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média dos animais em cada dia de tratamento. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

ANEXO 5

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos séricos (uréia e creatinina) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Glicose (mg/d)
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
-8	11,32 ± 4,35 a	0,95 ± 0,17 b	63,35 ± 3,62 b
-7	11,49 ± 6,85 a	0,94 ± 0,15 b	59,23 ± 5,44 b
-5	11,41 ± 3,79 a	0,79 ± 0,16 b	65,53 ± 5,94 b
-2	13,19 ± 3,23 a	0,86 ± 0,22 b	68,64 ± 5,65 a
-1	8,27 ± 2,57 b	0,84 ± 0,12 b	71,45 ± 2,39 a
0	8,09 ± 2,39 b	0,84 ± 0,08 b	66,66 ± 5,17 b
1	8,60 ± 3,42 b	0,79 ± 0,05 b	62,83 ± 7,85 b
2	11,07 ± 3,40 a	0,78 ± 0,24 b	63,10 ± 3,15 b
3	8,51 ± 3,47 b	0,82 ± 0,07 b	62,87 ± 3,67 b
5	9,96 ± 4,31 a	0,87 ± 0,06 b	67,05 ± 7,52 b
7	7,40 ± 2,42 b	1,02 ± 0,10 a	74,56 ± 3,61 a
10	7,24 ± 2,87 b	1,12 ± 0,09 a	70,01 ± 7,38 a
15	8,68 ± 3,67 b	1,19 ± 0,11 a	74,39 ± 4,18 a
21	10,13 ± 2,97 a	1,03 ± 0,15 a	68,51 ± 4,32 a
30	5,96 ± 1,08 b	1,16 ± 0,27 a	68,85 ± 3,11 a
39	7,75 ± 2,24 b	1,05 ± 0,21 a	72,80 ± 4,42 a
45	8,85 ± 1,74 b	1,09 ± 0,19 a	70,92 ± 4,53 a
49	9,53 ± 3,99 b	1,12 ± 0,20 a	69,72 ± 6,94 a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média dos animais em cada dia de tratamento. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

ANEXO 6

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos séricos (AST, ALT, GGT, FoAl) de bezerros holandês submetidos à primoinfecção pelo carrapato *R. B. microplus*.

Dia	AST (u/l)	ALT (u/l)	GGT (u/l)	FoAl (u/l)
	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$
-8	70,44 ± 11,51 a	40,02 ± 3,95 c	14,03 ± 5,98 a	159,10 ± 41,43 b
-7	73,11 ± 10,44 a	38,36 ± 3,19 c	7,45 ± 3,67 b	152,60 ± 32,77 b
-5	77,72 ± 9,52 a	38,38 ± 2,01 c	13,03 ± 3,72 a	169,28 ± 30,57 b
-2	70,64 ± 11,52 a	35,91 ± 2,56 c	10,86 ± 4,12 b	204,40 ± 44,70 a
-1	70,16 ± 9,94 a	37,60 ± 8,41 c	12,95 ± 3,83 a	214,52 ± 38,07 a
0	69,58 ± 11,06 a	35,62 ± 4,57 c	12,59 ± 2,71 a	215,59 ± 44,28 a
1	72,30 ± 13,02 a	35,25 ± 3,15 c	16,87 ± 1,34 a	222,21 ± 35,86 a
2	74,50 ± 11,82 a	35,67 ± 2,31 c	16,86 ± 7,02 a	227,97 ± 35,14 a
3	77,09 ± 10,81 a	36,92 ± 1,59 c	14,69 ± 5,30 a	236,55 ± 29,17 a
5	72,76 ± 8,15 a	35,84 ± 3,80 c	11,71 ± 3,61 a	223,59 ± 29,54 a
7	67,46 ± 5,48 a	35,63 ± 1,10 c	11,57 ± 3,14 a	226,37 ± 29,88 a
10	75,33 ± 6,05 a	33,51 ± 2,47 c	11,08 ± 5,35 b	207,90 ± 25,91 a
15	66,29 ± 7,57 a	35,56 ± 3,74 c	6,81 ± 3,10 b	215,01 ± 37,46 a
21	74,02 ± 6,27 a	41,73 ± 3,42 b	8,91 ± 2,32 b	238,86 ± 47,80 a
30	67,95 ± 5,92 a	40,94 ± 2,58 b	14,06 ± 6,50 a	230,50 ± 33,92 a
39	74,55 ± 4,19 a	41,06 ± 2,97 b	12,22 ± 6,55 a	222,25 ± 44,33 a
45	82,62 ± 9,71 a	45,84 ± 4,41 a	9,50 ± 5,01 b	225,84 ± 59,75 a
49	79,10 ± 4,29 a	43,12 ± 1,37 b	12,87 ± 5,28 a	230,51 ± 57,24 a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média dos animais em cada dia de tratamento. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).