

UNIVERSIDADE DE UBERABA
JULIANO BERGAMO RONDA

INFLUÊNCIA DO DNA MITOCONDRIAL NA RESPOSTA IMUNOFENOTÍPICA DE
LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS DE BOVINOS DA RAÇA GUZERÁ INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

UBERABA, MG
2014

JULIANO BERGAMO RONDA

INFLUÊNCIA DO DNA MITOCONDRIAL NA RESPOSTA IMUNOFENOTÍPICA DE
LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS DE BOVINOS DA RAÇA GUZERÁ INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar.

UBERABA, MG
2014

JULIANO BERGAMO RONDA

INFLUÊNCIA DO DNA MITOCONDRIAL NA RESPOSTA IMUNOFENOTÍPICA DE
LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS DE BOVINOS DA RAÇA GUZERÁ INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba

Prof. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Universidade de Uberaba

Prof. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho ao meu pai Jamil por todo o incentivo e atenção a mim dedicados. Que mesmo com todas as dificuldades nunca perdeu a esperança em acreditar em seus sonhos. Dedico a minha mãe Eunice, pessoa humilde, com suas lindas palavras de incentivo me ajudou a conquistar mais este objetivo e um grande sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos – Universidade de Uberaba (UNIUBE), em especial ao corpo docente por todo o conhecimento e experiências transmitido.

A todos os funcionários da Universidade de Uberaba, Hospital Veterinário de Uberaba (HVU), Fazenda Escola e do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico – Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ- Belo-Horizonte-MG.

Ao Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar pela orientação neste trabalho, assim como, todos os ensinamentos transmitidos para meu crescimento na Docência e futuro Pesquisador. Suas palavras sempre serão bem vindas!

À Prof (a). Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar pelo auxílio neste trabalho e pelas palavras de incentivo, durante momentos na docência e mestrado. Suas palavras amigas e sinceras sempre ajudaram no meu crescimento como profissional.

Aos meus colegas do mestrado Paula, Dênia, e Luiz pelo companheirismo, e colaboração nos momentos de atividades e execução de técnicas neste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Everton, José Paulo, Ricardo e Alexandre por auxiliar durante as coletas de amostras e dados na Fazenda Escola, assim como na execução de técnicas laboratoriais. Vocês foram importantes para mais essa conquista.

À Médica Veterinária e residente Cláudia Ruffato Carminati pelo apoio durante a realização de procedimentos neste experimento.

À minha irmã Cristiane pela convivência em Uberaba-MG e pela companhia durante momentos difíceis.

À minha querida namorada Isabela, pelo companheirismo, amor, paciência e entendimento durante estes dois últimos anos.

À FAPEMIG, por acreditar e fomentar este trabalho.

À Fazenda Escola da Universidade de Uberaba pelo espaço cedido para realização deste experimento.

À todos familiares que de uma forma ou de outra me apoiaram para a conclusão de mais este sonho.

RESUMO

Sabe-se que animais *Bos indicus* são mais resistentes ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* quando comparados a animais *Bos taurus*. Porém ainda hoje não se sabe qual a influência do DNA mitocondrial na resistência a carrapatos. Neste contexto o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do DNA mitocondrial na infestação por carrapatos e no perfil imunofenotípico de leucócitos periféricos de animais da raça Guzerá infestados artificialmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Neste estudo foram utilizadas 20 novilhas da raça Guzerá com 18 meses de idade, sendo divididas nos grupos GI (DNA mitocondrial indicus) e GII (DNA mitocondrial taurus). Cada animal de ambos os grupos foram infestados com 20.000 larvas de carrapatos e o perfil hematológico e imunofenotípico foram avaliados em 4 diferentes momentos, D⁰ (Dia zero, antes da infestação), D⁺¹, D⁺⁹ e D⁺²¹. Nos momentos D+16 e D⁺²¹ os números de carrapatos foram contados. Os números médios de carrapatos foram de 67,6 para os animais com DNA mitocondrial indicus e 89,4 para os animais com DNA mitocondrial taurus no momento D⁺¹⁶. No momento D⁺²¹ o número médio de carrapatos foram 7,30 para os animais com DNA mitocondrial indicus e 11,4 para os animais com DNA mitocondrial taurus, sendo que não houve diferenças significativas nos valores de carrapatos entre ambos os grupos nos dois momentos. Os valores médios de hemácias no momento D+9 foram de 8,87±0,55 para o GI e 8,97±0,67 para o GII. Houve queda nos valores de eosinófilos circulantes nos animais do GI um dia após a infestação, demonstrando possivelmente melhor resposta tecidual nos animais com DNA mitocondrial indicus. Quanto aos valores imunofenotípicos de leucócitos periféricos houve redução de linfócitos T totais, linfócitos T $\gamma\delta$ e linfócitos NK CD335⁺ em ambos os grupos, demonstrando possivelmente um importante papel na resposta imunológica local contra o carrapato. Assim, pode-se concluir que bovinos da raça Guzerá não apresentam influências do DNA mitocondrial na infestação por carrapatos. Novilhas da raça Guzerá com alta infestação por carrapatos apresentam queda de hemácias, hemoglobina e hematócrito independente do DNA mitocondrial. Novilhas da raça Guzerá com DNA mitocondrial indicus apresentam possivelmente resposta de eosinófilos 1 (um) dia após a infestações por larvas de carrapatos. Os linfócitos T CD4⁺, T $\gamma\delta$ ⁺ e linfócitos B CD21⁺ são células que possivelmente são importantes na resposta a altas infestações por carrapatos

Palavras-chaves: Resistência, carrapatos, *Bos indicus*, imunofenotipagem, hematologia.

ABSTRACT

It's notorious that *Bos indicus* cattle is more resistance to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick when compared to *Bos taurus* animals. Nevertheless, the influences of the mitochondrial DNA on the tick resistance isn't still know. So, the aim of the present study was to evaluate the influence of the mitochondrial DNA on the immunophenotype profile of peripheral leukocytes from Guzerá animals submitted to an artificially infestation with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* thick. For that, 20 Guzerá heifers with 18 months of age were divided into two groups GI (with indicus mitochondrial DNA) and GII (with taurus mitochondrial DNA). Both groups were infested with 20,000 tick's larvae and the hematology and immunophenotype profiles were evaluated on 4 different moments, D⁰ (day zero, before the infestation), day 1, day 9 and day 21. On day 16 and 21 the number of ticks was manually counted. The medium number of tick were 67,6 for animals with indicus mitochondrial DNA and 84,4 for taurus mitochondrial DNA on day 16. The medium number of ticks were 7.30 for animals with indicus mitochondrial DNA and 11.4 for taurus mitochondrial DNA on day 21. Erythrocytes values on D+9 moment were 8.87±0.55 (medium ± standard deviation) for GI and 8.97±0.67 for GII. It was observed a reduction in the values of circulating eosinophils in GI animals one day after the infestation, possibly showing a better tissue response from animals with indicus mitochondrial DNA. Considering the values for the immunophenotype profile of peripheral leukocytes, it was possible to notice a reduction on total T lymphocytes, $\gamma\delta$ T lymphocytes and NK CD335⁺ lymphocytes in both groups, which possibly evidence an important role from the local immunologic response against the tick. So, it was possible to conclude that heifers Guzerá not show influences of mitochondrial DNA in tick infestation. The heifers Guzerá with high tick infestation have decrease of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit independent of mitochondrial DNA. The heifers Guzerá with indicus mitochondrial DNA possibly show a response to eosinophil one (1) day after the larvae of ticks infestations. The response of lymphocytes T CD4⁺, T $\gamma\delta$ ⁺ and lymphocytes B CD21⁺ to the tick could be considered as of greater importance for tick infestations

Key-words: resistance, tick, *Bos indicus*, immunophenotyping, hematology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fêmeas da raça Guzerá em sistema extensivo de criação.	18
Figura 2 Linha média dorsal na região de cernelha em uma fêmea bovina da raça Guzerá, após infestação experimental com 20.000 larvas do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (círculo), realizada na Fazenda Escola, UNIUBE, MG, Brasil.....	32
Figura 3 População de leucócitos de sangue periférico de fêmea da raça Guzerá. As populações estão selecionadas (A) Linfócitos; (B) Monócitos; (C) Neutrófilos; (D) Basófilos e eosinófilos.....	35
Figura 4 Representação gráfica da população leucocitária de sangue periférico em fêmea da raça Guzerá, sendo linfócitos (A) baseados no tamanho versus granulosidade e monócitos (B) baseada na granulosidade versus fluorescência (FL1).....	36
Figura 5 Representação gráfica da população de linfócitos de sangue periférico de novilhas da raça Guzerá marcados com o anticorpo monoclonal anti CD4 ⁺ FITC (A); CD8 ⁺ FITC (B); CD25 ⁺ FITC (C) e WC1 ⁺ FITC (D).....	36
Figura 6 Representação gráfica da população de linfócitos B e linfócitos NK do sangue periférico de novilhas da raça Guzerá marcados com o anticorpo monoclonal anti CD21 ⁺ (FITC) e anti CD335 ⁺ (PE).....	37
Figura 7 Médias e desvios padrão da contagem de hemácias (A), Hemoglobina (B), Hematócrito (C), VCM (D), CHCM (E) e Proteínas plasmáticas (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.....	40

Figura 8 Médias e desvios padrão da contagem de leucócitos totais (A), Segmentados (B), Linfócitos (C), Eosinófilos (D), Monócitos (E) e Basófilos (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG..... 42

Figura 9 Médias e desvios padrão dos valores de linfócitos T totais (A), linfócitos T CD4⁺ (B), linfócitos T CD8⁺ (C), linfócitos T Gama-delta (D), linfócitos T CD25⁺ (E) e relação entre CD4⁺/CD8⁺ (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG..... 45

Figura 10 Médias e desvios padrão dos valores de linfócitos B CD21⁺ (A), relação LT/LB (B), linfócitos NK CD335⁺ (C), monócitos CD14⁺(D) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Desenho experimental, com detalhamento dos momentos de infestação com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , colheitas de sangue e contagens de carrapatos, dos dois grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial <i>Indicus</i> (DNAmiT) ou DNA mitocondrial <i>Taurus</i> (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.....	31
Tabela 2 - Painel de anticorpos monoclonais (Serotec®) utilizado para reconhecimento de marcadores celulares na superfície de leucócitos do sangue periférico de bovinos da raça Guzerá com diferente tipos de DNAmiT.....	34
Tabela 3 - Valores de amplitudes máxima (Máx) e mínima (Mín), média e desvios padrão do número de carrapatos dos dois grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial <i>Indicus</i> (DNAmiT) ou DNA mitocondrial <i>Taurus</i> (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	-	Grupos de diferenciação
CHCM	-	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FITC	-	Isocianato de Fluoresceína
FL	-	Detector de fluorescência
GI	-	Grupo I
GII	-	Grupo II
HCM	-	Hemoglobina Corpuscular Média
IFN- γ	-	Interferon gama
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
LB	-	Linfócito B
LT	-	Linfócito T
LT $\gamma\delta$	-	Linfócito T gama-delta
MHC	-	Complexo de histocompatibilidade principal
DNAmit	-	Ácido Desoxirribonucléico mitocondrial
MoAb	-	Anticorpo monoclonal
NK	-	Célula <i>Natural Killer</i>
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
PCR	-	Reação em cadeia de polimerase
PE	-	Ficoeritrina
RNA	-	Ácido Ribonucléico
SSC	-	Side Scatter
FSC	-	Forward Scatter
TA	-	Temperatura ambiente
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa
LT reg	-	Linfócito T regulador
TRL	-	<i>Toll-like Receptor</i>
VCM	-	Volume Corpuscular Médio

WC - *Workshop Cluster*
PG - Prostaglandina
PGE₂ - Prostaglandina E₂

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	CARACTERÍSTICAS ADAPTATIVAS DE BOVINOS ZEBUÍNOS.....	17
2.2	DNA MITOCONDRIAL.....	19
2.3	O ECTOPARASITA <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
2.3.1	O ciclo biológico do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	21
2.3.2	Mecanismos de defesa do carrapato.....	21
2.4	MÉTODOS DE CONTROLE CONTRA O CARRAPATO.....	22
2.5	RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O CARRAPATO.....	23
2.5.1	Resposta Imunológica Inata.....	25
2.5.2	Resposta Imunológica Adquirida.....	25
2.6	VALORES HEMATOLÓGICOS.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAL DE MÉTODOS	30
4.1	NORMAS ÉTICAS.....	30
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	30
4.3	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	30
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
4.5	INFESTAÇÃO EXPERIMENTAL.....	31
4.6	CONTAGEM DE CARRAPATOS.....	32
4.7	COLETA DE SANGUE.....	33
4.8	AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO.....	33
4.9	AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS.....	34
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS	38
5.1	AVALIAÇÃO PARASITÁRIA.....	38
5.2	VALORES HEMATOLÓGICOS.....	38
5.3	VALORES LEUCOCITÁRIOS.....	41

5.4	VALORES IMUNOFENOTÍPICOS.....	43
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO A: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	62
	 APÊNDICE A: VALORES DE AMPLITUDES MÁXIMA (MÁX) E MÍNIMA (MÍN), MÉDIA E DESVIOS PADRÃO (DP) DO PERFIL ERITROCITÁRIO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DOS GRUPOS DE NOVILHAS GUZERÁ COM DNA MITOCONDRIAL <i>INDICUS</i> (DNAMITI) OU DNA MITOCONDRIAL <i>TAURUS</i> (DNAMITT) MANTIDOS NA FAZENDA ESCOLA DA UNIUBE, MG	63
	 APÊNDICE B: VALORES DE AMPLITUDES MÁXIMA (MÁX) E MÍNIMA (MÍN), MÉDIA E DESVIOS PADRÃO (DP) DO PERFIL LEUCOCITÁRIO DOS GRUPOS DE NOVILHAS GUZERÁ COM DNA MITOCONDRIAL <i>INDICUS</i> (DNAMITI) OU DNA MITOCONDRIAL <i>TAURUS</i> (DNAMITT) MANTIDOS NA FAZENDA ESCOLA DA UNIUBE, MG	64
	 APÊNDICE C: VALORES DE AMPLITUDES MÁXIMA (MÁX) E MÍNIMA (MÍN), MÉDIA E DESVIOS PADRÃO (DP) DO PERFIL LEUCOCITÁRIO DOS GRUPOS DE NOVILHAS GUZERÁ COM DNA MITOCONDRIAL <i>INDICUS</i> (DNAMITI) OU DNA MITOCONDRIAL <i>TAURUS</i> (DNAMITT) MANTIDOS NA FAZENDA ESCOLA DA UNIUBE, MG	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho mundial de bovinos com 201.717 milhões de animais, sendo considerado um dos principais exportadores de carne bovina, com 1.243 mil toneladas de carne exportadas em 2012 (ABIEC, 2013).

Sabe-se que animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) são mais adaptados ao clima tropical e resistentes aos ectoparasitas. Entre as características que possibilitam esta adaptação e resistência estão o maior número de glândulas sudoríparas, pelagem curta, lisa e densa, produção de repelentes naturais, movimentação de orelhas e cauda, panículos musculares, assim como, o hábito de se lamberem. Sendo o uso de animais zebuínos importante ferramenta nos cruzamentos com animais taurinos, auxiliando assim, na complementariedade das raças (RESTLE et al., 2005; MARTINEZ et al., 1988; MADALENA et al., 1990; VALENTE et al., 2001). Porém sabe-se que durante a formação do rebanho nacional, a maior parcela de animais zebuínos importados eram machos (MAGNABOSCO, 1997; MEIRELLES et al., 1999), sendo que estes touros foram utilizados em cruzamentos com raças taurinas presentes no Brasil. E com isso os animais zebuínos podem apresentar dois grupos de acordo com o conteúdo do seu DNA mitocondrial (DNA mit), sendo eles DNA mit indicus e DNA mit taurus (MEIRELLES et al., 1999). Trabalhos já foram realizados na busca de identificar a influência do DNAmit em diferentes características ligadas a produção e reprodução de bovinos. Segundo Paneto et al. (2008) ao analisar vacas Guzerás com DNA mitocondrial taurino e Indicus, observou que não houve influência do DNA mitocondrial na produção total de leite na lactação, duração da lactação, idade ao primeiro parto e intervalo de partos. Contudo, no estudo de RIBEIRO et al. (2009) observaram influência da origem mitocondrial na idade ao primeiro parto, sendo os animais taurinos, em média, 30,1 dias mais precoces que os de origem indiana. No entanto trabalhos envolvendo a resistência de bovinos aos carrapatos ainda não existem. Estudos buscando resistência ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* são de grande relevância, já que este parasita leva a perdas significativas a nível mundial, sendo responsável por prejuízos anuais de mais de dois bilhões de dólares (GRISI et al., 2002). Devido-a perda de peso, queda na produção leiteira, anemia, lesões no couro, bem como a transmissão de doenças como a babesiose e anaplasiose (LITTLE, 1963; O'KELLY e SEIFERT, 1970; SEIFERT, 1970a; JONGEJAN e UILENBERG, 2004; JONSSON, 2006; ANDREOTTI, 2010; CHANIE et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do DNA mitocondrial na infestação de carrapatos e resposta imunofenotípica de leucócitos periféricos, de zebuínos da raça Guzará artificialmente infestados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS ADAPTATIVAS DE BOVINOS ZEBUÍNOS

Os animais da raça Guzerá tem sua origem da região norte da Índia, tendo como habitat natural terras baixas, com precipitação pluvial média de 500 – 650 mm/ano com temperaturas que variam de 5 a 50°C. Esses animais têm pelagem variando do cinza claro ao cinza escura, chifres em forma de lira, pêlos curtos e pele escura (Figura 1). São animais que apresentam características de dupla aptidão, com os animais em idade adulta chegando a atingir 1.300 kg e 950 kg de peso vivo machos e fêmeas respectivamente, e suas fêmeas atingido produções de leite acima de 5.000 kg de leite.lactação⁻¹. São animais rústicos, bem adaptados aos baixos índices pluviométricos e às variações amplas de temperatura, fazendo com que sofram menos as variações climáticas e intempéries, principalmente, as altas temperaturas, se comparado com animais taurinos (SANTOS, 2005).

O Guzerá tem demonstrado bons resultados em cruzamentos com raças européias, obtendo bezerros e bezerras de maior rusticidade com características de bom ganho de peso e capacidade de produção leiteira. Este cruzamento propicia fêmeas com maior habilidade materna e um desempenho médio de peso superior das crias. Os cruzamentos com gado Guzerá foi base para a formação de algumas raças brasileiras como: Indubrasil, Tabapuã, Pitangueiras, Lavínia, e especialmente a raça Guzolando. A raça Guzerá tem linhagens de animais de dupla aptidão, existindo ainda linhagens especializadas em carne ou leite além de produtores que selecionam seus rebanhos para as duas funções (SANTOS, 2005).

Embora a diferença mais marcante entre as duas subespécies seja a presença da giba ou cupim, músculo rombóide desenvolvido encontrada no zebuíno, existem diferenças muito mais complexas relacionadas à origem, pois uma é européia e de clima temperado e a outra asiática de clima tropical; a conformação; o temperamento; a constituição e a fisiologia (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983).



Figura 1. Fêmeas da raça Guzerá em sistema extensivo de criação

Fonte: <http://www.lageado.com.br/site/?p=150> Acesso em: 17 fevereiro 2014

Os zebuínos são considerados como espécie ideal para as atividades de criação em regiões tropicais e subtropicais, pois apresentam excelente capacidade de adaptação a altas temperaturas e as forrageiras de baixa qualidade. Entre as qualidades dos zebuínos pode-se dizer que o *Bos indicus* possui uma pele mais fina, entretanto sua resistência é maior por ser pigmentada, apresentando tons escuro ou totalmente preto, melhor visualizado em regiões desprovidas de pêlos como o focinho, pálpebras e aberturas naturais (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983). Esta pele é bem abundante e se encontra solta sobre o corpo do animal formando dobras no pescoço e estendendo-se pela barbela e prepúcio, além de possuir maior número de glândulas sudoríparas em média cerca de 1.300/cm² a 954/cm² nos taurinos, que são mais ativas. Todas essas características facilitam ao *Bos indicus* dissipar calor, lhes permitindo não alterar a respiração e a temperatura corporal (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983).

Esses animais possuem considerável resistência natural contra diversos ectoparasitas como, por exemplo, carrapatos e moscas, que se proliferam nas regiões de clima quente. A pelagem curta, lisa e densa (4.700-5000 pêlos por polegada) impede ou dificulta a penetração de pequenos parasitas na superfície da pele ou que aí procurem se fixar, enquanto que nos europeus a pelagem longa, fina, lanosa e rala, (3.000 pêlos por polegada), além de facilitar a fixação (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983; VERÍSSIMO et al., 1998).

Além disso, os zebuínos secretam uma substância oleosa, de cor amarelada, encontrada especialmente nas dobras da pele, que funciona como repelente. A produção desse repelente está relacionada à luminosidade, cujos animais com maior exposição ao sol possuem maior produção do óleo. Outros recursos utilizados pelos animais indianos para afastar os ectoparasitos são os panículos musculares, bastante desenvolvidos, que permitem mover livremente a pele, como os equinos, e com isso afugentam os parasitas que os incomodam. As orelhas longas e móveis junto com a cauda de terminação flexível do zebu também auxiliam igualmente na luta contra ectoparasitos (DOMINGUES, 1974; SANTIAGO, 1983). Os bovinos indianos também possuem o hábito de se lamberem e lamberem uns aos outros, chamado de autolimpeza. Com esse hábito, eles retiram larvas de carrapatos da pele e diminuem o número de parasitas no rebanho (CARDOSO et al., 1999).

2.2 DNA MITOCONDRIAL

Com o avanço da biologia molecular, técnicas baseadas em polimorfismos de DNA passíveis de serem utilizadas no estudo filogenéticos, na análise da diversidade populacional e na identificação de indivíduos foram desenvolvidas desde a década de 70, mas foram efetivamente aplicadas para estes estudos em espécies animais a partir do final da década de 80, intensificando-se nos anos 90 (EGITO, 2007).

O DNAmít está localizado na membrana interna da mitocôndria, organela presente no citoplasma das células eucarióticas, cuja principal função é a fosforilação oxidativa. Segundo Egito (2007) o DNAmít é formado por uma fita simples de DNA circular semelhante a um plasmídeo, possuindo menos que 20kb na maioria dos mamíferos. Por ser este transmitido apenas pela linhagem materna (GILES et al., 1980), o estudo permite distinguir a origem da linhagem (FILHO et al. 2010). Segundo Egito (2007) sendo essencialmente haplóides e transmitidos uniparentalmente, o DNAmít e o cromossomo Y abriram uma nova perspectiva no estudo da genética de populações.

A maioria dos animais zebuínos trazidos nas importações eram machos (MAGNABOSCO, 1997), os produtos resultantes do processo de cruzamentos absorventes de touros zebuínos nas vacas de origem taurina nacional, conservaram ao longo do tempo e com o passar das gerações o DNAmít de origem taurina. Este processo foi confirmado por Meirelles et al. (1999) que identificaram 79; 73 e 100% dos animais analisados das raças Nelore, Gir e Brahman puros de origem, respectivamente, como portadores de DNAmít de

origem *Bos taurus*. Em animais da raça Guzerá, dos 729 animais analisados, 69% apresentaram DNAm_{it} indicus e 28% DNAm_{it} taurus (PANETO et al., 2008).

BIASE et al. (2007) estudando polimorfismos no DNAm_{it} em animais da raça Nelore, concluíram que os mesmos afetam características ponderais e que podem ser uma fonte de variação genética em características quantitativas. Os autores observaram ainda que o efeito da variação do genoma do DNAm_{it} na produção de leite e carne pode ser uma consequência de alterações de rotas metabólicas ou de energia disponível para produção de leite e desenvolvimento do tecido muscular.

PANETO et al. (2008), em um estudo para verificar a existência de diferenças em relação a características produtivas e reprodutivas (produção total de leite na lactação, duração da lactação, idade ao primeiro parto, e intervalo de partos), entre bovinos da raça Guzerá com aptidão leiteira da origem mitocondrial (indicus ou taurus), concluiu que não houve influências do DNAm_{it} em características produtivas e reprodutivas.

Contudo, no estudo de RIBEIRO et al. (2009) observaram influência significativa ($P < 0,05$) da origem mitocondrial na idade ao primeiro parto, sendo os animais taurinos, em média, 30,1 dias mais precoces que os de origem indiana.

2.3 O ECTOPARASITA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ectoparasita pertencente ao filo Artropoda, classe Aracnida, ordem Acarina, subordem Metastigmata e superfamília Ixodidea (JOHNSTON et al., 1986) é responsável por perdas na pecuária mundial, chegando a 2 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002) ocasionando redução no ganho de peso, aumento na conversão alimentar, redução na produção leiteira, lesões de couro, anemia, infecções por hemoparasitas e morte (LITTLE, 1963; O'KELLY; SEIFERT, 1970; SEIFERT, 1970; WILLADSEN et al., 1988; JONGEJAN; UILENBERG, 2004; PETER et al., 2005; JONSSON, 2006; BIANCHIN et al, 2007; DE LA FUENTE et al., 2008; GUEDES JÚNIOR et al., 2008; ANDREOTTI, 2010; CHANIE et al, 2010).

2.3.1 O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O desenvolvimento do ectoparasita *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é dividido em duas fases, sendo a fase de vida livre e fase de vida parasitária. A fase de vida livre sofre interferências climáticas, trazendo alterações nos seus períodos, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura. Por outro lado, a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões (GONZALES, 1975).

A fase de vida parasitária inicia-se após a subida da larva infestante no hospedeiro, as larvas darão origem a metalarvas e estas após a troca de cutículas darão origem às ninfas. As ninfas se alimentam de sangue e sofrem uma muda, dando origem às metaninfas. No 15º dia ocorrerão as diferenciações sexuais de neandro (machos) e neóginas (fêmeas). As fêmeas após o acasalamento começam a se alimentar de sangue até o ingurgitamento total (teleóginas), se desprendendo do animal e dando início a fase de vida livre (FURLONG, 1993; GONZALES, 1974; PEREIRA et al., 2008).

A fase de vida livre inicia-se com três dias de pré-postura e se estende até a eclosão dos ovos e a transformação das neolarvas em larvas infestantes, sendo um período total de três a seis semanas para a postura; de 22 a 30 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, quando se transformam em larvas infestantes (FURLONG, 1993; GONZALES, 1974).

2.3.2 Mecanismos de defesa do carrapato

A saliva do *R. (B.) microplus* é um potente modulador negativo do sistema imune bovino (SCHOELER; WIKEL, 2001). As moléculas secretadas serão responsáveis por várias alterações no local de fixação do carrapato, possuindo mecanismos para controlar a agregação plaquetária, coagulação e resposta imune do hospedeiro a fim de obter uma alimentação eficiente (BROSSARD; WIKEL, 1997).

O conteúdo das glândulas salivares do parasita possui potente atividade imunossupressora, inibindo a proliferação de linfócitos, capacidade fagocitária e atividade oxidativa de neutrófilos e monócitos (TITUS; RIBEIRO, 1988; SCHOELER; WIKEL, 2001;

TURNI et al., 2002; TURNI et al., 2004; TURNI et al., 2007; MARUYAMA et al., 2010; FONTAINE et al., 2011).

A calreticulina é uma proteína salivar envolvida em uma série de eventos biológicos como a antihemostase, atividade de lectinas e complemento (BENEDICT et al., 1993; KOVACS et al., 1998).

Proteínas ligantes de imunoglobulina estão presentes em extratos de glândula salivar de carrapatos. Seu papel aparente consiste na neutralização de anticorpos do hospedeiro que circulam no parasita (ALLEN; HUMPHREYS, 1979; WANG; NUTTALL, 1994).

A saliva de alguns artrópodes apresenta uma proteína ligante de IL-2, sendo assim, capaz de influenciar na atividade de linfócitos T, linfócitos B, células Natural Killer, monócitos e macrófagos (GILLESPIE et al., 2001).

As proteínas plasmáticas do sistema complemento apresentam funções ligadas a instalação de resposta inflamatória, quimiotaxia, opsonização e atividade microbicida (FEARON, 1998; MASTELLOS; LAMBRIS, 2002). Sendo que proteína inibidora de sistema complemento foi purificada da saliva de carrapatos. Essa proteína inibe a ligação de C3b e acelera o desacoplamento da molécula Bb da via alternativa (VALENZUELA et al., 2000).

A Salp 15 é uma proteína presente na saliva de carrapatos, sendo responsável pela inibição da ativação de linfócitos T CD4⁺. Ela se liga a essas células inibindo a produção de IL-2 e expressão de CD25⁺ sem, contudo, afetar a atividade de linfócitos B (ANGUITA et al., 2002). Já a prostaglandina E₂ (PGE₂) está presente na saliva de *R. (B.) microplus* (DICKINSON et al., 1976), influenciando na resposta imune do hospedeiro, sendo capaz de aumentar a produção de citocinas do padrão Th2 e diminuir as de padrão Th1, inibindo a proliferação de linfócitos T (HARRIS et al., 2002; BROSSARD; WIKEL, 2004; MEJRI; BROSSARD, 2007).

2.4 MÉTODOS DE CONTROLE CONTRA O CARRAPATO

Controlar a população de carrapatos a níveis aceitáveis é crucial para minimizar estas perdas econômicas massivas. Existem diferentes métodos de controle, sendo divididos nos métodos de controle biológico (SAMISH; GLAZER, 2001), alterações de habitat por plantio de vegetais que podem repelir e matar o carrapato (SUTHERST et al., 1982), o controle imunológico (WILLADSEN, 2004; VERCRUYSSSE et al., 2007), o controle químico

(PRUETT, 1999) e o desenvolvimento de raças resistentes ao carrapato (PIPER et al., 2010; RODRIGUEZ-VALLE et al., 2010).

Infelizmente, as estratégias de controle atualmente adotadas contra *R. (B.) microplus* baseado em acaricidas convencionais estão se tornando menos eficiente e cada vez mais caro, devido à resistência generalizada a acaricidas atuais (KUNZ; KEMP, 1994; WILLADSEN, 2006; ROSARIO-CRUZ et al., 2009).

O uso intensivo de acaricidas, a fim de controlar a infestação de carrapatos levanta preocupações quanto à possível presença de resíduos no leite, carne, e ambiente (HENRIOUD, 2011). Sendo então desenvolvidos os métodos biológicos com uso de vacinas comerciais contra o carrapato (WILLADSEN, 2004; SEIXAS et al., 2012). Para melhorar e agregar aos métodos de controle, tem se buscado o uso de animais resistentes, sendo discutido com profundidade como um método viável de controle, pois a resistência constitui a base de uma abordagem sustentável e ambientalmente saudável para a produção de gado (DONALD, 1994), reduzindo as despesas com produtos químicos (FRISCH, 1999).

Os bovinos apresentam um conjunto de mecanismos que impedem o desenvolvimento normal dos carrapatos durante o estágio parasitário. Esses mecanismos de proteção à infestação caracterizam a resistência a esses parasitas (PEREIRA et al., 2008). Bovinos *Bos indicus* são geralmente mais resistentes a infestações por carrapatos quando comparado a bovinos *Bos taurus*, no entanto, grandes variações de resistência podem ocorrer dentro das raças (SEIFERT, 1970; PEREIRA et al., 2008). A resistência do gado indiano ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ainda é um mistério para pesquisadores, pois esses bovinos apresentam diferentes tipos de defesa. Além desses fatores, podem-se incluir as respostas imunológicas mais específicas e a influência de fatores ambientais, tais como idade, sexo, estação do ano, tipo de pastagens e outros, que juntos auxiliam na redução do número de carrapatos que parasitam os bovinos (UTECH, et al, 1978a; DOUBE; WHARTON, 1980; SUTHERST et al, 1983; ANDRADE, 1996, Apud CARDOSO et al. 1999).

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O CARRAPATO

Estudos referentes à imunidade inata e adquirida têm sido importantes na busca de animais resistentes aos carrapatos, sendo considerado como método de controle viável, por reduzir gastos potenciais com produtos químicos (FRISCH, 1999; GRAF et al., 2004; CASTRO-JANER et al., 2010).

A fixação e desenvolvimento do carrapato induzem uma resposta imune nos bovinos envolvendo a apresentação de antígenos via APC, LT, LB, anticorpos, citocinas, sistema complemento, basófilos, eosinófilos e uma variedade grande de moléculas bioativas (WIKEL, 1996; BROSSARD e WIKEL, 1997). Sendo associadas a reações de hipersensibilidade, com infiltrações de eosinófilos e presença de histamina (SCHLEGER, et al., 1976; KEMP et al., 1983).

Piper et al. (2008) utilizando PCR quantitativo, demonstraram a expressão de genes na pele de animais Brahman (*B. indicus*) e holandeses (*B. taurus*). Quarenta e quatro genes foram escolhidos para o estudo, incluindo aqueles envolvidos em resposta imune inata e alguns genes sugeridos por estar envolvido na resistência adaptativa (WANG et al., 2007). Quinze genes foram mais expressos em amostras de pele de animais holandeses em comparação com amostras provenientes de animais Brahman, sugerindo um aumento da resposta inflamatória mediada por células no local de fixação, nos animais suscetíveis holandeses (PIPER et al., 2008).

Segundo Piper et al. (2008), novilhas das raça Brahman infestadas artificialmente com carrapatos apresentaram menos carrapatos do que novilhas holandesas durante toda a duração do experimento. O número médio de carrapatos nos animais da raça Brahman foram 30 carrapatos, enquanto o número médio de carrapatos nos animais holandeses foram de 302.

Após infestação artificial realizada por Ibelli et al., 2012 os animais das raças Nelore, ½ Nelore x ½ Senepol e ½ Nelore x ½ Angus apresentaram valores de $8,52 \pm 7,26$; $18,81 \pm 7,26$ e $75,34 \pm 8,33$ carrapatos respectivamente. Segundo Jonsson (2006) houve menores números de carrapatos em animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) quando comparado com as raças puras de *Bos taurus*.

Veríssimo et al. (2002) compararam fêmeas das raças Holandês, Gir e mestiças, e atribuíram a menor resistência às vacas Holandês e a maior às vacas Gir. Analisando diferentes grupos genéticos, Silva et al. (2007) expuseram fêmeas bovinas a quatro infestações artificiais, atribuindo a menor suscetibilidade a novilhas Nelore, resistência intermediária a fêmeas Canchim x Nelore, e maior carga parasitária nos produtos do cruzamento entre Angus x Nelore e Simental x Nelore. Segundo Ayres et al. (2009) analisaram dados de contagens de carrapatos em bovinos Braford pertencentes a um programa de melhoramento e verificaram que o número de carrapatos diminuía à medida que a proporção de genes *B. indicus* aumentava. Demonstrando que os bovinos demonstraram

fenótipos divergentes no que diz respeito à resistência a carrapatos, mudanças na expressão gênica e as populações celulares na pele após a infestação de carrapatos (PIPER et al., 2008).

2.5.1 Resposta imunológica inata

O sistema imune inato está naturalmente presente no hospedeiro sendo a primeira linha de defesa do organismo dos bovinos. Este sistema é formado pelos macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos. Além das barreiras físicas como epitélio e substâncias naturais produzidas pela pele, sendo até mesmo responsável por auxiliar no desenvolvimento de resposta imune adquirida (ABBAS et al., 2003).

A fixação do carrapato na pele do hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória na qual a participação de neutrófilo é controlada principalmente pela IL-8 (BROSSARD; WIKEL, 2004). Porém os carrapatos apresentam a capacidade de inibir esta resposta, já que os extratos de glândulas salivares de vários carrapatos inibem, *in vitro*, a ligação do IL-8 com os seus receptores em granulócitos humanos e, portanto, muito provavelmente em neutrófilos de animais (HAJNICKA et al., 2001; BROSSARD e WIKEL, 2004). Dessa forma, a saliva do carrapato pode controlar, em parte, a infiltração e ativação de neutrófilos no local de fixação.

O extrato de glândula salivar de *I. ricinus* é capaz de inibir a via alternativa do complemento e o *I. scapularis* possui um inibidor de C3 convertase, fatos que demonstram que essa via de resposta é importante na aquisição de resistência pelo hospedeiro, já que a ativação da cascata do complemento, no local da fixação do parasita, gera mediadores inflamatórios, de quimiotaxia e opsoninas que resultam na atração de células, como basófilos e eosinófilos (ALLEN, 1973; BROSSARD; FIVAZ, 1982).

Segundo Bittar (2004) a imunidade contra parasitos depende de uma combinação das imunidades inata e adquirida do hospedeiro aos antígenos desses parasitos.

2.5.2 Resposta imunológica adquirida

As Respostas imunes adquiridas são mediadas por linfócitos B e linfócitos T, sendo os linfócitos T divididos nas subpopulações CD4⁺, CD8⁺ e gama-delta (ABBAS et al., 2002; DE VISSER et al., 2006; IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Após a identificação dos invasores, o sistema imune tenta neutralizar os efeitos prejudiciais das moléculas isoladas e destruir os microrganismos. Essa capacidade é determinada pelos linfócitos, população leucocitária mais importante da resposta imune. A imunidade humoral é o principal mecanismo de defesa contra antígenos extracelulares e suas toxinas, pois os anticorpos secretados podem se ligar a esses antígenos e a suas toxinas (ABBAS et al., 2002). Em geral os anticorpos podem ser específicos a um antígeno, neutralizando-o pela fagocitose ou marcando-o para a eliminação por mecanismos de opsonização, assim como desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios (ABBAS et al., 2002). Os hospedeiros produzem anticorpos contra elementos do carrapato e estes estão relacionados com a resistência ao parasita que é transmitida, mesmo que fracamente, de forma passiva pelas vacas aos seus bezerros, (ROBERTS; KERR, 1976; BROSSARD; GIRARDIN, 1979). Porém durante período de infestação intensa com carrapatos *R. (B.) microplus* ocorre uma diminuição significativa nos níveis de anticorpos dos animais suscetíveis, intensamente infestados, em relação aos níveis verificados durante um período de infestação moderada ou baixa sugerindo que a partir de determinado limiar de infestação há uma modulação na atividade dos linfócitos B e/ou nos níveis séricos das imunoglobulinas (KASHINO et al., 2005).

Bovinos exposto repetidamente a infestações pelo carrapato ou imunizados com tecidos do carrapato adquirem resistência parcial a infestações subsequentes, esta proteção ocorre por danificação de estruturas internas do carrapato, redução no volume de sangue ingerido e redução no número e viabilidade de ovos. Esta proteção é baseada em resposta imune celular e humoral (OPDEBEECK, 1994; KIMARO; OPDEBEECK, 1994).

A análise imunofenotípica por meio da citometria de fluxo consiste em utilizar anticorpos monoclonais que apresentam especificidade para moléculas expressas na superfície leucocitária designadas internacionalmente como CD (*cluster of differentiation*). Os anticorpos monoclonais reagem especificamente com distintos CDs e assim, pode-se ter uma avaliação da expressão dos diferentes marcadores de superfície leucocitária e a funcionalidade efetora do sistema imune (SATHLER-AVELAR et al., 2003). A expressão destes antígenos de diferenciação leucocitários permitiu a identificação das principais populações de células leucocitária, os quais, em alguns casos, têm propriedades funcionais distintas.

Neste contexto, estudos de parâmetros imunológicos do sangue periférico de bovinos infestados por carrapatos são variáveis e algumas vezes conflitantes. Segundo Inokuma et al. (1994) infestação por carrapatos geralmente levam a diminuição de linfócitos circulantes. Já Rechav et al. (1990) mostraram que animais *B. taurus* infestados por carrapatos apresentavam

altos níveis de gamaglobulina e aumento de leucócitos em comparação com *B. indicus*. Segundo Piper et al. (2009) animais *Bos indicus* apresentam uma alta porcentagem de linfócitos T gama/delta, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD25⁺ enquanto que os animais *Bos taurus* apresentaram aumento nos níveis de monócitos (CD14⁺), concluindo que animais zebuínos apresentaram uma maior resposta de linfócitos T enquanto que taurinos apresentaram uma melhor resposta relacionada com macrófagos.

Bittar et al. (2004), avaliaram o perfil imunofenotípico de linfócitos de bovinos adultos (*Bos taurus*) das raças Holandesa, Hereford e Pardo-Suíça, observando variações de CD4⁺ (23,8 a 39,8%), CD8⁺ (17,2 a 28,1%) e CD21⁺ (12,2 a 18,8%) entre as raças. Sugeriram que a imunofenotipagem de linfócitos pode influenciar o padrão de resposta imune.

Segundo Macêdo et al. (2013) o aumento nos valores percentuais de monócitos nos animais zebuínos (Guzerá, Nelore e Gir) e o aumento de linfócitos T CD4⁺ nas raças Guzerá e Hereford são indicativos de maior resistência destes animais. Pois sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ apresentam papel fundamental na síntese de citocinas como IFN- γ e TNF- α contribuindo com a ativação e de células fagocitárias e síntese de reativos intermediários do oxigênio (BROWN et al., 1995; SERAFINO et al., 2007). Ainda segundo o autor houve também aumento significativo na porcentagem de linfócitos não T e não B (NTNB) nos animais zebuínos. Estas células correspondem aos linfócitos natural Killer (NK) e linfócitos T Gama-delta. Segundo Bradford et al. (2001) os linfócitos NK são responsáveis pela destruição de células infectadas por vírus. Já os linfócitos T Gama-delta estão presentes em alta concentração em áreas epiteliais de mucosas (HEDGES et al., 2003). Foi identificado que os linfócitos T Gama-delta podem auxiliar no controle de infecções por *Brucella abortus*, inibindo a replicação do agente no interior de macrófagos via produção de IFN- γ . (SKYBERG et al., 2011). Sendo assim de grande relevância para bovinos os bovinos jovens e adultos (GUZMAN et al., 2012).

2.6 VALORES HEMATOLÓGICOS

O sangue é constituído por três classes de células, eritrócitos, leucócitos e trombócitos, possui como função o transporte de nutrientes do trato digestivo para os tecidos, o transporte de produtos finais do metabolismo das células para os órgãos de excreção, a regulação da temperatura corporal, a manutenção constante da concentração de água e eletrólitos nas

células, a regulação da concentração do íon hidrogênio e a defesa contra microrganismos (CAMPOS, 2008).

Os parâmetros hematológicos podem ser citados como importante ferramenta para avaliar o grau de estresse térmico ao quais os bovinos estão sendo submetidos. Assim como no estudo da adaptabilidade ao clima tropical, já que uma das características favorável dos zebuínos em relação aos taurinos é a quantidade maior de glóbulos sanguíneos por milímetro cúbico de sangue, sendo que bovinos europeus apresentam cerca de 30% a menos de hemácias e essas são maiores nos indianos, ou seja, maior volume celular médio (VCM) (DOMINGUES, 1974; ROBERTO et al., 2010).

A hemoglobina é um dos fatores que também está ligada à capacidade de adaptação, pois animais *Bos indicus* apresentam valor de hemoglobina 30% maior que a do gado europeu (DOMINGUES, 1974).

Entre os animais zebuínos os valores hematológicos podem apresentar variações entre raças, sendo que segundo Alves Júnior et al. (2009), animais das raças Gir, Nelore e Guzerá apresentam respectivamente valores de hemácias ($6,87 \pm 0,96$; $8,02 \pm 0,48$ e $7,88 \pm 0,39$), hemoglobina ($10,82 \pm 0,60$; $12,62 \pm 1,12$ e $13,10 \pm 0,84$), hematócrito ($28,34 \pm 4,36$; $36,90 \pm 3,49$ e $39,10 \pm 2,73$), VCM ($41,3 \pm 0,94$; $45,2 \pm 2,22$ e $50,0 \pm 2,68$) e CHCM ($38,0 \pm 4,37$, $34,4 \pm 1,65$ e $33,05 \pm 0,74$). E ainda segundo os autores níveis superiores de hemácias, volume globular e concentração de hemoglobina podem estar associados à melhor adaptação climática dos bovinos das raças Guzerá e Nelore.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do DNA mitocondrial na infestação por carrapatos em bovinos da Raça Guzerá infestados artificialmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a infestação de carrapatos nos bovinos Guzerás com DNA mitocondrial indicus e taurus;
- Avaliar os valores eritrocitários e leucocitários dos zebuínos, da raça Guzerá com DNA mitocondrial taurino e zebuíno após infestação artificial com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;
- Avaliar o perfil imunofenotípico de células T CD4⁺, T CD8⁺, CD335⁺, CD14⁺, CD25⁺, B CD21⁺ e linfócitos Gama-delta do sangue periférico dos zebuínos, da raça Guzerá com DNA mitocondrial taurino e zebuíno após infestação artificial com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba sob o número de processo CEEA 0014/2013.

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado durante os meses de novembro a dezembro de 2012 na Fazenda Escola da Universidade de Uberaba, situada a 30 km de Uberaba, MG, Brasil, com altitude de 742,9 m, latitude de 19° 44'S e longitude de 47° 57'W.

As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Uberaba-MG (HVU).

E as análises imunofenotípicas foram realizadas no Laboratório de Doenças de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG.

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram selecionadas, aleatoriamente, 20 fêmeas da raça Guzerá, híbridas e com 18 meses de idade. Essas novilhas foram previamente caracterizadas de acordo com o DNA mitocondrial (DNAmít) (PANETO et al., 2008). Esses autores formaram um banco de dados referentes ao DNAmít dos bovinos da raça Guzerá criados na Fazenda Escola da UNIUBE. As novilhas foram agrupadas da seguinte forma: (i) GI: DNAmít *Indicus* (DNAmítI), n=10 animais e (ii) GII: DNAmít *Taurus* (DNAmítT), n=10 animais. Todas as 20 fêmeas foram mantidas no mesmo piquete, formado com capim Tifton 85 e ficaram separadas de outros bovinos. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Antes da infestação experimental, as novilhas foram mantidas por três meses livres de parasitismo por carrapatos. Realizou-se a aplicação de Treo® (Doramectina, Pfizer, Brasil), na dose de 1 mL/ 50 Kg de peso vivo, pela via subcutânea. As fêmeas foram infestadas com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 45 dias após a última administração do carrapaticida.

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os procedimentos de infestação, colheita de sangue e contagem de carrapatos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Desenho experimental, com detalhamento dos momentos de infestação com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, colheitas de sangue e contagens de carrapatos, dos dois grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial *Indicus* (DNAmiT) ou DNA mitocondrial *Taurus* (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Grupos de novilhas Guzerá	Momentos Experimentais				
	D ^{0*}	D ⁺¹	D ⁺⁹	D ⁺¹⁶	D ⁺²¹
GI (DNAmiT) n=10	Infestação: 20.000 larvas de <i>R. microplus</i>	Colheita de sangue	Colheita de sangue	Contagem de carrapatos	Colheita de sangue e contagem de carrapatos
GII (DNAmiT) n=10	Infestação: 20.000 larvas de <i>R. microplus</i>	Colheita de sangue	Colheita de sangue	Contagem de carrapatos	Colheita de sangue e contagem de carrapatos

*Anterior ao dia 0 (D0), foram realizadas contagens periódicas de carrapatos para garantir ausência de infestação a campo. Uma colheita de sangue para análises hematológicas e imunofenotipagem foi realizada em D0, antes da infestação experimental com as larvas de carrapato.

4.5 INFESTAÇÃO EXPERIMENTAL

Para a infestação experimental foram utilizadas larvas de *R. (B.) microplus* gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira (EMBRAPA Sudeste, São Carlos, SP, Brasil). Estes estádios evolutivos do carrapato estavam livres de hemoparasitas (*Babesia* spp. e *Anaplasma* spp.). O transporte das larvas até a fazenda experimental foi realizado em caixa isotérmica.

Na fazenda escola, a contenção das novilhas foi realizada em brete hidráulico, mantendo-as imóveis durante o procedimento de infestação. Foi depositado, em cada fêmea de GI e GII, 1g de larvas de *R.(B.) microplus*, correspondente a aproximadamente 20.000 indivíduos. A região escolhida foi a da linha média dorsal entre o pescoço e a cernelha do bovino (Figura 2). Em seguida, as novilhas permaneceram imobilizadas por mais 30 minutos para assegurar uma melhor fixação das larvas.



Figura 2 – Linha média dorsal na região de cernelha em uma fêmea bovina da raça Guzerá, após infestação experimental com 20.000 larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (círculo), realizada na Fazenda Escola, UNIUBE, MG, Brasil.

4.6 CONTAGEM DE CARRAPATOS

Para a realização das contagens de carrapatos, as fêmeas foram contidas em brete hidráulico. As contagens foram sempre realizadas no antúmero esquerdo do animal, sendo o valor obtido multiplicado por dois, método preconizado por VILLARES (1941). A visualização e contagem dos carrapatos foram realizadas no dia D^{+16} e D^{+21} quando os parasitos já se encontravam no estágio de paternóginas e teleóginas, respectivamente.

4.7 COLETA DE SANGUE

Para a colheita de sangue, as fêmeas bovinas foram previamente contidas em brete hidráulico. Padronizou-se a colheita no período da manhã. As amostras de sangue, obtidas da veia Jugular, foram colhidas em tubos à vácuo, contendo ácido etileno-diamino-tetracético (Sistema Vacuum2 EDTA (k3) líquido). Para a realização de hemograma, as amostras foram conservadas em uma caixa isotérmica, com gelo reciclável, e enviadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil. As amostras destinadas a análise imunofenotípica foram conservadas em uma caixa isotérmica, sem gelo, e enviadas ao laboratório do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo-Horizonte, MG, Brasil.

4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO

A contagem de hemácias, leucócitos totais, plaquetas, determinação de hematócrito e da concentração de hemoglobina foram obtidas em analisador hematológico automático veterinário (ABC Vet, ABX Diagnostics, Montpellier, France). Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram obtidos através das seguintes fórmulas:

$$(i) \text{ VCM} = (\text{Hematócrito} / \text{Hemácias}) \times 10;$$

$$(ii) \text{ CHCM} = (\text{Hemoglobina} / \text{Hematócrito}) \times 100;$$

A contagem leucocitária diferencial foi realizada utilizando esfregaço de sangue corado pelo kit Panótico Rápido (Laborclin, Brasil). Foram contados 100 leucócitos/lâmina, utilizando aumento de 1000x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E200). A porcentagem de cada leucócito, na contagem diferencial, foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$(i) \text{ Contagem leucocitária específica} / \text{Contagem leucocitária total} (100) \times 100$$

4.9 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS

Os ensaios de citometria de fluxo para a imunofenotipagem dos linfócitos periféricos foram realizados conforme Bittar et al. (2004). Foram utilizados anticorpos monoclonais (AcMo) contra receptores presentes na superfície das células do sangue bovino (Serotec®) (Tabela 2). Para cada animal, foram separados sete tubos em poliestireno de 5ml (BD Falcon™) assim identificados: (i) tubo branco (sem AcMo); (ii) CD14; (iii) CD4; (iv) CD8; (v) CD21-CD335; (vi) CD25 e (vii) WC1. Os AcMo anti-CD21 e anti-CD335 foram incubados com as células do mesmo devido à marcação com o fluorocromo ser distinta (CD21: isotiocianato de fluoresceína e CD335: ficoeritrina) (Tabela 2).

Tabela 2. Pannel de anticorpos monoclonais (Serotec®) utilizado para reconhecimento de marcadores celulares na superfície de leucócitos do sangue periférico de bovinos da raça Guzerá com diferente tipos de DNAmít.

Anticorpo	Código ³	Clone ^a	Diluição em PBS ^b
Anti-CD14 (FITC) ¹	MCA2678F	CC-G33	1:50
Anti-CD335 (PE) ²	MCA2365PE	AKS1	1:25
Anti-CD21 (FITC)	MCA1424F	CC21	1:50
Anti-CD4 (FITC)	MCA1653F	CC8	1:50
Anti-CD8 (FITC)	MCA837F	CC63	1:50
Anti-CD25 (FITC)	MCA2430F	IL-A111	1:50
Anti-WC1 (γδ) (FITC)	MCA838F	CC15	1:50

¹ *Fluorescein isothiocyanate* (FITC)

² *Phicoeritrin* (PE)

³ Informações adicionais sobre os anticorpos monoclonais (AcMo) podem ser acessadas utilizando seu número de código.

^a Os AcMo foram obtidos de clones dos linfócitos B provenientes de camundongos imunizados com as proteínas dos receptores de interesse.

^b Os AcMo foram previamente diluídos, em solução tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,5), para obtenção das concentrações ótimas para utilização.

Em cada um dos setes tubos de poliestireno, foram dispensados 50 µL de sangue total e 10 µL do AcMo previamente diluído com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaH₂PO₄ 40mM e NaCl 150mM pH 7,5). Em seguida a mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e em repouso. Após a incubação foi realizada a lise dos eritrócitos,

para isso foram utilizados 3 mL do tampão de lise (2,85% de citrato de sódio; 30% de dietilenoglicol; 54% de formaldeído P.A.; 0,04% de heparina 100.000 USP – pH 7,85) diluído em água destilada na proporção 1:10. Após homogeneização em vortex (Evlab[®] Ev019) a suspensão de células for centrifugada a 1.400 x g, por sete minutos à temperatura ambiente (Fanem Baby[®] I 206 BL), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em três mL de PBS. O ciclo de homogeneização em vortex seguido de centrifugação foi realizado mais duas vezes. Na sequência, os leucócitos obtidos foram fixados pela adição de 200µL de formaldeído 4%. A suspensão de células fixadas foi mantida a 4° C, abrigada da luz até o momento da leitura. O tempo para a coleta dos dados não excedeu p período de 24h.

A avaliação fenotípica dos leucócitos totais do sangue bovino foi realizada em aparato para citometria de fluxo citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickson[®]). Para cada suspensão de células com seu respectivo AcMo, foram adquiridos 200.000 eventos. Os dados coletados foram registrados e salvos no *software* CellQuest[®] versão para Macintosh. A análise dos dados adquiridos foi realizada pelo *software* FlowJo[®].

Inicialmente as populações de leucócitos do sangue foram separadas de acordo com a dispersão da luz frontal (*Forward Scatter: FSC*) e da luz lateral (*Side Scatter: SSC*) (Figura 3).

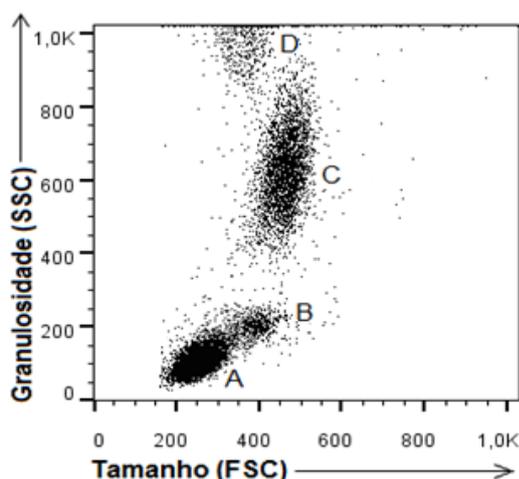


Figura 3. População de leucócitos de sangue periférico de fêmea da raça Guzerá. As populações estão selecionadas (A) Linfócitos; (B) Monócitos; (C) Neutrófilos; (D) Basófilos e eosinófilos.

A população de linfócitos foi selecionada pelo *dot plot* FSC versus SSC (Figura 4A), e a população de monócitos pelo *dot plot* SSC versus FL1 (CD14) (Figura 4B).

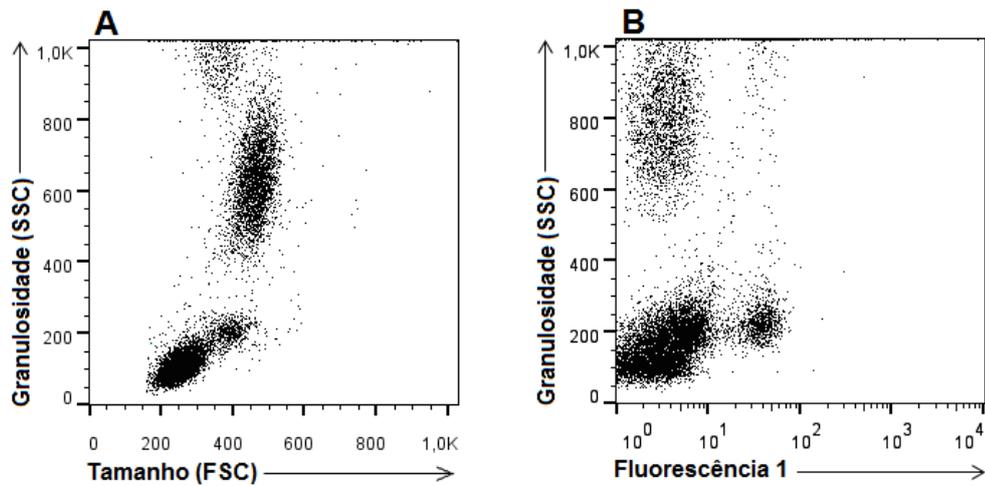


Figura 4. Representação gráfica da população leucocitária de sangue periférico em fêmea da raça Guzerá, sendo linfócitos (A) baseada no tamanho versus granulosidade e monócitos (B) baseada na granulosidade versus fluorescência (FL1).

As frequências de subpopulações celulares de linfócitos T foram analisadas nas modalidades FL1, dentro da população selecionada (Figura 5). Já as populações de linfócitos B ($CD21^+$) e linfócitos NK ($CD335^+$) foram analisadas na modalidade FL1 e FL2 (Figura 6).

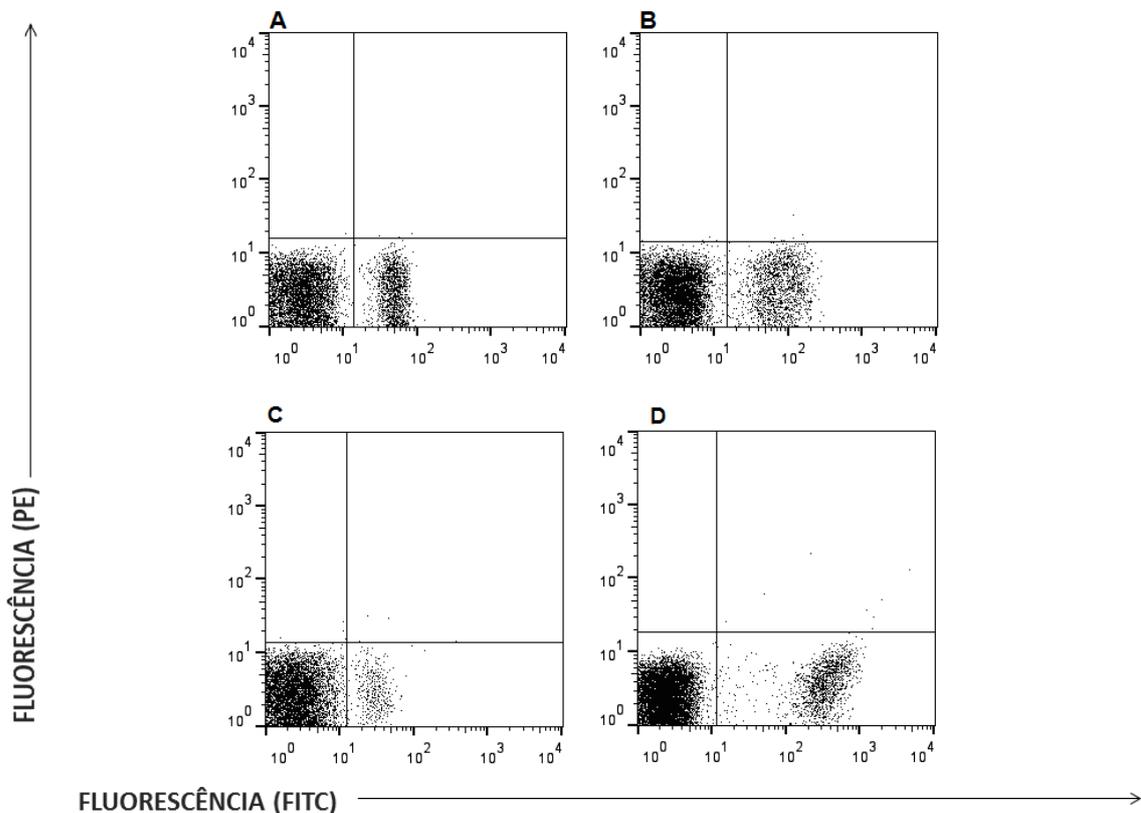


Figura 5. Representação gráfica da população de linfócitos de sangue periférico de novilhas da raça Guzerá marcados com o anticorpo monoclonal anti $CD4^+$ FITC (A); $CD8^+$ FITC (B); $CD25^+$ FITC (C) e $WC1^+$ FITC (D).

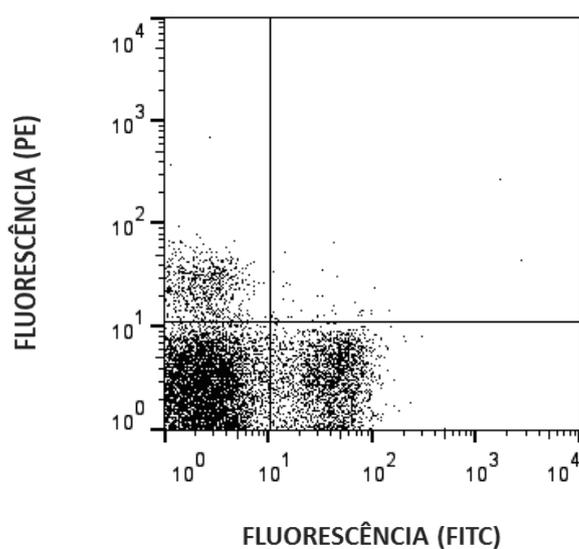


Figura 6. Representação gráfica da população de linfócitos B e linfócitos NK do sangue periférico de novilhas da raça Guzerá marcados com o anticorpo monoclonal anti CD21⁺ (FITC) e anti CD335⁺ (PE).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas das variações de cada grupo durante o período experimental foram utilizados teste ANOVA one-way seguido do teste de Tukey (testes paramétricos) e teste de Friedmann seguido do teste de Dunns (testes não paramétricos).

Para comparações entre os grupos durante o período experimental foi utilizado teste de Mann-Whitney. Para correlação dos resultados versus infestação foi utilizado teste de Pearson (teste paramétrico).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO PARASITÁRIA

Em relação a avaliação de carrapatos, nos momentos D^{+1} e D^{+9} foram observados um grande número de larvas e ninfas respectivamente, porém não foi possível a contagem em decorrência do tamanho dos carrapatos. Já nos momentos D^{+16} e D^{+21} foram realizadas as contagens de paternóginas e teleóginas respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de amplitudes máxima (Máx) e mínima (Mín), média e desvios padrão do número de carrapatos dos dois grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial *Indicus* (DNAmiT) ou DNA mitocondrial *Taurus* (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Momentos	Média±desvio padrão		Amplitude Mín a Máx	
	GI	GII	GI	GII
	DNAmiT	DNAmiT	DNAmiT	DNAmiT
D+16	67,60±37,12 ^{Aa}	89,40±84,38 ^{Aa}	30,0 a 136,0	14,0 a 280,0
D+21	7,30±15,45 ^{Ab}	11,40±16,87 ^{Ab}	0,0 a 50,0	0,0 a 50,0

Letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os momentos.

Durante o período experimental não houve diferença ($P>0,05$) do número de carrapatos entre o grupo GI (DNAmiT) e GII (DNAmiT), mas se observou redução ($P<0,05$) do número de carrapatos no momento D^{+21} nos Grupos I e II.

5.2 VALORES HEMATOLÓGICOS

Não houve diferença estatística na contagem de hemácias, entre os bovinos de GI e GII, quando observado cada um dos momentos de coleta de sangue. Dentro dos dois grupos foi verificada diferença significativa ($P<0,05$) no número de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$) de sangue: (i) GI (DNAmiT), D^{+1} ($9,11\pm 0,66$) e D^{+9} ($8,87\pm 0,55$); (ii) GII (DNAmiT), D^{+1} ($9,31\pm 0,88$) e D^{+9} ($8,97\pm 0,67$) pós-infestação. Foi verificada elevação na contagem de hemácias ($P<0,05$) no D^{+21} em comparação com D^{+9} para os animais de DNAmiT (Figura 7A).

Para as concentrações de hemoglobina, não foi verificada diferença estatística entre os dois grupos de bovinos. Coincidentemente com as contagens de hemácias, foi observada uma queda ($P<0,05$) na concentração de hemoglobina (g/dL) para GI e GII nos dias D^{+1} e D^{+9} ,

como segue: (i) GI (DNAmItI), D^{+1} ($10,2 \pm 0,75$ g/dL) e D^{+9} ($10,0 \pm 0,64$ g/dL); (ii) GII (DNAmItT), D^{+1} ($10,69 \pm 0,99$ g/dL) e D^{+9} ($10,38 \pm 0,77$ g/dL) (Figura 7B).

Não houve diferença estatística nos valores obtidos para o hematócrito dos bovinos de GI e GII. Dentro dos grupos, foi detectada uma redução no hematócrito ($P < 0,05$) dos animais tanto de DNAmItI, quanto de DNAmItT. Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmItI), D^{+1} ($31,93 \pm 2,57\%$) e D^{+9} ($30,74 \pm 2,21\%$); (ii) GII (DNAmItT), D^{+1} ($33,59 \pm 2,89\%$) e D^{+9} ($31,81 \pm 2,43\%$) (Figura 7C).

Para os valores de VCM, não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos de bovinos. Foi observado queda significativa para os animais com DNAmItI nos dias D^{+1} e D^{+9} , como segue: GI (DNAmItI), D^{+1} ($35,1 \pm 1,4$ fl) e D^{+9} ($34,7 \pm 1,4$ fl) (Figura 7D).

Não houve diferenças significativas nos valores obtidos para CHCM dos bovinos de GI e GII. Dentro do grupo GII, houve aumento ($P < 0,05$) nos valores de CHCM no dia D^{+9} ($32,7 \pm 1,4\%$) (Figura 7E).

Não foi verificada diferença estatística nos valores de proteínas plasmáticas entre os dois grupos de bovinos. Foi observada redução de proteínas plasmáticas ($P < 0,05$) nos animais tanto de DNAmItI, quanto de DNAmItT. Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmItI), D^{+21} ($7,0 \pm 0,4$ g/dL); (ii) GII (DNAmItT), D^{+1} ($7,1 \pm 0,3$ g/dL), D^{+9} ($7,1 \pm 0,3$ g/dL) e D^{+21} ($6,7 \pm 0,4$ g/dL) (Figura 7F).

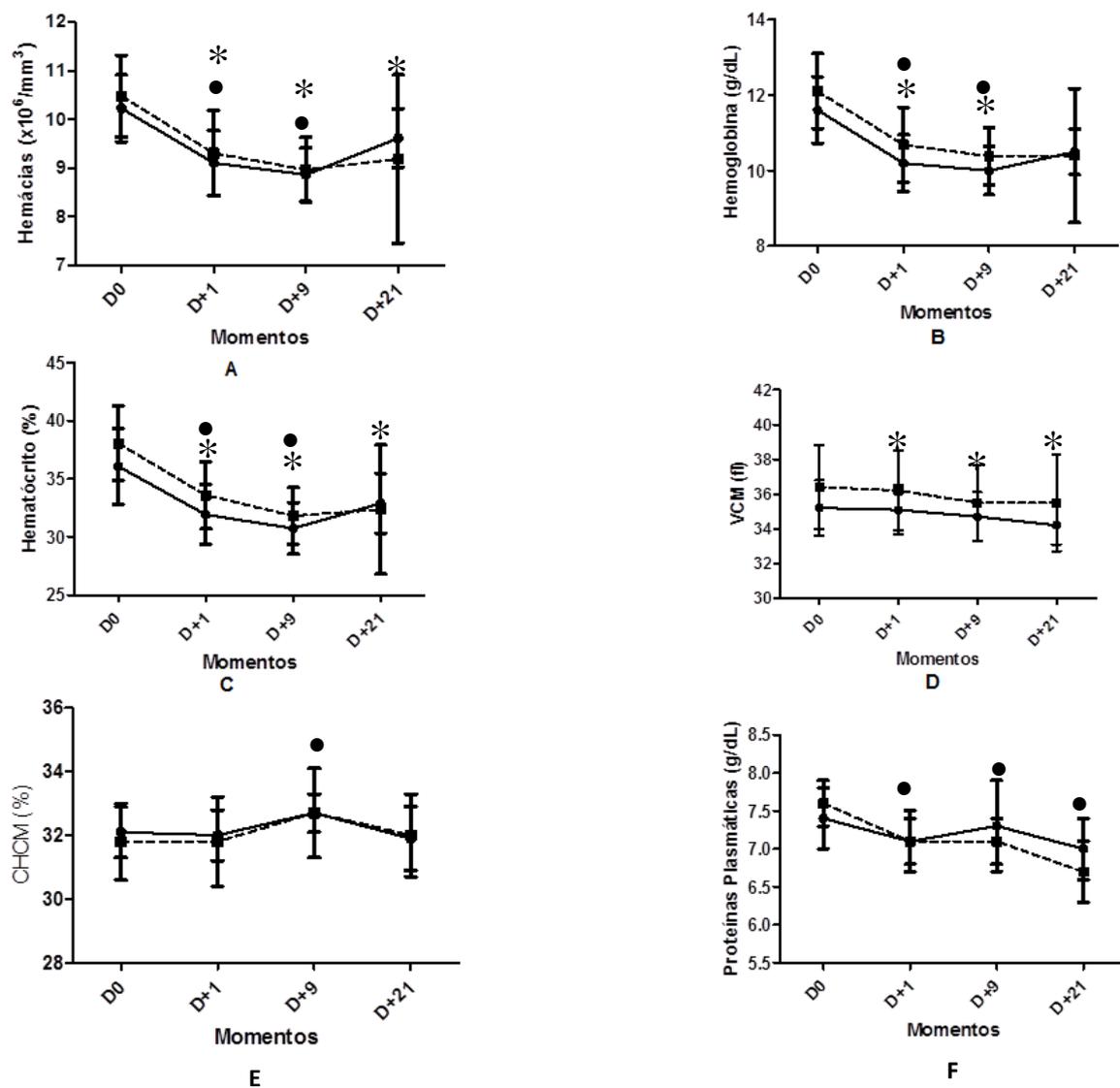


Figura 7. Médias e desvios padrão da contagem de hemácias (A), Hemoglobina (B), Hematócrito (C), VCM (D), CHCM (E) e Proteínas plasmáticas (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmIT- Linha tracejas) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Seta tracejada indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nos momentos, símbolo (*) indica diferença ($P < 0,05$) para GI em relação ao D0. Símbolo (●) indica diferença ($P < 0,05$) para GII em relação ao D0.

5.3 VALORES LEUCOCITÁRIOS

Não houve diferença estatística na contagem de leucócitos totais, entre os bovinos de GI e GII. Foi observado queda significativa para os animais com DNAmIT no dia D^{+9} , como segue: GI (DNAmIT), D^{+9} ($12580 \pm 2780/\text{mm}^3$) (Figura 8A).

Para os valores de segmentados, foi verificada diferença estatística entre os dois grupos de bovinos no dia D zero. Não houve diferenças ($P > 0,05$) dentro dos grupos em todos os momentos (Figura 8B).

Não houve diferença ($P > 0,05$) na contagem de linfócitos, entre os grupos GI e GII. Dentro dos grupos, foi detectada redução nos valores de linfócitos ($P < 0,05$) dos animais tanto de DNAmIT, quanto de DNAmIT. Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT), D^{+9} ($6575 \pm 1377,1/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT), D^{+1} ($6299,8 \pm 1846,6/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($6831,9 \pm 1403,5/\text{mm}^3$) (Figura 8C).

Para os valores de eosinófilos, foi observada diferença ($P < 0,05$) entre os grupos GI e GII no dia D^{+1} . Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT), D^{+1} ($207 \pm 246/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT), D^{+1} ($679 \pm 530/\text{mm}^3$) (Figura 8D).

Houve diferença ($P < 0,05$) nos valores de monócitos, entre os grupos GI e GII no dia D^{+9} . Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT) ($432 \pm 201/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT) ($259 \pm 143/\text{mm}^3$) (Figura 8E).

Para os valores de basófilos, não foi observado diferenças significativas entre os grupos e dentro de cada um dos grupos (Figura 8F).

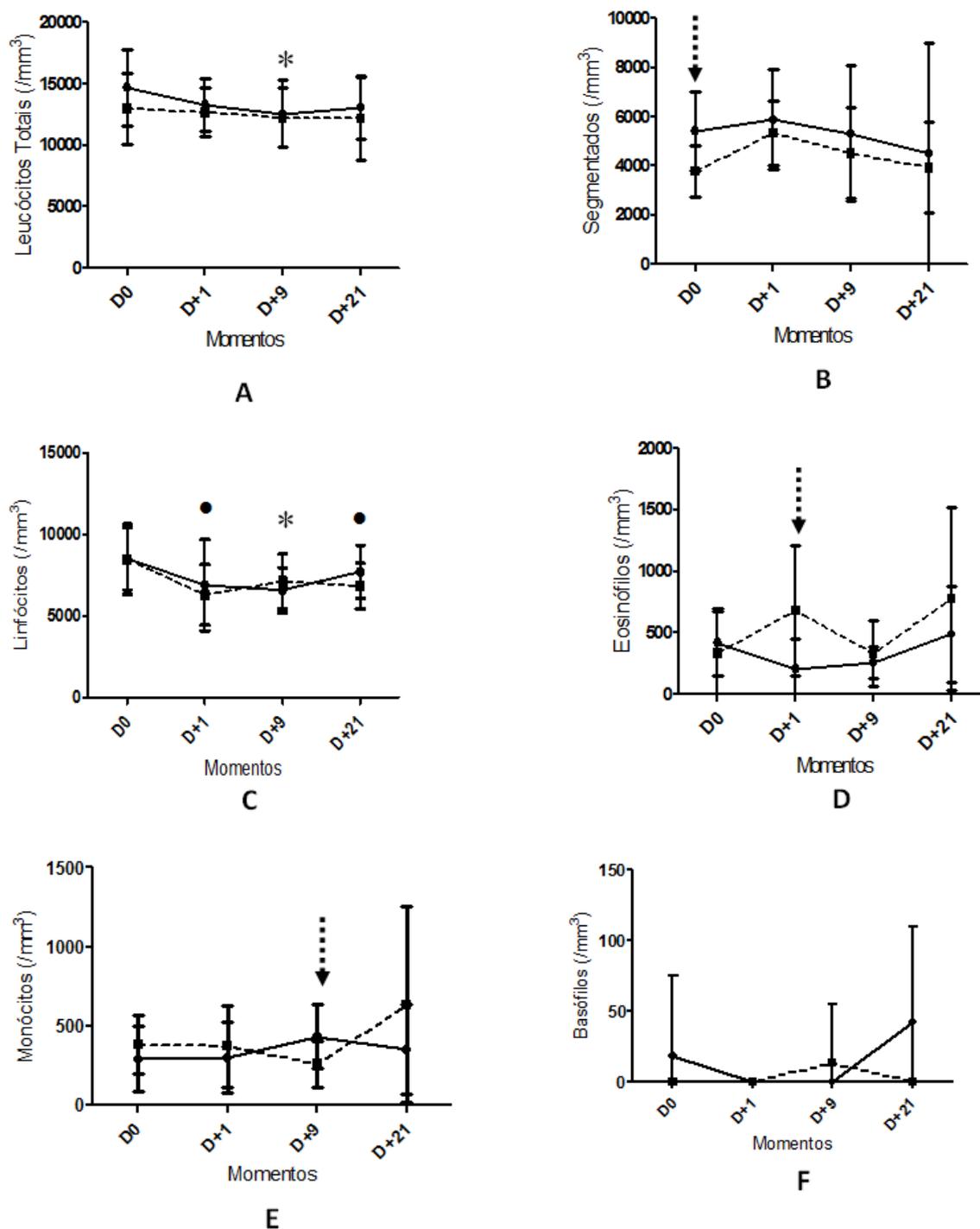


Figura 8. Médias e desvios padrão da contagem de leucócitos totais (A), Segmentados (B), Linfócitos (C), Eosinófilos (D), Monócitos (E) e Basófilos (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Seta tracejada indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nos momentos, símbolo (*) indica diferença ($P < 0,05$) para GI em relação ao D0. Símbolo (●) indica diferença ($P < 0,05$) para GII em relação ao D0.

5.4 VALORES IMUNOFENOTÍPICOS

Não houve diferença ($P>0,05$) no valor de linfócitos T totais, entre os bovinos de GI e GII. Foi detectada uma redução nos valores de linfócitos T totais ($P<0,05$) dos animais tanto de DNAmIT, quanto de DNAmIT nos dias D^{+1} e D^{+9} . Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT), D^{+1} ($3019\pm1521/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($3168\pm949/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT), D^{+1} ($2708\pm807/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($3491\pm984/\text{mm}^3$) (Figura 9A).

Para os valores de linfócitos T $CD4^+$, não foi observada diferença ($P<0,05$) entre os grupos GI e GII. Foi observado aumento significativo para o grupo GI entre os momentos D^{+1} e D^{+21} . Para o grupo GII houve redução ($P<0,05$) no momento D^{+1} e aumento em D^{+21} . Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT), D^{+1} ($1251\pm685/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($1645\pm515/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT), D^{+1} ($1129\pm332/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($1751\pm664/\text{mm}^3$) (Figura 9B).

Não houve diferenças significativas no valor de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), entre os grupos GI e GII. Para o grupo GI (DNAmIT) foi observada redução ($P<0,05$) nos dias D^{+1} ($1123\pm600/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($1089\pm312/\text{mm}^3$). No grupo GII (DNAmIT), foi detectado redução nos dias D^{+1} ($940\pm270/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($1358\pm350/\text{mm}^3$) (Figura 9C).

Não foi observada diferença ($P>0,05$) nos valores de linfócitos T $\gamma\delta^+$ entre os bovinos dos grupos GI e GII. Foi detectada uma redução nos valores de linfócitos T $\gamma\delta^+$ ($P<0,05$) dos animais tanto de DNAmIT, quanto de DNAmIT nos dias D^{+1} e D^{+9} . Os valores encontrados foram: (i) GI (DNAmIT), D^{+1} ($488\pm308/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($486\pm249/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT), D^{+1} ($488\pm308/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($514\pm343/\text{mm}^3$) (Figura 9D).

Para os valores de linfócitos T $CD25^+$, não houve diferença significativa entre os grupos de bovinos com DNAmIT e DNAmIT. Foi observado aumento ($P<0,05$) entre os dias D^{+1} ($151\pm34/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($270\pm79/\text{mm}^3$) nos animais do grupo GII (Figura 9E).

Não houve diferença ($P>0,05$) na relação $CD4^+/CD8^+$ entre os dois grupos de bovinos GI e GII. Foi detectado aumento ($P<0,05$) no dia D^{+9} ($1,27\pm0,47/\text{mm}^3$) no grupo com DNAmIT (GI) e aumento no dia D^{+21} ($1,30\pm0,37/\text{mm}^3$) no grupo com DNAmIT (GII) (Figura 9F).

Para os valores de linfócitos B $CD21^+$ não houve diferenças significativas entre os grupos GI e GII. Foi observada redução ($P<0,05$) no grupo GII nos dias D^{+9} ($1591\pm525/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($1449\pm498/\text{mm}^3$) (Figura 10A).

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na relação linfócitos T/B entre os bovinos dos grupos I e II. Houve redução ($P<0,05$) dentro de cada um dos grupos GI e GII no dia D^{+1} . Os

valores foram: (i) GI (DNAmIT) ($1,88 \pm 0,72/\text{mm}^3$); (ii) GII (DNAmIT) ($1,84 \pm 0,65/\text{mm}^3$). Foi observado também aumento ($P < 0,05$) no dia D^{+21} ($3,11 \pm 0,74/\text{mm}^3$) para o grupo de bovinos com DNAmIT (Figura 10B).

Foi observada diferença significativa para linfócitos NK $CD335^+$ entre os grupos GI e GII no dia D^{+21} (Figura 9C). Ocorreu redução ($P < 0,05$) dentro de cada um dos grupos. Os valores encontrados foram: (i) (GI) DNAmIT, apresentou redução nos dias D^{+1} ($274 \pm 113/\text{mm}^3$) e D^{+9} ($318 \pm 154/\text{mm}^3$); (ii) (GII) DNAmIT, foi observado redução ($P < 0,05$) nos dias D^{+1} ($199 \pm 85/\text{mm}^3$) e D^{+21} ($350 \pm 137/\text{mm}^3$) (Figura 10C).

Não houve diferenças para os valores de monócitos $CD14^+$, entre os bovinos com DNAmIT (GI) e DNAmIT (GII). Houve aumento ($P < 0,05$) para os bovinos do grupo GII no dia D^{+21} ($31 \pm 30/\text{mm}^3$) (Figura 10D).

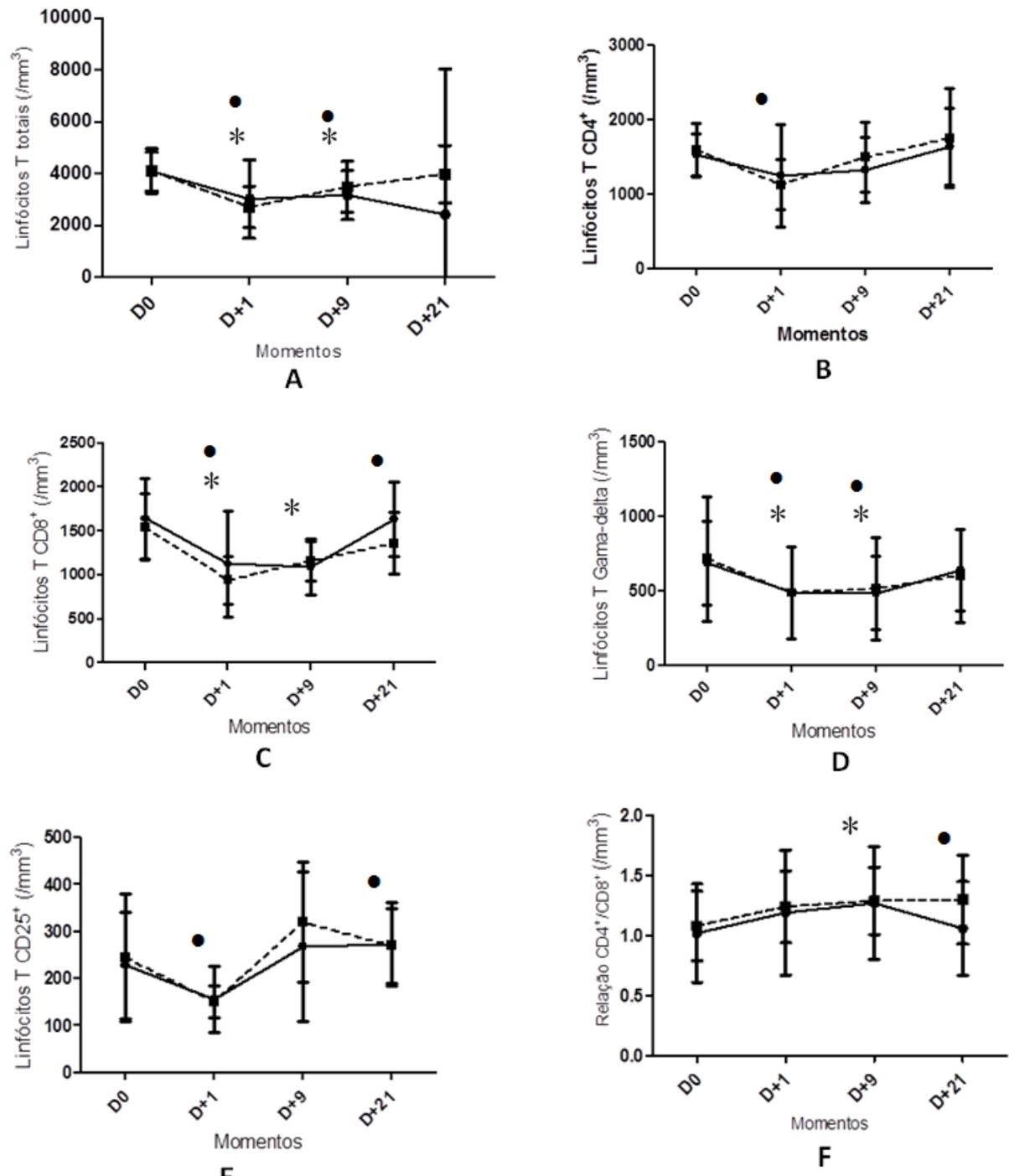


Figura 9. Médias e desvios padrão dos valores de linfócitos T totais (A), linfócitos T CD4⁺ (B), linfócitos T CD8⁺ (C), linfócitos T Gama-delta (D), linfócitos T CD25⁺ (E) e relação entre CD4⁺/CD8⁺ (F) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT+ Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Seta tracejada indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nos momentos, símbolo (*) indica diferença ($P < 0,05$) para GI em relação ao D0. Símbolo (●) indica diferença ($P < 0,05$) para GII em relação ao D0.

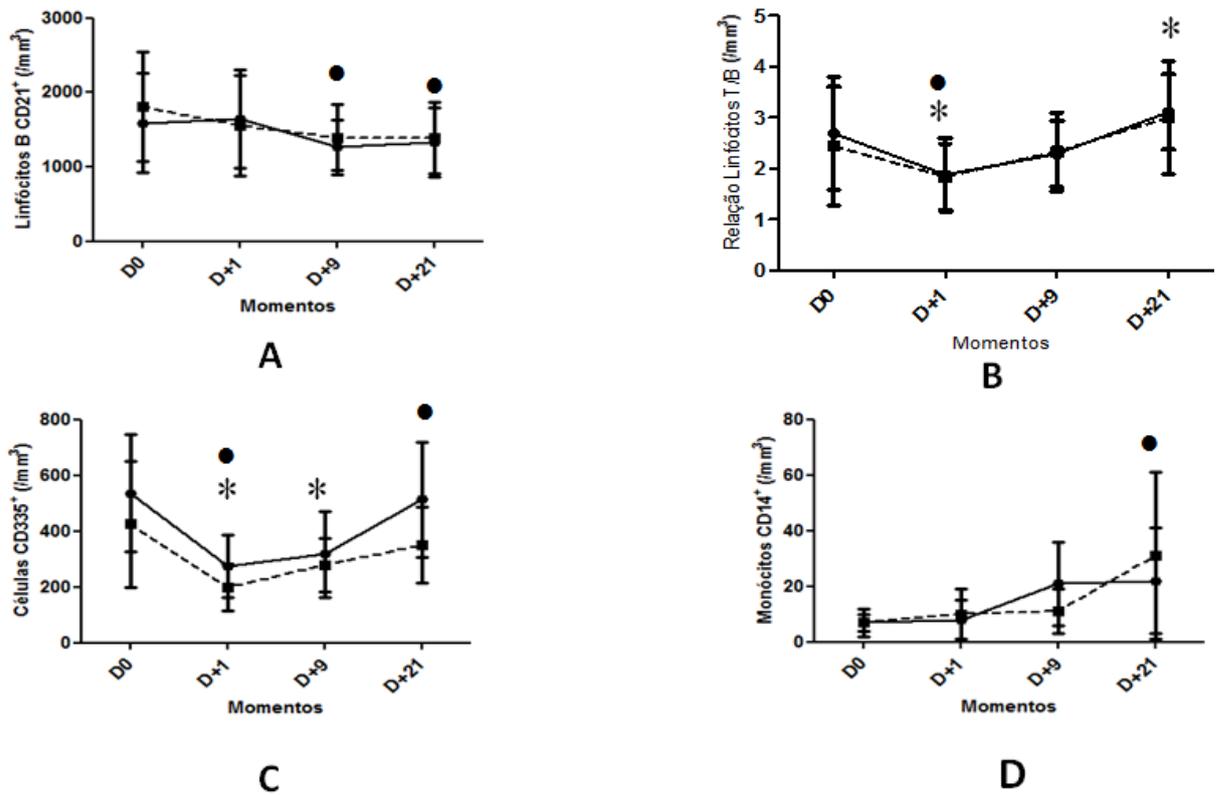


Figura 10. Médias e desvios padrão dos valores de linfócitos B CD21⁺ (A), relação LT/LB (B), linfócitos NK CD335⁺ (C), monócitos CD14⁺(D) dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmiT- Linha contínua) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT- Linha tracejada) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Seta tracejada indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nos momentos, símbolo (*) indica diferença ($P < 0,05$) para GI em relação ao D0. Símbolo (●) indica diferença ($P < 0,05$) para GII em relação ao D0.

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que os bovinos indianos (*Bos indicus*) são mais resistentes ao carrapato quando comparado aos europeus (*Bos taurus*). Ao realizar o cruzamento de animais taurinos com zebuínos busca-se a complementaridade de características desejáveis de ambas as raças. Entre as características zebuínas que poderão ser aproveitadas, pode-se citar a adaptação ao clima tropical, habilidade materna e resistência aos parasitas. Neste estudo observou-se que não houve influência do DNA mitocondrial em relação à infestação por carrapatos. Sendo que estes resultados corroboram com Paneto et al. (2008), no qual ao analisar vacas Guzerás com DNA mitocondrial taurino e indicus, observou que não houve influência do DNA mitocondrial com características produtivas e reprodutivas como produção total de leite na lactação, duração da lactação, idade ao primeiro parto e intervalo de partos.

Como observado neste trabalho o número de carrapatos no momento D+21 foi de 7,30 para os animais com DNAmít indicus e 11,4 para os animais com DNAmít taurus, sendo que estes resultados corroboram com Ibelli et al., 2012 onde os animais das raças Nelore, ½ Nelore x ½ Senepol e ½ Nelore x ½ Angus apresentaram valores de $8,52 \pm 7,26$; $18,81 \pm 7,26$ e $75,34 \pm 8,33$ carrapatos respectivamente. Segundo Jonsson (2006) verificou menores quantidades de carrapatos em animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) quando comparado com as raças puras de *Bos taurus*. Silva et al. (2007) expuseram fêmeas bovinas a quatro infestações artificiais, atribuindo a menor suscetibilidade a novilhas Nelore, resistência intermediária a fêmeas Canchim x Nelore, e maior carga parasitária nos produtos do cruzamento entre Angus x Nelore e Simental x Nelore. Segundo Ayres et al. (2009) analisaram dados de contagens de carrapatos em bovinos Braford pertencentes a um programa de melhoramento e verificaram que o número de carrapatos diminuía à medida que a proporção de genes *B. indicus* aumentava.

Os parâmetros hematológicos são importantes ferramentas para avaliar tanto o estado de saúde do animal como o grau de estresse ao qual ele está sendo submetido (ROBERTO et al., 2010). Diversos estudos propõem o acompanhamento de parâmetros hematológicos para monitorar a saúde e estresse do rebanho leiteiro e relatam a associação destes com diferentes patologias (CAMPOS, 2008). Vários fatores podem influenciar o quadro hematológico dos animais domésticos, como: sexo, idade, condições ambientais, climáticas e de manejo (HOLMANN, 1955 apud BIRGEL JÚNIOR et al., 2001). Nos momentos D+1 e D+9, houve queda nos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito para ambos os grupos, porém

apesar da redução de hemácias, os valores sempre foram superiores aos encontrados por Alves Júnior et al. (2009), onde os valores médios de hemácias para animais da raça Guzerá foram de $7,88 \pm 0,39 \times 10^6/\text{mm}^3$. A redução nos valores de hemácias de ambos os grupos nos momentos D^{+1} e D^{+9} está relacionado respectivamente com a infestação por larvas e ninfas nas fêmeas bovinas da raça Guzerá.

Os valores de hemácias observados neste trabalho corrobora com trabalho realizado por Piper et al. (2008), onde após infestação artificial, os animais da raça Brahman apresentaram valores de hemácias de $9,25 \pm 0,62 \times 10^6/\text{mm}^3$.

Mesmo com a alta infestação de carrapatos e a redução nos valores de hemácias para ambos os grupos nos dias D^{+1} e D^{+9} , os valores de hemácias foram superiores aos encontrados por Alves Júnior et al. (2009) para fêmeas Guzerás. Os valores de hemácias apresentados pelos animais infestados deste experimento podem estar relacionados a uma característica adaptativa de zebuínos, pois segundo Alves Júnior et al. (2009) bovinos das raças Guzerá e Nelore por apresentarem maior quantidade de hemácias, maior concentração de hemoglobina e maior percentual do volume globular, parecem possuir melhor capacidade de adaptação ao clima tropical. Isso acontece pela facilidade de oxigenação do corpo, através das trocas gasosas, que favorece a liberação de calor pelo animal e conseqüentemente a diminuição do estresse térmico (DOMINGUES, 1974).

Neste experimento houve queda nos valores de VCM para os animais com DNAmitticus, porém no momento controle (D0) os valores de VCM para o grupo foi de 35,2fl, já demonstrando valor reduzido quando comparado ao trabalho de Alves Júnior et al. (2009), pois segundo o autor os valores médios de VCM para animais da raça Guzerá são de $50,0 \pm 2,68\text{fl}$. No momento D+21 o valor de VCM para o grupo GI foi de 34,2 fl. O menor tamanho de hemácias em animais da raça Guzerá pode ser considerado como característica adaptativa, pois apesar do menor tamanho, estes animais apresentam 30% a mais de hemácias quando comparados aos taurinos.

Como observado, os valores de proteínas plasmáticas sofreram redução no grupo GII em todos os momentos do experimento, podendo ser considerado como reflexo do consumo de sangue pelos carrapatos. Uma vez que cada fêmea de carrapato pode ser capaz de chegar ao consumo de 0,5 a 1,0 ml de sangue até o ingurgitamento.

Tem-se observado que as contagens de glóbulos brancos podem ser maiores nos bezerros e animais de 6 meses a 3 anos de idade, porém neste experimento os valores de leucócitos observados são reflexo de um processo inflamatório em resposta a infestação por carrapatos.

Os valores de leucócitos totais neste experimento foi superior aos valores encontrados por Piper et al. (2009). Segundo o autor os valores de leucócitos totais para animais da raça Brahman e Holandês foram respectivamente de $13270 \pm 2260/\text{mm}^3$ e $10840 \pm 2160/\text{mm}^3$. No momento D+9 os animais do grupo GI apresentaram queda nos valores de leucócitos totais, sendo reflexo da queda de linfócitos neste mesmo momento. Segundo Inokuma, et al., (1994) a infestação por carrapatos geralmente levam a diminuição de linfócitos circulante. Neste experimento a queda de células leucocitárias circulantes não deve necessariamente ser encarada como ponto negativo e até mesmo prejudicial, já que esta redução pode estar relacionada com migração de células para a pele em resposta à infestação.

Em relação aos valores de eosinófilos circulantes, no momento D+1 os animais com DNAmít indicus apresentaram menor número de eosinófilos quando comparado aos animais com DNAmít taurus, o menor valor de eosinófilos nos animais com DNAmít indicus pode indicar possível migração eosinofílica para a pele e melhor capacidade de resposta ao carrapato. Pois segundo Carvalho et. (2010a) os bovinos geneticamente resistentes apresentam mais eosinófilos e basófilos na pele, quando comparado aos animais susceptíveis. Taurinos raramente alcançam os níveis de resistência obtidos pelas raças indianas e isso pode ser explicado pela hipersensibilidade e resposta inflamatória apresentada pelos animais zebuínos (PIPER et al., 2008). Isto pode ser comprovado através de estudos realizados com amostras de pele. Pois segundo Carvalho et al., (2010a) ao analisar pele normal com a pele infestada observou-se que a depleção de eosinófilos na lesão de animais susceptíveis é significativa, mas isso não ocorre em animais resistentes.

Como se observou, no momento D+9 ocorre redução nos valores de monócitos no grupo GII, indicando que neste momento possivelmente ocorreu maior migração destas células para pele e conseqüentemente redução no sangue.

Para os animais com DNAmít indicus ocorreu redução de eosinófilos no sangue no momento D+1, enquanto que nos animais com DNAmít taurus ocorreu redução de monócitos somente no momento D+9. Indicando assim, que a resposta de bovinos com DNAmít indicus por eosinófilos foi mais rápida quando comparada as respostas de bovinos com DNAmít taurus. Estes resultados corroboram com Piper et al., (2009) no qual os animais taurinos apresentam melhor resposta de macrófagos, quando comparado a animais zebuínos. Porém neste experimento pode ser observado que esta resposta por macrófagos é tardia, já que na imunofenotipagem do sangue periférico do grupo com DNAmít taurus somente houve aumento no valor de CD14^+ no momento D+21.

As diferenças entre bovinos zebuínos e europeus em termos de resistência a doenças já tem sido relado (MACÊDO, 2012). Porém não se sabe qual a resposta de animais zebuínos com diferentes DNA mitocondriais no perfil imunofenotípico após infestação artificial com larvas de carrapatos.

Pode-se analisar que os valores de linfócitos T totais em ambos os grupos reduziu um dia após a infestação. Esta redução ocorreu em reflexo aos menores valores de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta^+$ neste mesmo momento. Os valores de linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺ observados neste experimento foram inferiores aos resultados encontrados por Macêdo et al. (2013). Já os valores de linfócitos T CD8⁺ neste experimento foram semelhantes aos encontrados pelo autor. A redução nos valores de linfócitos pode estar relacionada com resposta tecidual, já que segundo Constantinoiu et al., (2010) o número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi significativamente maior ($P < 0,05$) na pele de *Bos taurus indicus*. Porém sabe-se também que a redução nos valores de linfócitos T pode estar relacionada com imunossupressão. Já que a saliva do carrapato apresenta diferentes fatores responsáveis por redução de células T (ANGUITA et al, 2002).

A redução nos valores de linfócitos T $\gamma\delta^+$ imediatamente após a infestação com larvas demonstra que são células que podem representar uma resposta eficiente no combate aos carrapatos. Além disso, as células T $\gamma\delta^+$ compreendem mais do que 70 % de linfócitos circulantes em bezerros recém-nascidos e são um importante subconjunto de linfócitos em ruminantes adultos (GUZMAN et al., 2012).

Quanto a resposta de linfócitos B CD21⁺, não houve redução nos animais com DNAmít indicus, a manutenção dos valores de células B podem estar ligadas a alteração do padrão de citocinas após o início da infestação, já que a PGE₂ presente na saliva de *R. (B.) microplus* (DICKINSON et al, 1976), é capaz de aumentar a produção de citocinas do padrão Th2 e diminuir as de padrão Th1 (HARRIS et al., 2002). Sendo que ao reduzir o padrão Th1 e aumentar o padrão Th2 ocorrerá redução nos valores de linfócitos T e manutenção dos valores linfócitos B CD21⁺. Possivelmente os linfócitos B podem ser eficientes na reposta contra os carrapatos, já que a produção de anticorpos pode ser capaz de levar a destruição de estruturas importantes do intestino do carrapato. Porém segundo Constantinoiu et al. (2010) os valores de linfócitos B foi extremamente baixo em pele de animais zebuínos e taurinos infestados artificialmente.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições que se realizou o presente estudo podemos concluir que:

-Novilhas da raça Guzerá não apresentam influências do DNA mitocondrial na infestação por carrapatos;

-Novilhas da raça Guzerá com alta infestação por carrapatos, apresentam queda de hemácias, hemoglobina e hematócrito independente do DNA mitocondrial;

-Novilhas da raça Guzerá apresentam baixo valor de VCM, indicando assim, menor tamanho de hemácias;

-Novilhas da raça Guzerá com DNA mitocondrial indicus apresentam possivelmente resposta de eosinófilos 1 (um) dia após a infestações por larvas;

-Os linfócitos T CD4⁺, T $\gamma\delta$ ⁺ e linfócitos B CD21⁺ são células que possivelmente são importantes na resposta a altas infestações por carrapatos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and Molecular Immunology, 4.ed. Philadelphia: W. B. SAUNDERS COMPANY, 2000. p.235-339.

ABIEC. 2013a. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=811#.UOd5BW_Xbs->. Acesso em: 21 mar. 2014.

ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **International Journal for Parasitology**, vol.3, p.195–200. 1973.

ALLEN, J. R.; HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v.280, p.491–493. 1979.

ALVES JÚNIOR, J.R.F. et al. Perfil eritrocitário de bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*, Linnaeus, 1758) das raças Gir, Nelore e Guzerá de Uberaba-MG. **PUBVET, Londrina**, v. 3, n. 22, 2009.

ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. 1. ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010.

ANGUITA, J.; RAMAMOORTHY, N.; HOVIUS, J. W. R.; DAS, S.; THOMAS, V.; PERSINSKI, R.; CONZE, D.; ASKENASE, P. W.; RINCON, M.; KANTOR, F. S.; FIKRIG, E. Salp15, and Ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. **Immunity**, v. 16,p. 849–859. 2002.

AYRES, D.R.; BALDI, F.; DIAZ, I.D.P.S.; ALBUQUERQUE, L.G.; ROSO, V.M. Estimativas de parâmetros genéticos para números de carrapatos (*Boophilus microplus*) em bovinos da raça Braford, utilizando o método da máxima verossimilhança restrita e inferência Bayesiana. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 46., 2009, Maringá, PR. Anais... Maringá. CD-ROM.

BENEDICT, C.; KUWAHARA, K.; TODD, G.; RYAN, J.; MICHALAK, M.; EATON, D.; STERN, D. Calreticulin is a novel antithrombotic agent: blockage of electrically induced coronary thrombosis. **Clinical Research**,v. 41,p. 275A. 1993.

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

BIASE, F.H. Mitochondrial DNA single nucleotide polymorphism associated with weight estimated breeding values in Nelore cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.4, 2007.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 164-171,2001.

BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.107-110. 2004.

BRADFORD, H. E.; ADAIR, B. M.; FOSTER, J. C. Antibody-dependent killing of virus-infected targets by NK-like cells in bovine blood. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health**.v 48, p. 637-640. 2001.

BROSSARD, M.; GIRARDIN, P. Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: Humoral factors influence feeding and egg laying. **Experientia** 35, 1395–1396. 1979.

BROSSARD, M.; FIVAZ, V. *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. **Parasitology**,v. 85,p. 583–592. 1982.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**,v.129, Suppl: S161-76. 2004.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p.270–276. 1997.

BROWN, W. C.; LOGAN, K. S.; ZHAO, S.; GRAB, D. J. Identification of candidate vaccine antigens of bovine hemoparasites *Theileria parva* and *Babesia bovis* by use of helper T cell clones. **Vet. Parasitol.** v.57,p.189-203. 1995.

CAMPOS, R.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. R.; GONZÁLEZ, F. H. D.; Parâmetros hematológicos e níveis de cortisol plasmático em vacas leiteiras de alta produção no Sul do Brasil, **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science.**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 354-361, 2008.

CARDOSO, V.; ALBUQUERQUE, L. G. DE.; FRIES, L. A. Estimativas de herdabilidade da resistência ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 36, 1999, Porto Alegre, R.S., **Anais...**, SBZ: Porto Alegre, 1999. CD ROM.

CARVALHO, W. A.; FRANZIN, A. M.; ABATEPAULO, A. R.; DE OLIVEIRA, C. J.; MORE, D. D.; DA SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA, SANTOS, I. K: Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. **Vet Parasitol**, v.167:p.260-273, 2010.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER, T.T.S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) using in vitro larval bioassays. **Vet. Parasitol**, v. 173, p.300–306. 2010.

CHANIE, M.; NEGASH, T.; SIRAK, A. Ectoparasites are the major causes of various types of skin lesions in small ruminants in Ethiopia. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 42, p.1103–1109. 2010.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEW-TABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 865–875. 2010.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; OVERVIEW, S. D. E. Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Front Biosci**, v.;13,p. 38–46. 2008.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Cancer**,v. 6,p. 24-37.2006.

DICKINSON, R. G.; O'HAGAN, J. E.; SHOTZ, M.; BINNINGTON, K. C.; HEGARTY, M. P. Prostaglandin in saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences**, v. 54,p 475–486.1976.

DOMINGUES, O. O Zebu, sua reprodução e multiplicação dirigida. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1974.

DONALD, A. Parasites, animal production and sustainable development. **Veterinary Parasitology**, v. 54,p. 27–47. 1994.

DOUBE, B. M.; WHARTON, R. H. The effect of locality, breed and previous tick experience on seasonal changes in the resistance of cattle to *Boophilus microplus* (Ixodoidea, Ixodidae). **Experientia**, v.36, p.1178–1179. 1980.

EGITO, A. A. Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no brasil com base em microssatélites e haplótipos de dna mitocondrial: subsídios para a conservação. 232 f. **Tese** (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FEARON, D. T. The complement system and adaptive immunity. **Seminars in Immunology**, v. 10, p.355–361. 1998.

FILHO, V. A. E. Caracterização de um rebanho gir leiteiro quanto à origem do dna Mitocondrial (mtDNA). Nova Odessa: **B. Indústr.anim.**, 2010.

FONTAINE, A.; DIOUF, I.; BAKKALI, N.; MISSE, D.; PAGES, F.; FUSAI, T.; ROGIER, C.; ALMERAS, L. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in hostvector interactions. **Parasit Vectors**, v.4, p.187.2011.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.57–71.1999.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG**, v.8, p. 49-61.1993.

- GILES, R. E. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p.6715- 6719. 1980.
- GILLESPIE, R. D.; DOLAN, M. C.; PIESMAN, J.; TITUS, R. G. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Immunology**, v. 166, p.4319–4327. 2001.
- GONZALES, J. C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: **Mestre Jou**, 101p. 1974.
- GONZALES, J. C. O controle dos carrapatos dos bovinos. Porto Alegre: Sulina, 104p., 1975.
- GRAF, J. F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G. A.; MOLENTO, M. B.; BORDIN, E. L. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v.129,p:427–42. 2004.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.** v.21,p. 8–10. 2002.
- GUEDES JUNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.
- GUZMAN, E.; PRICE, S.; POULSOM, H.; HOPE, J. Bovine gammadelta T cells: cells with multiple functions and importante roles in immunity. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.148: p.161-167. 2012.
- HAJNICKA, V.; KOCA KOVA, P.; SLA VIKOVA, M.; SLOVAK, M.; GASPERIK, J.; FUCHSBERGER, N.; NUTTALL, P. A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunology**, v.23, p.483–489. 2001.
- HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**,v. 23,p. 144–150.2002.
- HEDGES, J. F.; GRAFF, J. C.; JUTILA, M. A. Transcriptional profiling of gamma delta t cells. **J. Immunol.** v. 171p. 4959-4964. 2003.
- HENRIOUD, A. N. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. **Vet Parasitol**, v.180, p.2–11. 2011.
- IBELLI, A. M. G.; RIBEIRO, A. R. B.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; PAC, A. L.; OLIVEIRA, O. H. N.; DUARTE, J. M. S.; OLIVEIRA, M.C.S. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, v.186, p.425– 430. 2012.
- INOKUMA, H.; KEMP, D.H.; WILLADSEN, P. Comparasion of Prostaglandins E2 (PGE2) in salivary gland of *Boophilus microplus*, *Haemophysalis longicornis* and *Ixodes holocyclus*,

and quantification of PGE2 in saliva, hemolymph, ovary and gut of *Boophilus microplus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 56, p. 1217-1218, 1994.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, v. 327, p. 291-295. 2010.

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, p.1–10. 2006.

JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H.; PEARSON, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, v. 16p. 27-34. 1986.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129, p.3–14. 2004.

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

KEMP, D.H.; HALES, J.R.S.; SCHLEGER, A.V.; FAWCETT, A.A. Comparison of cutaneous hyperemia in cattle elicited by larvae of *Boophilus microplus* and by prostaglandins and other mediators. *Experientia*, v.39, p.725–727. 1983.

KIMARO, E.E.; Opdebeeck, J.P. Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from eggs and the gut of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol*, v.52, p.61-70. 1994.

KOVACS, H.; CAMPBELL, I. D.; STRONG, P.; JOHNSON, S.; WARD, F. J.; REID, K. B.M.; EGGLETON, P. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*, v. 37, p.17865–17874. 1998.

KUNZ, S.E.; KEMP, D.H. Insecticides and acaricides—resistance and environmental-impact. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, v.13, p.1249–1286. 1994.

LITTLE, D.A.. The effect of cattle tick infestation on the growth rate of cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.39, p. 6–10. 1963.

MACÊDO, A.A.; MARCIANO, A.P.V.; ROCHA, L.M.; ALVES-JÚNIOR, J.R.F.; FARIA, A.M.C.; BITTAR, J.F.F.; ARAÚJO, M.S.S.; SANTOS, R.L.; MARTINS-FILHO, O.A. Comparative phenotypic profile of subpopulations of peripheral blood leukocytes in European (*Bos taurus taurus*) and Zebu cattle (*Bos taurus indicus*). *Genetics and Molecular Research*. v. 12 (4), p. 6838-6849. 2013.

MADALENA, F.E.; THEODORO, R.L.; LEMOS, A.L.; BARBOSA, R.T. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy cattle in Brazil. *J. Dairy Sci.* 73: 1887-1901

MAGNABOSCO, A.U. Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: Raça Nelore. Cenargen, Brasília, p. 11-52, 1997.

MARUYAMA, S.R.; ANATRIELLO, E.; ANDERSON, J.M.; RIBEIRO, J.M.; BRANDAO, L.G.; VALENZUELA, J.G.; FERREIRA, B.R.; GARCIA, G.R.; SZABO, M.P.; PATEL, S. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. **BMC Genomics**, v.11p.363. 2010.

MARTINEZ, M.L.; LEE, A.J.; LIN, C.Y. Age and Zebu-Holstein additive and heterotic effects on lactation performance and reproduction in Brazil. *J. Dairy Sci.* 71: 800-808. 1988.

MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J. D. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? **Trends in Immunology**,v. 23,p. 485–491. 2002.

MEIRELLES, F.V. Is the american zebu really *Bos indicus*? *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n.4, p.543- 546, 1999.

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

O'KELLY, J.C.; SEIFERT, G.W. The effects of tick (*Boophilus microplus*) infestations on the blood composition of Shorthorn X Hereford cattle on high and low planes of nutrition. **Australian Journal of Biological Sciences**,v. 23, p.681. 1970.

OPDEBEECK, J.P. Vaccines against blood-sucking arthropods. **Vet. Parasitol**, v.54,p. 205-222. 1994.

PANETO, J.C.C.; FERRAZ, J.B.S.; BALIEIRO, J.C.C.; BITTAR, J.F.F.; FERREIRA, M.B.D.; LEITE, M.B.; MERIGHE, G.K.F.; MEIRELLES, F.V. *Bos indicus* or *Bos taurus* mitochondrial DNA - comparison of productive and reproductive breeding values in a Guzerat dairy herd. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 592-602, 2008.

PEREIRA, M.C. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, controle e resistência. São Paulo: Ed. Med Vet, 2008.

PETER, R.J.; VAN DEN BOSSCHE, P.; PENZHORN, B.L.; SHARP, B. Tick, fly, and mosquito control-lessons from the past, solutions for the future. **Vet Parasitol**,v.132,p.205–15. 2005.

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; OHMANN, H.B.; GONDRO, C.; LEW, A.E.; JONSSON, N.N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.431–441. 2010.

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

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BAGNALL, N.H.; KONGSUWAN, K.K.; LEW, A.E.; JONSSON, N.N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p.110–119. 2008.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites-a review. *International Journal Parasitology*. v. 29, p. 25-32. 1999.

RECHAV, Y.; DAUTH, J.; ELS, D. A. Resistance of Brahman and Simmentaler cattle to southern African ticks. **Onderstepoort**, v. 57, p.7–12. 1990.

RESTLE, J.; DE SENNA, D. B.; PACHECO, P. S.; PADUA, J. T.; VAZ, R. Z.; MENEGUZZI, P. A. M. Grupo Genético e Heterose na Produção de Leite de Vacas de Corte Submetidas a Diferentes Sistemas de Alimentação. **R. Bras. Zootec**, v.34, p.1329-1338. 2005.

RIBEIRO, S.H.A. Efeitos da origem e da linhagem do DNA mitocondrial sobre características produtivas e reprodutivas de bovinos leiteiros da raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, p.232-242, 2009.

ROBERTO, J.V.B.; SOUZA, B.B.; SILVA, A.L.N.; JUSTINIANO, S.V.; FREITAS, M.M.S.; Parâmetros hematológicos de caprinos de corte submetidos a diferentes níveis de suplementação no semi-árido paraibano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 1, p.127-132, jan.-mar. 2010.

ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **Journal of Parasitology**, v. 62, p.485–488. 1976.

RODRIGUEZ-VALLE, M.; LEW-TABOR, A.; GONDRO, C.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.; GUERRERO, F.D.; BELLGARD, M.; JORGENSEN, W. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **BMC Genomics**, v. July (11), p.437. 2010.

ROSARIO-CRUZ, R.; ALMAZAN, C.; MILLAR, R.J.; DOMINGUEZ-GARCIA, D.I.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; DE LA FUENTE, J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance *Front. Biosci*, v.14, p.2657–2665. 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. 2001.

SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends Parasitol**, v. 17, p. 368–371. 2001.

SANTIAGO, Alberto Alves. *O Nelore*. São Paulo: Ed. dos Criadores, 1983.

SANTOS, R. *Guzerá: o gado do Brasil*. Agropecuária Tropical, Uberaba. 2005.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S. M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p. 655-663. 2003.

SCHLEGER, A.V.; LINCOLN, D.T.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; ROBERTS, J.A. *Boophilus microplus* – Cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.29, p.499–512. 1976.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 95, p. 755–771. 2001.

SEIFERT, G.W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick. **Australian Journal of Agricultural Research**, 22, 159–168. 1970.

SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ JR, I. Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Vet Immunol Immunopathol**, 2012;148:149–56.

SERAFINO, J.; CONDE, S. ZABAL, O.; SAMARTINO, L. Multiplication of *Brucella abortus* and production of nitric oxide in two macrophage cell lines of different origin. **Rev. Argent. Microbiol.** v 39, p. 193-198. 2007.

SHAPIRO, H. M. Practical flow cytometry. 4.ed. New Jersey: Wiley-Liss, p.681.2003.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S.; BARIONI JR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genet. Mol. Biol**, 30: 1150-1155. 2007.

SKYBERG, J.A.; THORNBURG, T.; ROLLINS, M.; HUARTE, E. Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. **PLoS One** 6: e21978. 2011.

SUTHERST, R.W.; KERR, J.D.; MAYWALD, G.F.; STEGEMAN, D.A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 43, p.329–339. 1983.

SUTHERST, R.W.; JONES, R.J.; SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v. 295, p.320–321. 1982.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary gland lysates from the sand- fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v.239, p. 1306–1308. 1988.

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 Immunology**, v.24, n.7, p.355-361, 2002.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. A comparison of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. **International Journal Parasitology**, v.34, n.7, p.833-838, 2004.

TURNI, C.; LEE, R.P.; JACKSON, L.A. The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* tick on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.5, p. 545-552, 2007.

UTECH, K.B.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*: I. Factors affecting resistance. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p.411-422. 1978a

VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. Melhoramento genético de bovinos de leite. Embrapa Gado de Leite, Brasília. 2001.

VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J.M. C. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.18717-18723. 2000.

VERCRUYSSSE, J.; SCHETTERS, T.P.; KNOX, D.P.; WILLADSEN, P.; CLAEREBOU, E. Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance? **Rev. Sci. Technol**, v. 26, p.105-115. 2007.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Características do pelame e infestação por carrapatos em bovinos Gir e mestiços (Holandês x Gir). In: REUNIÃO ANUAL: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu, [s. n.], 1998.

VERÍSSIMO, C.J.; NICOLAU, C.V.J.; CARDOSO, V.L.; PINHEIRO, M.G. Haircoat characteristics and tick infestation on Gyr (Zebu) and crossbreed (Holstein x Gyr) cattle. **Arch. Zootec**, v. 51p.389-392. 2002.

VILLARES, J.B. Climatologia zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Bol.Ind.Anim.**, v.4, n.1, p.60-86, 1941.

WANG, Y.H.; REVERTER, A.; KEMP, D.; MCWILLIAM, S.M.; INGHAM, A.; DAVIS, C.A.; MOORE, R.J.; LEHNERT, S.A. Gene expression profiling of Hereford Shorthorn cattle following challenge with *Boophilus microplus* tick larvae. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.47,p. 1397-1407. 2007.

WANG, H.; NUTTALL, P .A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology**, v.109,p. 525-530. 1994.

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

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Vet Parasitol**,v.138p.161-8. 2006.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**,v.129,p.367–87. 2004.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V.; RIDING, G.A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **Int. J. Parasitol**,v. 18,p.183-189. 1988.

ANEXO A- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ofício CEEA-011/2014

Uberaba, 17 de março de 2014

Ilmo. Prof.

Eustáquio Resende Bittar

Assunto: Encaminha processo nº 014/2013, sobre o protocolo de Pesquisa "*Caracterização celular e molecular de vacas da raça Guzerá aptidão submetidas a altas infestações por Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à reavaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 24/02/2014, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

**Prof. Jozely F. Figueiredo Bittar**

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

APÊNDICE A- Valores de amplitudes máxima (Máx) e mínima (Mín), média e desvios padrão (dp) do perfil eritrocitário e proteínas plasmáticas dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial *Indicus* (DNAmiT) ou DNA mitocondrial *Taurus* (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Parâmetros		GI (DNAmiT)		GII (DNAmiT)	
		Amplitude Mín a Máx	Média±dp	Amplitude Mín a Máx	Média±dp
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	D0	8,55 a 10,99	10,23±0,69 ^{Aa}	9,38 a 12,09	10,48±0,84 ^{Aa}
	D+1	8,27 a 10,28	9,11±0,66 ^{Ab}	8,41 a 11,57	9,31±0,88 ^{Ab}
	D+9	7,79 a 9,57	8,87±0,55 ^{Abb}	7,77 a 9,86	8,97±0,67 ^{Ab}
	D+21	8,56 a 10,49	9,62±0,60 ^{Abc}	4,58 a 10,36	9,19±1,73 ^{Aa}
Hemoglobina (g/dl)	D0	9,4 a 12,6	11,6±0,88 ^{Aa}	11,3 a 14,3	12,11±0,99 ^{Aa}
	D+1	9,4 a 11,7	10,2±0,75 ^{Ab}	9,8 a 12,9	10,69±0,99 ^{Ab}
	D+9	8,8 a 11,0	10,0±0,64 ^{Ab}	9,2 a 12,0	10,38±0,77 ^{Ab}
	D+21	9,8 a 11,5	10,5±0,60 ^{Aa}	5,8 a 12,1	10,40±1,78 ^{Ab}
Hematócrito (%)	D0	28,7 a 40,0	36,08±3,28 ^{Aa}	33,6 a 45,4	38,06±3,19 ^{Aa}
	D+1	28,6 a 36,9	31,93±2,57 ^{Ab}	28,4 a 38,9	33,59±2,89 ^{Ab}
	D+9	26,3 a 33,5	30,74±2,21 ^{Ab}	28,8 a 37,1	31,81±2,43 ^{Ab}
	D+21	29,2 a 37,4	32,89±2,57 ^{Ab}	18,7 a 38,4	32,36±5,56 ^{Aa}
VCM (fl)	D0	33,4 a 37,4	35,2±1,6 ^{Aa}	31,8 a 39,4	36,4±2,4 ^{Aa}
	D+1	33,5 a 37,4	35,1±1,4 ^{Aab}	31,6 a 39,2	36,2±2,3 ^{Aa}
	D+9	32,5 a 36,9	34,7±1,4 ^{Ab}	31,6 a 38,8	35,5±2,2 ^{Aa}
	D+21	32,2 a 36,1	34,2±1,1 ^{Abc}	31,6 a 40,8	35,5±2,8 ^{Aa}
CHCM (%)	D0	30,7 a 33,2	32,1±0,8 ^{Aa}	30,7 a 34,8	31,8±1,2 ^{Aa}
	D+1	30,8 a 33,2	32,0±0,8 ^{Aa}	29,9 a 34,5	31,8±1,4 ^{Aab}
	D+9	31,4 a 33,5	32,7±0,6 ^{Aa}	31,1 a 35,8	32,7±1,4 ^{Abc}
	D+21	30,7 a 33,9	31,9±1,0 ^{Aa}	31,0 a 34,6	32,0±1,3 ^{Aab}
Proteínas Plasmáticas (PP) (g/dL)	D0	6,6 a 7,8	7,4±0,4 ^{Aa}	0,0 a 8,0	7,6±0,3 ^{Aa}
	D+1	6,2 a 7,6	7,1±0,4 ^{Aa}	6,8 a 7,4	7,1±0,3 ^{Abb}
	D+9	6,4 a 8,4	7,3±0,6 ^{Aa}	6,4 a 7,4	7,1±0,3 ^{Ab}
	D+21	6,4 a 7,6	7,0±0,4 ^{Ab}	6,0 a 7,2	6,7±0,4 ^{Abc}

Para cada parâmetro, letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os grupos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os momentos.

APÊNDICE B- Valores de amplitudes máxima (Máx) e mínima (Mín), média e desvios padrão (dp) do perfil leucocitário dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmItI) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmItT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Parâmetros		GI (DNAmItI)		GII (DNAmItT)	
		Amplitude Mín a Máx	Média±dp	Amplitude Mín a Máx	Média±dp
Leucócitos Totais (/mm ³)	D0	8200 a 18200	14660±3100 ^{Aa}	8800 a 18300	12950±2906 ^{Aa}
	D+1	8700 a 15600	13260±2136 ^{Aa}	10700 a 16500	12680±2004 ^{Aa}
	D+9	8100 a 17600	12580±2780 ^{Ab}	8700 a 15700	12220±2399 ^{Aa}
	D+21	7100 a 15500	13070±2563 ^{Aa}	9000 a 20600	12170±3343 ^{Aa}
Segmentados (/mm ³)	D0	3034 a 7350	5413,8±1605,6 ^{Aa}	1936 a 5056	3768,5±1036,9 ^{Ba}
	D+1	1890 a 8370	5870,0±2036,4 ^{Aa}	3531 a 8556	5328,7±1299,7 ^{Aa}
	D+9	810 a 11616	5315,8±2754,3 ^{Aa}	1800 a 7379	4512,4±1839,7 ^{Aa}
	D+21	2142 a 6975	4489,7±1651,5 ^{Aa}	2134 a 8446	3928,3±1866,8 ^{Aa}
Linfócitos (/mm ³)	D0	4428 a 11098	8514,5±1915,8 ^{Aa}	5664 a 12627	8468,1±2165,5 ^{Aa}
	D+1	2175 a 10458	6884,2±2807,1 ^{Aa}	3472 a 9405	6299,8±1846,6 ^{Ab}
	D+9	3939 a 8178	6575±1377,1 ^{Ab}	5151 a 9480	7103,7±1689,5 ^{Aa}
	D+21	4260 a 9936	7700,7±1629,4 ^{Aa}	4720 a 9246	6831,9±1403,5 ^{Ab}
Eosinófilos (/mm ³)	D0	129 a 910	421±272 ^{Aa}	00 a 987	334±337 ^{Aa}
	D+1	00 a 670	207±246 ^{Aa}	124 a 1974	679±530 ^{Ba}
	D+9	101 a 423	257±124 ^{Aa}	00 a 720	332±263 ^{Aa}
	D+21	00 a 1240	489±394 ^{Aa}	00 a 2472	777±739 ^{Aa}
Monócitos (/mm ³)	D0	00 a 728	293±208 ^{Aa}	135 a 705	380±184 ^{Aa}
	D+1	00 a 620	299±224 ^{Aa}	00 a 904	373±258 ^{Aa}
	D+9	100 a 880	432±201 ^{Aa}	87 a 471	259±143 ^{Ba}
	D+21	00 a 888	349±284 ^{Aa}	00 a 2060	633±619 ^{Aa}
Basófilos (/mm ³)	D0	00 a 179	18±57 ^{Aa}	00 a 00	00±00 ^{Aa}
	D+1	00 a 00	00±00 ^{Aa}	00 a 00	00±00 ^{Aa}
	D+9	00 a 00	00±00 ^{Aa}	00 a 132	13±42 ^{Aa}
	D+21	00 a 147	42±67 ^{Aa}	00 a 00	00±00 ^{Aa}

Para cada parâmetro, letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.

APÊNDICE C- Valores de amplitudes máxima (Máx) e mínima (Mín), média e desvios padrão (dp) do perfil leucocitário dos grupos de novilhas Guzerá com DNA mitocondrial Indicus (DNAmIT) ou DNA mitocondrial Taurus (DNAmiT) mantidos na Fazenda Escola da UNIUBE, MG.

Parâmetros		GI (DNAmIT)		GII (DNAmiT)	
		Amplitude		Amplitude	
		Mín a Máx	Média±dp	Mín a Máx	Média±dp
Linfócitos T total	D0	38,45- 59,27% 2624-5211	48,99±7,06% 4087±751 ^{Aa}	39,78-60,66% 2530-5281	49,32±7,36% 4104±870 ^{Aa}
	D+1	32,51-54,59% 1134-5621	43,57±7,63% 3019±1521 ^{Abc}	32,66-55,21% 1634-4006	43,35±7,26% 2708±807 ^{Abc}
	D+9	35,18-56,18% 1734-447	47,49±6,41% 3168±949 ^{Abc}	39,31-57,09% 2155-5412	49,02±5,90% 3491±984 ^{Ab}
	D+21	47,77-65,93% 2418-5617	54,52±5,25% 2764-6286 ^{Aad}	44,72-79,69% 4191±960	58,36±10,05% 3981±1110 ^{Aad}
Linfócitos T CD4 ⁺	D0	13,78- 26,88% 1046- 1991(/mm ³)	18,78±4,97% 1533±282(/mm ³) ^{Aa}	15,32- 25,22% 1052-2263(/mm ³)	19,26±3,46% 1599±359(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	9,10- 25,35% 526-2427(/mm ³)	18,21±5,16% 1251±685(/mm ³) ^{Aac}	14,18- 25,17% 756-1623(/mm ³)	18,23±3,78% 1129±332(/mm ³) ^{Abc}
	D+9	15,06- 26,94% 813-2067(/mm ³)	19,90±3,82% 1324±441(/mm ³) ^{Aa}	16,85- 25,32% 868-2351(/mm ³)	20,93±3,35% 1498±468(/mm ³) ^{Aad}
	D+21	12,88- 26,31% 880-2551(/mm ³)	21,26±4,13% 1645±515(/mm ³) ^{Aad}	18,84- 43,46% 1164-3428(/mm ³)	25,51±6,86% 1751±664(/mm ³) ^{Aad}
Linfócitos T CD8 ⁺	D0	12,09-24,16 % 827-2210(/mm ³)	19,41±4,01% 1640±460(/mm ³) ^{Aa}	12,53-26,42 % 710 -2099(/mm ³)	18,67±4,75% 1544±379(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	10,34-21,82 % 475-2217(/mm ³)	16,41±4,32% 1123±600(/mm ³) ^{Abc}	10,12-23,07 % 491-1290(/mm ³)	15,30±4,12% 940±270(/mm ³) ^{Ab}
	D+9	10,58-21,71 % 591-1577(/mm ³)	16,66±3,55% 1089±312(/mm ³) ^{Ab}	12,23-21,08 % 703- 1545(/mm ³)	16,68±3,18% 1158±226(/mm ³) ^{Aa}
	D+21	13,51-27,61 % 944-2285(/mm ³)	21,41±4,36% 1631±424(/mm ³) ^{Aad}	12,58-26,37 % 940-1990(/mm ³)	20,07±3,82% 1358±350(/mm ³) ^{Ab}
Linfócitos T γδ ⁺	D0	3,15-12,67% 139 a 1199(/mm ³)	7,94±2,93% 686±279(/mm ³) ^{Aa}	2,12- 15,39% 208 a 1377(/mm ³)	8,42±4,20% 715±416(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	2,99- 9,97% 65 a 1027(/mm ³)	6,64±2,61% 488±308(/mm ³) ^{Ab}	1,79- 11,50% 101 a 1073(/mm ³)	7,33±3,27% 488±308(/mm ³) ^{Ab}
	D+9	3,29- 11,71% 130 a 958(/mm ³)	7,04±2,77% 486±249(/mm ³) ^{Ab}	2,26- 12,50% 133 a 1073(/mm ³)	6,79±3,38% 514±343(/mm ³) ^{Ab}
	D+21	3,60- 13,66% 153 a 1164(/mm ³)	8,17±3,08% 641±272(/mm ³) ^{Aa}	3,47- 14,86% 214 a 1133(/mm ³)	8,58±3,52% 602±312(/mm ³) ^{Aa}
	D0	1,28- 5,66%	2,86±1,57%	1,25- 8,00%	2,97±1,93%

Linfócitos T CD25 ⁺		121 a 495(/mm ³)	228±114(/mm ³) ^{Aa}	78 a 534(/mm ³)	245±135(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	1,61- 3,25% 68 a 257(/mm ³)	2,32±0,53% 156±69(/mm ³) ^{Aa}	1,77- 3,82% 90 a 210(/mm ³)	2,49±0,60% 151±34(/mm ³) ^{Aac}
	D+9	1,59- 6,66% 78 a 511(/mm ³)	3,89±1,92% 268±159(/mm ³) ^{Aa}	1,44- 6,35% 120 a 545(/mm ³)	4,63±1,58% 320±127(/mm ³) ^{Aad}
	D+21	2,17- 6,72% 182 a 479(/mm ³)	3,68±1,31% 274±89(/mm ³) ^{Aa}	1,84- 7,02% 170 a 422(/mm ³)	4,20±1,71% 270±79(/mm ³) ^{Aad}
Linfócitos B CD21 ⁺	D0	9,91- 26,84% 881- 3152(/mm ³)	18,42±5,16% 1706±667(/mm ³) ^{Aa}	9,82- 27,09% 677- 3606(/mm ³)	20,97±4,80% 1920±782(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	16,85- 36,60% 427- 2611(/mm ³)	24,32±6,68% 1692±663(/mm ³) ^{Aa}	16,77- 29,36% 707-2823(/mm ³)	23,94±4,39% 1618±718(/mm ³) ^{Aa}
	D+9	12,33- 24,63% 592- 2112(/mm ³)	19,17±4,28% 1438±437(/mm ³) ^{Aa}	12,72- 26,02% 979- 2483(/mm ³)	19,84±4,69% 1591±525(/mm ³) ^{Ab}
	D+21	10,74- 22,32% 609- 1888(/mm ³)	16,98±4,21% 1422±423(/mm ³) ^{Aa}	14,34- 33,01% 739- 2539(/mm ³)	20,30±5,69% 1449±498(/mm ³) ^{Ab}
Razão LT/LB	D0	1,35-5,38(/mm ³)	2,69±1,11(/mm ³) ^{Aa}	1,39-5,51(/mm ³)	2,44±1,16(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	0,99-3,16(/mm ³)	1,88±0,72(/mm ³) ^{Abc}	1,24-3,15(/mm ³)	1,84±0,65(/mm ³) ^{Abc}
	D+9	1,42-3,28(/mm ³)	2,29±0,65(/mm ³) ^{Aa}	1,65-3,59(/mm ³)	2,33±0,77(/mm ³) ^{Aa}
	D+21	2,16-4,27(/mm ³)	3,11±0,74(/mm ³) ^{Abd}	1,41-4,76(/mm ³)	3,00±1,11(/mm ³) ^{Aad}
Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺	D0	0,60-1,94(/mm ³)	1,02±0,41(/mm ³) ^{Aa}	0,71-1,48(/mm ³)	1,08±0,29(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	0,44-2,45(/mm ³)	1,19±0,52(/mm ³) ^{Aa}	0,76-1,60(/mm ³)	1,24±0,30(/mm ³) ^{Aa}
	D+9	0,84-2,44(/mm ³)	1,27±0,47(/mm ³) ^{Abc}	0,86-1,69(/mm ³)	1,29±0,28(/mm ³) ^{Aa}
	D+21	0,53-1,85(/mm ³)	1,06±0,39(/mm ³) ^{Aad}	0,98-1,98(/mm ³)	1,30±0,37(/mm ³) ^{Ab}
Linfócitos NK 335 ⁺	D0	4,04- 8,54% 191 a 899(/mm ³)	6,18±1,57% 536±211(/mm ³) ^{Aa}	2,10- 7,40% 134 a 817(/mm ³)	4,93±2,02% 425±225(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	2,81- 5,85% 79 a 452(/mm ³)	4,06±0,89% 274±113(/mm ³) ^{Abc}	1,32- 5,25% 114 a 364(/mm ³)	3,27±1,23% 199±85(/mm ³) ^{Abc}
	D+9	1,94- 7,02% 76 a 531(/mm ³)	4,65±1,91% 318±154(/mm ³) ^{Ab}	1,55- 6,71% 147 a 425(/mm ³)	4,20±1,76% 279±95(/mm ³) ^{Aa}
	D+21	3,75- 12,45% 160 a 851(/mm ³)	6,61±2,52% 513±207(/mm ³) ^{Aad}	2,61- 9,54% 199 a 649(/mm ³)	5,24±2,01% 350±137(/mm ³) ^{Bad}
Monócitos CD14 ⁺	D0	0,95- 4,61% 00 a 15(/mm ³)	2,36±1,25% 07±05(/mm ³) ^{Aa}	0,81- 2,89% 02 a 13(/mm ³)	2,01±0,68% 07±03(/mm ³) ^{Aa}
	D+1	0,69- 3,98% 00 a 18(/mm ³)	2,25±1,15% 08±07(/mm ³) ^{Aa}	0,49- 4,81% 00 a 30(/mm ³)	2,52±1,43% 10±09(/mm ³) ^{Aa}
	D+9	2,53- 6,72% 03 a 58(/mm ³)	4,57±1,60% 21±15(/mm ³) ^{Aa}	2,03- 8,67% 03 a 27(/mm ³)	4,15±1,81% 11±08(/mm ³) ^{Aa}
	D+21	2,46- 30,30% 00 a 54(/mm ³)	7,77±8,31% 22±19(/mm ³) ^{Aa}	1,07- 8,14% 00 a 89(/mm ³)	4,94±1,96% 31±30(/mm ³) ^{Ab}

Para cada parâmetro, letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos. Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.