

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTAGEM DE MASTÓCITOS DÉRMICOS EM BOVINOS
F₂ MESTIÇOS HOLANDÊS HPB x GIR INFESTADOS
ARTIFICIALMENTE COM CARRAPATOS *Boophilus
microplus* (ACARI:IXODIDAE)**

Jair Rodini Engracia Filho

Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária – Área de Concentração em Patologia Animal

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2005**

Engracia Filho, Jair Rodini
E58c Contagem de mastócitos dérmicos em bovinos F₂ mestiços
Holandês HPB x Gir infestados artificialmente com carrapatos
Boophilus microplus (ACARI:IXODIDAE) / Jair Rodini Engracia Filho. –
– Jaboticabal, 2005
xi, 110 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005

Orientador: Gervásio Henrique Bechara

Banca examinadora: Matias Pablo Juan Szabó, Hélio José
Montassier, Beatriz Rosseti Ferreira, Isabel Kinney Ferreira de
Miranda Santos

Bibliografia

1. Mastócitos. 2. *Boophilus microplus*. 3. Bovinos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-091.8:636.2

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jair Rodini Engracia Filho – nascido em Orlandia, São Paulo a seis de agosto de 1972, RG – 21.676.906, CPF – 138.777.138-82, Título de eleitor – 180.3212.301-41 e CRMV-SP 10.183. Filho de Jair Rodini Engracia e Wilma Solera Engracia, casado com Juliana Franco Gracioli Engracia e pai de Maria Júlia Gracioli Engracia. Concluiu o curso de 1º grau na E.E.P.G. “Coronel Francisco Orlando” - Orlandia, SP- 1986. A conclusão do 2º grau, em 1989, deu-se em Ribeirão Preto-SP, no Colégio e Curso Oswaldo Cruz. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em 1991, cursando somente o 1º semestre do curso e trancando matrícula por ter sido aprovado no curso de Medicina Veterinária da FCAV/UNESP - Jaboticabal em fevereiro de 1992, o qual foi concluído em dezembro de 1996. Durante o curso foi bolsista PIBIC/CNPq por duas vezes. Em 1997 trabalhou como médico veterinário autônomo na Clínica Veterinária Quatro Patas, Ribeirão Preto-SP. Em março de 1998 iniciou curso de Mestrado em Patologia Animal da FCAV/UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Alvimar José da Costa, atuando também como pesquisador do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR). O Título de Mestre foi obtido em janeiro de 2001 com a dissertação “Aspectos biológicos, fisiopatológicos e terapêuticos na toxoplasmose experimental em coelhas gestantes”, a qual foi aprovada com distinção e louvor. Em março de 2001 iniciou o Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Atua desde fevereiro de 2000 como professor adjunto das disciplinas de Anatomia Patológica Geral e Especial do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto, SP, onde também é coordenador de estágio curricular e responsável técnico do Biotério Central.

...Quero ser o homem que sou,
... Mas dizendo a verdade, somente a verdade...
...Esse gênio esboçado, essa criança louca, esse filho da dor,
Que foi capaz de erguer do lodo
Uma voz rouca e um canto de amor.
Enquanto geme e chora, mata e mente, acusa e defende
Deixa ficar para trás, na sua jornada, uma canção de glória!!...”
(Raul Seixas)

Ofereço

À minha esposa **JULIANA** e minha filha **MARIA JÚLIA**,
razões da minha alegria e força de viver, estímulos
inesgotáveis para que eu nunca desistisse desta difícil
caminhada.

Dedico

Aos meus pais, **JAIR** e **WILMA**, pela força e apoio incondicionais durante toda minha vida acadêmica e, especialmente, durante o desenvolvimento desta tese.

Ao **Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**, pelo exemplo de profissionalismo, amizade, bom humor, paciência, compreensão, serenidade e bom gosto musical.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelo privilégio de ter a chance de obter o título de Doutor;

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara pela orientação acadêmica e por tudo que fez para que eu conseguisse chegar até aqui;

Ao Dr. Roberto Luiz Teodoro, em nome de toda equipe da Embrapa Gado de Leite, pela disponibilização das informações e materiais do projeto “Marcadores”, pela colheita e envio das biópsias e pelas dicas e orientações preciosas;

À grande amiga e “chefa” Prof^a. Dr^a Adriana Coelho de Souza, pelo apoio incomensurável, compreensão e convivência durante todo meu período de doutoramento;

Aos meus tios e mentores Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e Prof^a Dr^a Julieta Rodini Engracia de Moraes;

Ao Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó e Prof^a Dr^a Rosângela Zacarias Machado pelas orientações e dicas, principalmente no obscuro mundo da imunopatologia;

Aos Professores Áureo Evangelista Santana e Gilson Pereira de Oliveira pelas valiosas sugestões e correções deste trabalho;

Ao amigo e estatístico Dr. Vando Edésio Soares pela contribuição na análise estatística do experimento;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV;

Aos professores Paulo Francischini (Cocão) e Mario Roberto Hatayde (Pitanga) pela confiança, amizade e oportunidades oferecidas.

Aos grandes amigos de pós-graduação, república e aos dinossauros que restaram em Jaboticabal nos últimos anos: Anderson, Stanley, Lepra, Ratão, Nara, Guilhermão, Guilherme (Homer), Nilson, Gugula, Patrícia, Rafael e tantos outros que não caberiam aqui mas estão guardados no coração...

Ao U2 Boy Cover, ao Banzé e ao Kama Sutra pelos momentos inesquecíveis, tocando boa música e fazendo a vida valer a pena;

Ao Ozzy e à Black, por me ensinarem o valor do amor incondicional;

À Juliana por ter me dado a Maria Júlia, maior presente da minha vida!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1. O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	1
2. Importância econômica e sanitária das infestações por <i>B. microplus</i>	2
3. O controle do <i>B. microplus</i>	4
4. Seleção de raças resistentes.....	5
5. Mecanismos de parasitismo dos ixodídeos.....	8
6. Resistência do bovino ao <i>B. microplus</i>	10
7. Mecanismos celulares envolvidos na resistência a carrapatos.....	13
8. Aspectos morfofuncionais de eosinófilos.....	17
9. Aspectos morfofuncionais de basófilos.....	18
10. Aspectos morfofuncionais de mastócitos.....	19
II. OBJETIVOS.....	23
1. Geral.....	23
2. Específicos.....	23
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Hospedeiros.....	24
2. Parasitas.....	25
3. Infestação artificial.....	25
4. Avaliação da carga parasitária.....	26
5. Colheita de material para histopatologia.....	26
6. Histopatologia.....	28
6.1. processamento histológico.....	28
6.2. Avaliação dos aspectos histopatológicos gerais.....	28
6.3. Contagem diferencial de células inflamatórias.....	28
6.4. Avaliação da população mastocitária em derme não-inflamada.....	30
7. Análise estatística.....	30

7.1. Contagens de carrapatos.....	30
7.2. Avaliação do efeito da infestação artificial na população de mastócitos dérmicos.....	30
7.3. Comparação do número de mastócitos entre os animais com altas e baixas infestações.....	31
7.4. Avaliação da correlação entre idade e grau de infestação dos hospedeiros.....	31
7.5. Avaliação da correlação entre idade e população de mastócitos em derme não-inflamada.....	31
7.6. Avaliação da correlação entre número de mastócitos cutâneos e grau de infestação dos hospedeiros.....	32
7.7. Comparação do número de mastócitos entre os animais pertencentes às gerações F ₀ , F ₁ e F ₂	32
IV. RESULTADOS.....	33
1. Infestação artificial com larvas de <i>B. microplus</i>	33
1.1. Contagens de carrapatos.....	33
1.2. Avaliação da influência da sazonalidade no grau de infestação por carrapatos.....	36
1.3. Avaliação da correlação entre idade dos hospedeiros e grau de infestação por <i>B. microplus</i>	37
2. Amostras de pele, colhidas de bovinos mestiços F ₂ HPB x Gir após infestação artificial, com presença de sítio de fixação de carrapatos.....	38
2.1. Aspectos histopatológicos gerais.....	38
2.2. Contagem diferencial de células inflamatórias no sítio de fixação e avaliação da correlação com o grau de infestação por carrapatos.....	41
3. Amostras de pele não-inflamada de bovinos mestiços F ₂ HPB x Gir colhidas antes e após infestação artificial com carrapatos.....	44
3.1. Aspectos histopatológicos gerais.....	44
3.2. Avaliação do efeito da infestação artificial no número de mastócitos em bovinos mestiços F ₂ HPB x Gir.....	46
3.3. Comparação de número de mastócitos dérmicos entre animais resistentes e susceptíveis.....	48

3.4. Avaliação da correlação entre idade e número de mastócitos cutâneos em animais artificialmente infestados com carrapatos.....	50
3.5. Avaliação da correlação entre número de carrapatos e número de mastócitos cutâneos.....	52
4. Comparação do número de mastócitos cutâneos entre animais F_0 , F_1 e F_2	54
V. DISCUSSÃO.....	55
VI. CONCLUSÕES.....	68
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICES	88
Apêndice A: Contagem diferencial de células inflamatórias no sítio de fixação e avaliação da correlação com o grau de infestação por carrapatos.....	89
Apêndice B: Avaliação do efeito da infestação artificial no número de mastócitos em bovinos mestiços F_2 HPB x Gir.....	92
Apêndice C : Comparação de número de mastócitos dérmicos entre animais resistentes e susceptíveis.....	105
Apêndice D : Comparação do número de mastócitos cutâneos entre animais F_0 , F_1 e F_2	109

**CONTAGEM DE MASTÓCITOS DÉRMICOS EM BOVINOS F₂ MESTIÇOS
HOLANDÊS HPB x GIR INFESTADOS ARTIFICIALMENTE COM CARRAPATOS
Boophilus microplus (ACARI:IXODIDAE)**

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta cutânea e a correlação entre contagens de carrapatos e número de mastócitos em pele de bovinos artificialmente infestados. Para tanto, 148 animais F₂ provenientes de animais F₁ Holandês x Gir, foram infestados artificialmente com $1,0 \times 10^4$ larvas de *B. microplus* por animal e, após 21 dias, foi realizada contagem de carrapatos. Antes da infestação e 21 dias após, foram colhidos fragmentos da pele, os quais foram fixados, processados e corados com May-Grünwald & Giemsa e H.E. Os mastócitos cutâneos dos bovinos F₀ (Gir puros), F₁ e F₂ foram contados em microscópio de luz com retículo ocular quadriculado e objetiva de 40x na derme superficial e profunda, além disso, foram feitas contagens globais de células no sítio de fixação. Os valores obtidos mostraram que a infestação artificial induziu aumento significativo no número de mastócitos na derme de bovinos F₂, e que este aumento foi acompanhado por intensa infiltração de eosinófilos. O exame histopatológico do sítio de fixação dos carrapatos mostrou alterações gerais semelhantes às observadas por outros autores em períodos mais curtos de fixação. A contagem diferencial de células mostrou que houve predomínio de eosinófilos, neutrófilos e mononucleares e que houve significativa correlação negativa entre mastócitos e basófilos e entre mastócitos e neutrófilos. Correlação significativa entre número de carrapatos e contagem de mastócitos só foi observada na derme superficial, após infestação artificial. Também houve correlação altamente significativa entre idade e número de mastócitos. As populações mastocitárias de animais Gir puros e mestiços F₁ e F₂ não mostraram diferença significativa.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, gir, holandês, mastócitos, resposta cutânea

DERMAL MAST CELLS COUNTS IN F₂ HOLSTEIN x GIR CROSSBRED CATTLE ARTIFICIALLY INFESTED WITH *Boophilus microplus* TICK (ACARI:IXODIDAE)

SUMMARY - This work had as objective to evaluate the cutaneous response and the correlation between tick infestation and mast cells number in the skin of artificially infested bovines. For this purpose, 148 bovines F₂ crossbred Holstein x Gir cattle, were artificially infested with $1,0 \times 10^4$ *B. microplus* larvae and, after 21 days, ticks attached were counted. Before the infestation (B.I.) and 21 days after (A.I.), biopsies of the skin were harvested, fixed, processed and stained with May-Grünwald & Giemsa and H.E. Dermal mast cells of F₀ (pure Gir), F₁ and F₂ crossbred cattle were counted under light microscopy with square-lined ocular reticulum and 40x objective in the superficial and deep dermis. Diferencial inflammatory cells countings of the tick attachment site were also done. The data obtained showed that artificial infestation induced a significant increase in the mast cell number in the dermis of F₂ cattle, and that this increase was followed by intense eosinophils infiltration. The histopatological evaluation of the tick feeding sites 21 days A.I. showed general alterations similar to that observed by other authors in shorter periods of tick feeding and, the diferencial cells counts showed a negative correlation between mast cells and basophils and between mast cells and neutrophils. Significant correlation between tick number and mast cells counts were observed in the upper dermis after artificial tick infestation. A correlation was also detected between age and mast cells numbers. No significant differences in the mast cell populations of pure Gir and F₁ and F₂ crossbred cattle were observed.

Keywords: *Boophilus microplus*, gir, holstein, mast cell, cutaneous response

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. O carrapato *Boophilus microplus*

O *Boophilus microplus* é um ectoparasito pertencente à família IXODIDAE, que tem na espécie bovina seu hospedeiro preferencial. Recentemente sugeriu-se que o gênero *Boophilus* seja parafilético ao gênero *Rhipicephalus*, devendo o primeiro ser classificado como subgênero do *Rhipicephalus*. Segundo esta mudança de nomenclatura, seria mantido o *Boophilus* conhecido no uso comum, ou seja, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* poderá continuar a ser nomeado como *B. microplus*, mas a nomenclatura deverá mudar no futuro para refletir novos conhecimentos da filogenia e a evolução destes carrapatos (BARKER & MURREL, 2002).

Originário da Ásia, principalmente da Índia e Ilha de Java, sua expansão se deu a partir do século XV com o trânsito de animais e mercadorias nas expedições exploradoras européias.

Atualmente, o *B. microplus* é encontrado na Ásia, Austrália, México, América Central, América do Sul e África, ou seja, praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32 de Latitude Norte e 25 de Latitude Sul (FREITAS, 1982). A introdução deste em território brasileiro se deu, provavelmente, no Rio Grande do Sul por meio de bovinos oriundos do Chile no início do século XVII (THIESEN, 1979 citado por GOMES, 1998).

O carrapato *B. microplus* é um parasita monoxeno, ou seja, possui um único hospedeiro em seu ciclo evolutivo. Há uma divisão nítida de seu ciclo em uma fase parasitária que se realiza no corpo do hospedeiro e uma fase de vida livre desenvolvida na cobertura vegetal.

Na região central do Brasil, segundo Furlong (1993), na fase de vida livre são necessários em torno de três dias para a pré-postura; de 21 a 42 dias para a postura; 22 a 30 dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-as em larvas infestantes. Na fase parasitária são

necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das fêmeas.

De modo geral, o início e o término deste ciclo se dão quase sempre no pasto, onde se integram o parasito, o hospedeiro e o meio ambiente (GOMES, 1998).

A fase parasitária pode ser delimitada em seu início pela fixação das larvas em um hospedeiro susceptível. Neste período não há influência das condições externas, sendo então as condições do próprio hospedeiro que ocupam papel preponderante no desenvolvimento dos carrapatos.

É na fase de vida parasitária que ocorre a cópula, bem como as mudanças de estádios. O término desta fase é marcado pelo momento em que os parasitas adultos, principalmente as fêmeas fecundadas e ingurgitadas, desprendem-se do hospedeiro e caem ao solo para sua oviposição (GOMES, 1998).

2. Importância econômica e sanitária das infestações por *B. microplus*

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo com aproximadamente 170 milhões de cabeças (BRASIL, 2003), sendo que cerca de 18% é destinado à bovinocultura de leite e o restante à atividade de corte. Somadas, representam 50% do PIB agropecuário do Brasil (INDICADORES RURAIS, 2001).

O carrapato-do-boi é, sem dúvida, o ectoparasito de maior impacto econômico na pecuária de leite e corte nacional, por ocasionar um prejuízo anual estimado em 2 bilhões de dólares, segundo Grisi et al. (2002). Horn (1988) descreve um gasto anual de 13,8 milhões de dólares somente com acaricidas, o que representaria 15% do gasto total do país com defensivos na agropecuária.

Tais prejuízos devem-se a diferentes fatores relativos à biologia e aos aspectos parasitários do *B. microplus*. O carrapato atua como vetor de bioagentes patogênicos como os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994), conhecidos causadores da chamada Tristeza Parasitária Bovina (TPB), uma das doenças mais importantes da bovinocultura

brasileira. Mais recentemente, comprovou-se a participação do carrapato na transmissão da *Theileria equi* (GUIMARÃES et al., 1998).

No processo de fixação e ingurgitamento do carrapato, há a inoculação de diferentes toxinas no hospedeiro, promovendo alterações fisiológicas que podem levar à inapetência e interferir na síntese protéica (GOMES, 1998). Componentes da saliva do carrapato, tais como inibidores de prostaglandinas e outros moduladores da resposta inflamatória, são inoculados, podendo provocar reações de hipersensibilidade, paralisia de membros ou até hipotrofia testicular (SAUER et al., 1995).

Estima-se que cada teleógina é responsável pela queda de produção de 8,9 mL de leite e de 1g de peso corporal do hospedeiro, diariamente (JONSSON et al., 1998). Holroyd et al. (1987) observaram que, em um período de três anos, animais que não foram parasitados por carrapatos tiveram um ganho de peso 17 Kg maior do que aqueles expostos ao parasita. No mesmo sentido, Furlong et al. (1996) observaram, em infestações crescentes sucessivas, decréscimo na produção leiteira.

As soluções de continuidade causadas pela fixação do carrapato em seu hospedeiro tornam-se portas de entrada para infecções bacterianas e miíases. Ademais, no processo de fixação, o carrapato provoca lesões na pele do animal, responsáveis pela depreciação do couro quando do seu beneficiamento nos curtumes. De fato, os prejuízos causados pela ação mecânica do carrapato são de grande importância em regiões de tradição em produção coureira (SAUER et al., 1995). Neste sentido, os produtores brasileiros de couro cru deixaram de ganhar e transferir ao setor pecuário, cerca de 500 milhões de dólares por ano entre 1986 e 1995 (PROGRAMA, 2004).

Além dos danos diretos supracitados, há que se considerar as perdas indiretas causadas pelos carrapatos, representadas pelos gastos com mão-de-obra, medicamentos, construções e medidas preventivas necessárias no combate ao ectoparasito. (GOMES, 1998).

3. O controle do *B. microplus*

A natureza dispõe de mecanismos que limitam o parasitismo visando um equilíbrio na relação hospedeiro-parasita. Do ponto de vista biológico, o parasitismo é uma relação natural entre dois ou mais organismos vivos, de forma que a imunidade do hospedeiro e o escape desta vigilância pelo parasita são fenômenos relativos que existem de forma equilibrada e tensa (BLOOM, 1979). O grau de parasitismo é dependente da patogenicidade do parasita e da imunidade inata e adquirida do hospedeiro. O equilíbrio destas duas forças, permitindo que haja a espoliação, mas não a morte do hospedeiro e a proteção deste sem a exterminação do parasita, é a forma de parasitismo encontrada em ambientes naturalmente equilibrados.

O homem alterou totalmente esta relação de parasitismo na natureza por meio de diversas intervenções, tais como alterações drásticas no meio-ambiente e na distribuição geográfica das populações de hospedeiros e de parasitas; criação de habitats artificiais não equilibrados; propagação da idéia antropocêntrica de que o parasitismo é patológico e seu maior favorecimento para o desenvolvimento de amostras resistentes a acaricidas devido ao controle negligente das infestações.

Segundo Tatchell (1987), populações seriamente infestadas só são possíveis sob interferência humana. Destarte, um ambiente que foi alterado por mãos humanas necessitará, inexoravelmente, da intervenção do homem para poder, pelo menos, aproximar-se do quadro de equilíbrio na relação hospedeiro-parasita.

As condições de parasitismo do *B. microplus* na pecuária da América Latina, assim como de outras regiões do planeta, são de total artificialidade, uma vez que carrapatos e bovinos ocupam "habitats" que não lhes são naturais, o que leva à inexistência de equilíbrio na relação hospedeiro-parasita. Assim sendo, o controle das infestações por *B. microplus* é imprescindível e totalmente dependente da ação humana. Segundo Rocha (1984), bovinos susceptíveis, como os taurinos, não sobrevivem se não houver controle da infestação por *B. microplus*.

O combate ao carrapato-do-boi deve se basear na aplicação de métodos racionais de controle visando um baixo nível de parasitismo, indispensável à premunição contra os agentes da TPB, mas não prejudicial à saúde do hospedeiro

(MORELLI JÚNIOR., 2000). Atualmente, o seu controle, que na maioria dos casos é feito com acaricidas químicos, tem se complicado em função do aumento na frequência do surgimento de amostras resistentes aos princípios ativos utilizados (MURAKAMI & SILVA, 1997; OLIVEIRA & FREITAS, 1998; SOARES et al., 2001). Essa situação, aliada à preocupação com a proteção ambiental e à eterna busca de uma relação custo/benefício mais favorável, propiciou o crescimento do interesse pelos controles estratégicos e pelos métodos de controle alternativos.

4. Seleção de raças resistentes.

A utilização da resistência do bovino como controle da infestação por carrapatos, tem como base a seleção de raças comprovadamente resistentes, o cruzamento entre raças resistentes e raças susceptíveis, porém de alta produção e/ou animais mais resistentes dentro da mesma raça. A resistência do hospedeiro é expressa basicamente pelo aumento da mortalidade de diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato, principalmente das larvas nas suas primeiras 24 horas de vida parasitária (MORAES, 1988).

De forma geral, raças zebuínas são mais resistentes em comparação às raças taurinas, uma vez que o *Bos indicus* é o hospedeiro natural do *B. microplus*. Em 1941, Villares já demonstrara a fundamentação genética da maior resistência do *Bos indicus* em relação ao *Bos taurus*, e comprovou que dentro de cada uma destas espécies, há raças mais resistentes que outras e ainda dentro de cada raça há indivíduos mais resistentes ou mais susceptíveis que a média da raça.

Zebuínos e taurinos tendem a ter a mesma susceptibilidade na primo-infestação por *B. microplus*, não havendo diferenças qualitativas entre seus mecanismos de resistência (WAGLAND, 1978). Entretanto há uma redução na proporção de larvas que atingem a maturidade à medida que aumenta a taxa de infestação mais rápida em zebuínos (SUTHERST et al., 1973). Isto demonstra a grande importância da imunidade adquirida nos mecanismos de resistência.

Quando se introduz o *Bos taurus* em áreas enzoóticas para este ixodídeo, geralmente desenvolve-se nos bovinos um problema agudo em função da sua incapacidade para controlar o número de parasitas (GOMES, 1998).

Diversos trabalhos demonstram a maior resistência de animais zebuínos em comparação aos taurinos, como os de Villares (1941), Riek (1962), Francis & Little (1964), Johnston & Haydock (1969), Utech et al. (1978), Seifert (1984), Rocha (1984) e Sartor (1992), dentre outros.

Em relação à comparação entre raças da mesma espécie, Villares (1941) e Rocha (1984) observaram que a raça Nelore se destaca entre os zebuínos brasileiros. Nagar et al. (1978) demonstraram que, na Índia, a raça Haryana é mais resistente que a Sahival. Rocha (1984) observou que raças taurinas adaptadas ao Brasil, como a Caracu e Mocha Nacional, foram mais resistentes que raças taurinas de importação recente. Entre as raças européias, a Jersey mostrou-se a mais resistente (RIEK, 1956; UTECH et al., 1978).

A utilização de cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus* demonstrou fornecer bom grau de resistência aos mestiços. Estudos comprovam que, em geral, animais mestiços zebu x europeu apresentam, assim como zebuínos puros, um número significativamente menor de carrapatos em relação aos europeus puros (RIEK, 1962; FRANCIS & LITTLE, 1964; JOHNSTON & HAYDOCK, 1969).

Na Austrália, zebuínos vêm sendo utilizados intensamente em cruzamentos com raças européias, sendo que os animais oriundos do cruzamento apresentam, de modo geral, resistência de moderada a alta (BYFORD et al., 1976; UTECH et al., 1978).

No Brasil, Teodoro et al. (1984), estudando a resistência de touros mestiços (europeu x zebu), observaram maior proporção de animais resistentes entre os 5/8, seguidos dos 3/4, com os 7/8 apresentando menor resistência. Da mesma forma, Lemos et al. (1985) estudando a resistência em animais mestiços variando de ¼ Holandês x zebu a Holandês PC, demonstraram que, à medida que se aumenta o grau de mestiçagem de gado zebu, aumenta também a infestação por carrapatos.

A utilização de cruzamentos visando à combinação de características de resistência ao carrapato e tolerância ao calor do *Bos indicus*, com a alta produtividade leiteira e fertilidade do *Bos taurus* é sugerida por Rendel (1971).

Assim como a produção leiteira e o ganho de peso, o potencial do hospedeiro em adquirir resistência ao carrapato é hereditário (WHARTON et al., 1970; ROBERTS, 1971) e, em raças tropicais, a resistência pode ser elevada a altos níveis por meio de seleção (FRISCH, 1999).

O convívio de milhares de anos entre carrapato e gado zebuino, segundo Lemos (1986), promoveu uma eliminação natural dos animais mais sensíveis, permitindo assim, maiores oportunidades reprodutivas para os animais geneticamente resistentes. A seleção natural de zebus pelo parasitismo do carrapato promoveu, provavelmente, acúmulo de grande quantidade de genes de pequenos efeitos, o que é característico de herança poligênica (quantitativa).

Segundo Martinez et al. (2004), este tipo de resistência poligênica promove resposta rápida e efetiva à seleção em raças de moderada a alta resistência, mas não em raças susceptíveis. Hewetson (1968), Wharton et al. (1970), Teodoro et al. (1984) e Madalena et al. (1985) obtiveram estimativas de herdabilidade variando de 20 a 49% em zebuínos e mestiços, enquanto Veríssimo et al. (1997) observaram baixas estimativas de herdabilidade (0,89 a 0,91%) em mestiços leiteiros.

A seleção de animais de raças susceptíveis com base na resistência poligênica não é viável, sendo necessário então a exploração de genes de efeito maior que possam estar associados à resistência aos carrapatos (MARTINEZ et al., 2004). Estes genes de efeito maior ocorrem em taurinos Belmont Adaptaur (raça sintética criada a partir do cruzamento de Hereford e Shorthorn) e em condições genéticas apropriadas pode conferir até 100% de resistência (FRISCH, 1999). Em mais de 30 anos de trabalho, observou-se que cada cópia do gene Adaptaur no DNA dos animais reduziu seqüencialmente a contagem dos carrapatos em 75%, sendo que a freqüência deste gene na população foi de 25% (FRISCH, 1994).

5. Mecanismos de parasitismo dos ixodídeos

A introdução do aparelho bucal do carrapato na pele do hospedeiro se dá pela ação conjunta das quelíceras e de enzimas citolíticas e queratinolíticas secretadas na saliva, propiciando a penetração do hipostômio. Nas espécies de carrapatos que possuem aparelho bucal curto, como é o caso do *Boophilus microplus*, a saliva se sobressai como o componente mais importante no processo de fixação (MOORHOUSE & TATCHELL, 1966).

Após a penetração nos tecidos, ocorre o processo de solidificação da saliva no meio externo, formando uma lâmina hialina concêntrica denominada "cone de cimento", a qual tem função de fixação do ixodídeo ao hospedeiro durante o período de ingurgitamento (FONSECA, 2003).

A ação de enzimas hidrolíticas da saliva provoca necrose focal das células da derme e ruptura de capilares sangüíneos e linfáticos, formando a chamada "cavidade alimentar dermal", composta basicamente por tecido necrótico amorfo e componentes sangüíneos. Segundo Tatchell & Moorhouse (1968), larvas, ninfas e adultos possuem a mesma profundidade de penetração na pele do hospedeiro, entretanto as lesões são maiores em cada estágio como conseqüência do maior volume de saliva secretada pelo carrapato.

Os carrapatos intercalam momentos de sucção de sangue e de secreção de saliva, sendo que o maior volume de saliva é secretado no final do processo de ingurgitamento (BALASHOV, 1972).

Além das enzimas hidrolíticas, a saliva dos carrapatos contém diversas moléculas que apresentam propriedades anti-hemostáticas, vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunossupressoras (WIKEL, 1996b) as quais apresentam papel importantíssimo nos mecanismos de alimentação e evasão das respostas do hospedeiro ao parasitismo do carrapato.

As glândulas salivares secretam a apirase, substância que inibe a agregação de plaquetas pela quebra do ATP em AMP e do ADP em ortofosfato (RIBEIRO, 1989; TITUS & RIBEIRO, 1990). Segundo Ribeiro et al. (1985), a apirase previne a agregação de neutrófilos e a desgranulação dos mastócitos, o que, provavelmente, é

conseqüência da não agregação plaquetária, evento responsável pela liberação de citocinas ativadoras de neutrófilos e mastócitos.

A prostaglandina E_2 (PGE_2) produzida pelas glândulas salivares de carrapatos, também exibe funções de inibição de plaquetas e vasodilatação (CHAMPAGNE, 1994). São secretadas, na saliva de *Ixodes dammini*, prostaciclina que inibe agregação plaquetária e desgranulação mastocitária e induzem vasodilatação (RIBEIRO et al., 1988), e a cininase, capaz de quebrar a bradicinina ativada no plasma do hospedeiro e que tem papel importante na indução de dor (RIBEIRO et al, 1985).

A capacidade dos ixodídeos em modular a resposta imune do hospedeiro é assunto bastante discutido na literatura. Existe um balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a imunossupressão mediada pelos carrapatos, resultando numa diminuição na imunidade, facilitando o ingurgitamento do carrapato sem, no entanto, reduzir a capacidade de sobrevivência do hospedeiro natural (WIKEL & BERGMAN, 1997).

Segundo Wikel (1999), os mecanismos de combate do carrapato aos mecanismos de defesas inata e adquirida do hospedeiro incluem a inibição da síntese de fragmentos biologicamente ativos de moléculas do sistema complemento (anafilatoxinas do complemento – C3a e C5a); inibição da deposição de componentes do sistema complemento (C3b e C5b); redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (TNF- , IL-1, etc.); redução da produção de citocinas pelos linfócitos Th1; inibição das células NK ("natural killers"), entre outros. Mais recentemente foi descoberta, na saliva de carrapatos *R. appendiculatus*, uma proteína ligante da histamina (HBP) de alta afinidade pelos receptores de histamina no hospedeiro e que, por competição, inibe a resposta inflamatória durante o repasto sanguíneo (PAESEN et al, 1999).

Outra forma do carrapato se esquivar da resposta imunológica do hospedeiro é mudar constantemente os componentes salivares, de forma que antígenos do final do ingurgitamento sejam diferentes do início da fixação, tornando inócuos os anticorpos produzidos contra os primeiros antígenos (WIKEL, 1996a).

6. Resistência do bovino ao *B. microplus*

Uma observação mais ampla, pelo ponto de vista evolutivo, permite perceber que os mecanismos de resistência do hospedeiro não apresentam função restrita e essencial de defesa. Na verdade, representam “efeitos colaterais” de processos fisiológicos que possuem outras funções para as quais foram desenvolvidos, mas que, no processo evolutivo, tornaram-se mecanismos acidentalmente protetores, favorecendo a adaptação dos indivíduos que as possuíam.

De modo geral, a resistência aos ixodídeos possui dois aspectos básicos: os mecanismos inatos, caracterizados principalmente por agentes inespecíficos (locais ou sistêmicos) de defesa e mecanismos específicos, compostos pelas respostas imunes humoral e celular.

Os mecanismos de resistência inata são representados por características, estados e mecanismos inespecíficos de proteção apresentadas pelo hospedeiro e que têm capacidade de exercer certo controle sobre o parasita. Segundo Barriga et al. (1993), a resistência natural aos carrapatos não tem relação com a resistência adquirida.

Mecanismos comportamentais, físicos, anatômicos, bioquímicos, fisiológicos e histológicos, entre outros, estão envolvidos com a resistência inata.

Características de espécies, raças e mesmo individuais podem participar da resistência inata. Idade, sexo, quadro hormonal, estado nutricional e o ambiente influenciam tanto a imunidade natural como a adquirida (JONES et al, 2000).

Certos elementos da imunidade adquirida podem ser responsáveis por diferenças individuais de resistência, mas na maioria dos casos acredita-se que estas diferenças sejam geneticamente determinadas.

Estudos demonstram que a idade do hospedeiro pode interferir na sua susceptibilidade ao carrapato. Em experimento de campo, Sahibi et al. (1997) observaram que a susceptibilidade parece aumentar com a idade do hospedeiro, embora o fator raça tenha exercido muito mais influência do que a idade.

Utech et al. (1978) observaram que vacas gestantes eram significativamente menos resistentes que vacas não-gestantes, assim como vacas em lactação

mostraram-se menos resistentes que vacas secas, sugerindo que gestação e lactação podem interferir na resistência aos ixodídeos. Segundo Jonsson et al. (2000), a seleção de animais mais resistentes aos carrapatos pode ser empregada sem se comprometer a produção leiteira.

O comprimento do pêlo de bovinos parece interferir no grau de infestação por carrapatos. Foi demonstrado que em regiões tosquiadas do pescoço fixaram-se menos carrapatos que em regiões com o pêlo longo no mesmo animal, tanto em taurinos quanto em zebuínos (O'KELLY & SPIERS, 1983). Por outro lado, Spickett et al. (1989) encontraram correlação positiva entre comprimento do pêlo e número de carrapatos, quando da comparação entre raças européias e raças nativas africanas; da mesma forma Veríssimo et al. (1996) observaram a mesma correlação entre zebuínos (Gir) e mestiços (Gir x Holandês). Fraga et al. (2003) observaram em fêmeas da raça caracu que houve tendência de aumento na contagem de carrapatos com o aumento da espessura do pelame.

De acordo com Bonsma & Pretorius (1943), maior espessura do pelame pode estabelecer microclima favorável ao parasita, contribuindo para sua permanência e sobrevivência no hospedeiro. Além disso, essa característica dificulta a prática da auto-limpeza realizada pelo animal.

Oliveira & Alencar (1987) verificaram em bovinos da raça Canchim, que os animais mais claros (brancos) eram mais resistentes ao carrapato do que os mais escuros (amarelos e vermelhos). Os resultados de Veríssimo et al. (1997), em bovinos mestiços leiteiros, sugerem relação entre maior número de carrapatos e cor de pelame escura. Em um rebanho de bovinos da raça Gir, Andrade et al. (1998) verificaram que animais de colorações mais claras como branco, chita e chita claro apresentaram as menores médias de infestação. Segundo esses autores, a maior suscetibilidade ao carrapato dos animais de colorações mais escuras, provavelmente, pode ser provocada pela queda do nível de resistência dos animais mais escuros, em virtude do maior estresse calórico a que estão sujeitos. Entretanto, Fraga et al. (2003) não observaram diferenças com relação à cor dos animais.

Roberts (1968), em estudo de fragmentos aleatórios de pele de bovinos resistentes ao *B. microplus*, sugeriu a relação entre grau de resistência e número de anastomoses arteriovenosas (AAV) da pele de bovinos. Schleger et al. (1981) demonstraram que animais altamente resistentes têm número de AAV bem maior que animais de baixa resistência. Não há diferenças morfológicas entre a AAV de animais de alta e de baixa resistência, assim como entre animais “naive” e expostos à infestação, entretanto, os resultados sugerem que o padrão de AAV pode ser estabelecido antes da exposição prévia ao carrapato, até mesmo no período perinatal, ou ainda que o número de AAV em animais resistentes aumenta com o desafio por carrapatos. No mesmo sentido, Hales et al. (1981) observaram que o fluxo capilar era maior em animais mais resistentes, suscitando relação entre rejeição às larvas de carrapatos e hiperemia cutânea induzida pelos parasitas.

Dados obtidos por De Castro et al. (1991) sugerem que animais de pele mais delgada carregam menor carga de carrapatos. Em contrapartida, Spickett et al. (1989) não conseguiram correlacionar resistência à espessura da pele.

Além da barreira física da pele, pêlos, glândulas sebáceas, entre outros, os neutrófilos e macrófagos são importantes elementos celulares na imunidade inata, por serem capazes de fagocitar e degradar enzimaticamente uma ampla variedade de microrganismos e antígenos em hospedeiros não-imunes. Entretanto, a fagocitose por estas células fica muito reforçada se o antígeno estiver revestido (opsonizado) por anticorpos e complemento (JONES et al., 2000), os quais somente são produzidos durante a resposta imune adquirida.

Os mecanismos específicos de defesa constituem uma segunda linha de proteção, quando os parasitas ultrapassaram mecanismos locais e inespecíficos de defesa. A resistência adquirida apresenta-se basicamente por uma resposta imune a qual conta com mecanismos de defesa humorais e celulares.

Durante o processo de parasitismo, o carrapato inocula toxinas e metabólitos que induzem respostas imunológicas celulares e humorais do hospedeiro (OBEREM, 1984; KANAKLATA et al., 1986). O repasto sangüíneo do carrapato induz mecanismos

imunorregulatórios e efetores do hospedeiro envolvendo anticorpos, complemento, citocinas, células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos (WIKEL, 1996a).

A resistência imunologicamente adquirida pelo hospedeiro pode resultar em diminuição no volume de sangue ingerido, diminuição no peso de ingurgitamento e na produção e na viabilidade dos ovos, aumento no período de alimentação, inibição da fixação e morte das fêmeas ingurgitadas (WIKEL, 1996a). Koudstaal et al., em 1978, sugeriram que a remoção mecânica pela lambedura desencadeada por mecanismos de hipersensibilidade também tem importância na diminuição da infestação de larvas de *B. microplus* em taurinos. Os autores observaram que somente animais de alta resistência apresentaram aumento no número e no tempo de lambedura nos sítios de fixação, sendo que na maioria destes animais a diminuição no número de larvas foi maior que 30%.

Resistência adquirida tem sido mais observada nas infestações por fêmeas, no entanto, os machos também induzem resistência adquirida, embora esta seja mais discreta do que a observada em fêmeas isoladamente ou associada aos machos (RECHAV et al., 1991).

7. Mecanismos celulares envolvidos na resistência a carrapatos

De modo geral, existem dois mecanismos principais na resistência adquirida a carrapatos: a reação de hipersensibilidade imediata, mediada por anticorpos e a reação de hipersensibilidade tardia, mediada por células.

Têm-se sugerido que a resposta a infestações parasitárias, no que diz respeito à resistência ou susceptibilidade, envolve subgrupos de células T helper (Th) CD4⁺ (SHER & COFFMAN, 1992).

De modo geral, células Th1 levam à ativação de macrófagos e têm sido associadas à reação de hipersensibilidade tardia. Células Th2 aumentam o número de mastócitos e eosinófilos e induzem aumento na síntese de anticorpos (FERREIRA & SILVA, 1999). Além disso, os produtos de células Th1 e Th2 podem negativamente regular a produção e/ou atividade umas das outras (MOSSMAN & MOORE, 1991).

Segundo Wikel & Bergman (1997), células Th1 são mediadoras da reação de hipersensibilidade Tipo IV que levam à hipersensibilidade basofílica cutânea, que caracteriza a resistência adquirida. A expressão da resistência adquirida envolve componentes da hipersensibilidade tardia (mediada por células Th1) e anticorpos circulantes das classes IgM e IgG (MORELLI JÚNIOR., 2000).

Embora o mecanismo pelo qual a IgE participa da resistência do hospedeiro não esteja esclarecido, há diversas evidências de que mecanismos de desgranulação de basófilos ou mastócitos dependentes de IgE (e de IgG₁ nas cobaias) ocorrem durante reações imunes associadas à resistência a infestações com parasitas cutâneos e intestinais (ASKENASE, 1980).

Uma das primeiras demonstrações da resposta imune celular ao parasitismo por carrapatos foi descrita por Trager em 1939, que observou resposta mínima cutânea de cobaias a uma primo-infestação por *Dermacentor variabilis*. Já em cobaias sensibilizadas, a reação cutânea se caracterizava por hiperplasia cutânea, edema e grande infiltrado de granulócitos. Posteriormente, Allen (1973) descreveu a reação cutânea de cobaias aos carrapatos como sendo composta basicamente de basófilos e eosinófilos.

Em revisão sobre a imunologia na interação entre carrapatos e animais de laboratório, Allen (1989) destacou a resposta cutânea em cobaias como reação basofílica e, em menor grau eosinofílica. Já em coelhos, basófilos e mastócitos parecem ser mais numerosos em animais pré-sensibilizados, além da presença numerosa de eosinófilos. Com relação aos camundongos, Allen cita o trabalho de Riek (1959) que relatou o infiltrado dérmico com leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, sendo que poucos destes eram eosinófilos.

Brown et al. (1982), utilizando cobaias pré-sensibilizadas ao *Amblyomma americanum* e tratadas com soro de coelho anti-basófilos (ABS) e soro de coelho anti-eosinófilos (AES), observaram que o ABS aboliu totalmente a imunidade dos hospedeiros, fazendo com que estes apresentassem taxas de parasitismo e peso das fêmeas ingurgitadas semelhantes às observadas nos animais "naive". Além disso, foram observadas a quase ausência de basófilos e diminuição significativa de

eosinófilos - provavelmente como efeito secundário à diminuição de basófilos e, conseqüentemente, dos fatores quimiotáticos para eosinófilos - no sítio de fixação dos carrapatos nos animais que receberam ABS. Demonstrou-se, assim, o papel fundamental dos basófilos no mecanismo de resistência das cobaias a carrapatos.

Em 1999, Szabó & Bechara avaliaram a migração celular em resposta às infestações primárias e terciárias por *R. sanguineus* em hospedeiros naturais e susceptíveis (cães) e hospedeiros não-naturais e resistentes (cobaias). A contagem diferencial celular no sítio de fixação dos carrapatos demonstrou diferenças significantes entre os dois hospedeiros. Cães reagiram, principalmente com neutrófilos, especialmente no final do período de alimentação, e também com mononucleares e mastócitos, já as cobaias apresentaram reação predominantemente basofílica e eosinofílica.

Gill & Walker (1985) avaliaram a resposta celular de coelhos em infestações primárias e terciárias por *Hyalomma anatolicum anatolicum* e observaram que, 24 horas após a infestação primária, o infiltrado inflamatório compunha-se de 62% de neutrófilos, 22% de células mononucleares, 10% de eosinófilos e 3% de basófilos e mastócitos. Nas avaliações posteriores (72 e 144 horas pós-infestação) observou-se constante influxo de mononucleares e neutrófilos, diminuição no infiltrado eosinofílico (5% às 144 horas) e aumento no valor absoluto de basófilos, em contraste com a manutenção na contagem de mastócitos.

Já nas infestações terciárias, ficou evidente a resposta celular muito mais acentuada com relação aos granulócitos, principalmente o aumento nas porcentagens de basófilos (4, 8 e 9% às 24, 72 e 144 horas pós-infestação, respectivamente) e eosinófilos (21, 18 e 9% às 24, 72 e 144 horas pós-infestação, respectivamente). Interessante observar que a diminuição na porcentagem de eosinófilos repetiu o observado nas infestações primárias.

Den Hollander & Allen (1985) observaram que na terceira e quarta infestação em camundongos Balb/c, o infiltrado celular no sítio de fixação de carrapatos *Dermacentor variabilis* era composto principalmente por mastócitos e eosinófilos e pouco ou nenhum basófilo.

Utilizando camundongos WBB6F₁-+/+ (não-deficientes de mastócitos) infestados por larvas de *Haemaphysalis longicornis*, Ushio et al. (1993) observaram que, na primo-infestação, pequeno número de mastócitos desgranulados estavam presentes no sítio de fixação até seis dias pós-infestação e em seguida, aos 14 dias, o número de mastócitos dobrou no mesmo local, assim como o nível de IgE sérico e IgE ligados aos mastócitos. Na primeira infestação observou-se eosinofilia acentuada já no dia 2 pós-infestação, alcançando pico no dia 6. A migração de eosinófilos no sítio de fixação também foi constatada, sendo que no dia 20 pós-infestação os valores chegaram a sextuplicar.

Schleger et al. (1976) avaliaram a resposta celular imediata (até 5 horas pós-fixação) de taurinos à infestação por larvas de *B. microplus*, utilizando-se animais não pré-sensibilizados, animais resistentes e animais susceptíveis. Em animais previamente imunizados houve redução no número de mastócitos próximos ao sítio de fixação. Diferenças significativas foram observadas entre animais resistentes e susceptíveis e entre áreas mais acometidas e menos acometidas por carrapatos. Em animais sem contato prévio não foram observados eosinófilos na lesão, embora a fixação fosse de longa duração. Por outro lado, em animais de baixa resistência observaram-se poucos eosinófilos infiltrados no tecido e grande número presente no meio intravascular na 3^a hora pós-fixação; nos animais altamente resistentes eosinófilos predominavam o infiltrado celular inflamatório. O grau de desgranulação eosinofílica foi significativamente maior nos animais de alta resistência. Basófilos foram observados ocasionalmente, mas em números insignificantes em todos os animais.

Em 1977, Allen et al., investigando a histologia da resposta de bovinos à infestação por fêmeas de *Ixodes holocyclus*, observaram marcante infiltrado basofílico logo no início da resposta em animais pré-sensibilizados.

Brown et al. (1984) avaliaram a resistência de bezerros puros holandeses ao *Amblyomma americanum* e observaram que, em animais não sensibilizados (naive), a resposta celular cutânea inicial consistia basicamente em infiltrado de mononucleares até 24 horas pós-infestação, quando apareciam os granulócitos. Após 48 horas, os basófilos representavam a maior porcentagem de granulócitos no sítio de fixação

(19%). Em infestações secundárias e terciárias, esta porcentagem variava entre 12 a 16% e 16 a 34%, respectivamente. Neutrófilos e eosinófilos foram mais abundantes nas infestações secundárias (22 a 33% e 3 a 13%, respectivamente) do que nas terciárias. Já os mastócitos responderam por menos de 10% do infiltrado na segunda e terceira infestações.

Resultados semelhantes foram observados por Gill em 1986, na avaliação da resposta imune de bovinos ao *H. anatolicum anatolicum* em infestações primárias e terciárias. Os infiltrados celulares das infestações primárias eram dominados por neutrófilos (43 a 71%), mononucleares (25 a 35%) e poucos basófilos e eosinófilos observados somente a partir de 72 horas pós-infestação. Por sua vez, o infiltrado cutâneo das infestações terciárias era caracterizado por infiltração de basófilos (6%) e eosinófilos (3%) e marcada desgranulação de mastócitos e basófilos.

8. Aspectos morfofuncionais de eosinófilos

Os eosinófilos, assim como basófilos e neutrófilos, são granulócitos derivados de células-tronco pluripotentes (CD 34⁺) da medula óssea (COSTA et al, 1997; ROTHENBERG, 1998). Tais células pluripotentes diferenciam-se primeiramente em precursores híbridos com propriedades de basófilos e eosinófilos e, posteriormente, numa linhagem separada de eosinófilos (BOYCE et al., 1995).

Embora os eosinófilos se desenvolvam na medula óssea, residem em grande número nos tecidos periféricos, sendo mais abundantes em tecidos com mucosas que tenham contato com o meio externo, incluindo-se os tratos respiratório, gastrintestinal e geniturinário.

A denominação dos eosinófilos é baseada na estreita afinidade de seus grânulos citoplasmáticos por corantes ácidos, como a eosina. As dimensões dos eosinófilos são semelhantes às dos neutrófilos, entretanto apresentam núcleo bilobulado, além de grânulos citoplasmáticos característicos (WELLER & DVORAK, 1994). Estes grânulos são numerosos, têm matriz cristalóide e em algumas espécies são preenchidos por um grupo de quatro proteínas catiônicas, as quais conferem a característica eosinofílica da

célula; dentre elas está a proteína básica principal (MBP) que corresponde a mais de 50% do conteúdo da matriz cristalina do grânulo. Além da MBP, ainda encontram-se proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) (SCEPEK et al., 1994; COSTA et al., 1997).

As atividades antiparasitárias da MBP têm sido demonstradas pela observação da presença da proteína após a adesão de eosinófilos na superfície de larvas de *Schistosoma mansoni* e de microfilárias de *Oncocerca volvulus*, *Brugia pahangi* e *B. malayi* (SCEPEK et al., 1994), entretanto sua ação enzimática ainda não está totalmente esclarecida. Além disso, foi demonstrado que os componentes dos grânulos principais são citotóxicos, sendo responsabilizados pela lesão da mucosa respiratória na asma brônquica (SCEPEK et al., 1994) e atuam também nas células tumorais (GLEICH et al., 1993). Além dos grânulos primários, ainda existem grânulos menores que contêm arilsulfatase e outras enzimas (COSTA et al., 1997).

Os eosinófilos expressam receptores para IgA, IgG e IgE (CAPRON et al., 1995) e para componentes do sistema complemento, como C1q, C3b/C4b, iC3b e C5a (COSTA et al., 1997).

A migração de eosinófilos entre os tecidos é iniciada pela ação de moléculas quimiotáticas locais. Várias substâncias quimiotáticas atuam nos eosinófilos, incluindo derivados de ácido araquidônico, como o leucotrieno B₄ (LTB₄), outros lipídeos mediadores como o fator ativador de plaquetas (PAF), produtos bacterianos, interleucinas e diversas quimiocinas, entre as quais destacam-se as eotaxinas 1 e 2 por serem relativamente específicas para eosinófilos (ROTHENBERG, 1998).

9. Aspectos morfofuncionais de basófilos

Os basófilos recebem este nome devido à afinidade de seus grânulos citoplasmáticos por certos corantes básicos (WEDEMEYER & GALLI, 2000). Como os demais granulócitos, os basófilos possuem origem hematopoiética, sendo derivados de células pluripotentes CD34⁺ (COSTA et al., 1997) e, normalmente, sofrem maturação na medula óssea e no sangue circulante periférico, de onde podem ser recrutados para

dentro dos tecidos (GALLI, 2000). Estes granulócitos podem infiltrar focos de processos inflamatórios ou imunológicos, freqüentemente acompanhados pelos eosinófilos, e podem também participar da reação a alguns tipos de tumores (COSTA et al., 1997).

Basófilos são os granulócitos menos numerosos na circulação sangüínea, representando 0,5% dos leucócitos circulantes no homem (GALLI & LANTZ, 1999), 0 a 2% nos bovinos, no máximo 3% em eqüinos e raros nos pequenos animais (FELDMAN et al., 2000). Entretanto, seu número pode aumentar em até 500% em hospedeiros parasitados por carrapatos (GORDON & ALLEN, 1979; BROWN & ASKENASE, 1982).

Os grânulos basofílicos provêm inconfundível identificação nas lâminas de medula óssea e sangue coradas com Wright-Giemsa ou May-Grünwald e Giemsa e, sob condições fisiológicas, possuem meia-vida curta, de apenas alguns dias (WEDEMEYER & GALLI, 2000). O basófilo chega ao tecido em poucas horas após a agressão, aumentando aproximadamente em 80% a densidade celular no sítio de fixação do carrapato (BROWN, 1988b).

Histamina, proteases e sulfato de condroitina - que, provavelmente, contribui para a armazenagem de histamina e proteases - estão entre os mediadores pré-formados e armazenados nos grânulos basofílicos (GALLI & LANTZ, 1999).

Quando ocorre a agregação de IgE ligada ao antígeno com receptores Fc, induz-se desgranulação e liberação extracelular de mediadores pré-formados, além da síntese e liberação de leucotrieno C₄ (GALLI, 2000). Vários trabalhos têm demonstrado que basófilos humanos podem liberar quantidades razoáveis de IL-4 e IL-13 em resposta à ativação pelos receptores Fc (BRUNNER et al., 1993; MacGlashan et al., 1994 citados por GALLI, 2000), que poderia desempenhar papel no aumento da produção de IgE ou na orientação da diferenciação Th2 (GALLI, 2000).

10. Aspectos morfofuncionais de mastócitos

Os mastócitos foram descobertos por F. Von Recklinghausen em 1863 e nomeados por Paul Ehrlich no final dos anos de 1870 como "mästzellen" (do alemão mastig = bem alimentado) em referência aos grânulos citoplasmáticos característicos (EHRlich, 1877 citado por OLSSON, 2003).

Além do bem conhecido papel efetor do mastócito no sistema imune, tem-se lhe atribuído outras funções como remodelação de tecido lesado, reparação de feridas, angiogênese, resposta de hospedeiros aos parasitas e desordens inflamatórias agudas e crônicas (BENOIST & MATHIS, 2002, GALLI et al., 2002, Marshall et al., 2003). Estas células têm vida longa se comparado às outras células sanguíneas e podem, provavelmente, viver no tecido por vários meses (OLSSON, 2003).

Os mastócitos distribuem-se por tecidos conectivos normais, onde permanecem geralmente adjacentes aos vasos sanguíneos e linfáticos, próximos ou mesmo juntos aos nervos periféricos e sob superfícies epiteliais expostas ao meio externo, como dos tratos respiratório, digestório, urogenital e tegumentar (GALLI, 1993). Foram descritos em humanos dois subtipos de mastócitos: o MC_T (mastócito que contém triptase), predominantemente encontrado em tecido pulmonar e mucosa intestinal, e o MC_{TC} (mastócitos que contém triptase e quimase) normalmente encontrado na pele e na submucosa intestinal (IRANI et al., 1986, NILSSON & SCHWARTZ, 1995).

Diversos estudos indicam que muitos aspectos do desenvolvimento e sobrevivência dos mastócitos são regulados pelo “Stem Cell Factor” (SCF), (WEDEMEYER & GALLI, 2000).

Assim como outros granulócitos, os mastócitos são derivados de células pluripotentes CD34⁺. Quando suas células progenitoras penetram o tecido, sofrem maturação sob influência principalmente do SCF, o qual, além de orientar a diferenciação, regula também crescimento, sobrevivência, migração, adesão e desgranulação de mastócitos (GALLI et al., 1994; NILSSON et al., 1999).

Os mastócitos possuem receptores de alta afinidade à IgE em sua superfície, e a atividade imunológica dos mastócitos é mediada por meio destes receptores de IgE (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984).

Quando ativados, os mastócitos liberam seus grânulos citoplasmáticos, os quais contêm diversos mediadores inflamatórios. Estes mediadores pré-formados rapidamente induzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A ativação dos mastócitos e a subsequente exocitose dos grânulos é seguido pela produção e

secreção de citocinas e outros fatores que induzem infiltração de leucócitos e inflamação local (SUNDSTRÖM, 2001).

A liberação de mediadores da inflamação estocados nos grânulos dos mastócitos pode levar à destruição local de tecidos por proteases, alterações vasculares por liberação de histamina e por recrutamento de eosinófilos e plaquetas (BUZETTI, 2001). Tal desgranulação resulta não somente em reações de hipersensibilidade mediada por IgE, como também por agentes farmacológicos, estímulos físicos e neurais ou fatores derivados de linfócitos T (CASTRO & ARNTZEN, 1993 citados por BUZETTI, 2001).

Embora mastócitos e basófilos compartilhem várias funções importantes, estas são células distintas. Antigamente, acreditava-se que basófilos eram precursores dos mastócitos ou que mastócitos eram "basófilos teciduais", no entanto vários trabalhos demonstraram que basófilos são granulócitos que sofreram maturação na corrente circulatória e que podem infiltrar tecidos em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios. Por sua vez, mastócitos maduros não são encontrados no sangue circulante e sua maturação ocorre nos tecidos vascularizados onde residem (COSTA et al., 1997).

Tanto mastócitos quanto basófilos contêm grânulos citoplasmáticos que apresentam propriedades distintas de metacromasia quando tingidos com corantes básicos. Ambos os tipos celulares, derivados de células progenitoras e precursoras presentes na medula óssea, são as principais fontes de histamina e outros potentes mediadores químicos implicados em uma grande variedade de processos inflamatórios e imunológicos (VALENT & BETTELHEIM, 1990; COSTA & GALLI, 1996 citados por COSTA et al., 1997).

A extensão das similaridades bioquímicas e funcionais entre mastócitos e basófilos continua a ser explorada. Segundo Wedemeyer & Galli (2000), há achados que, vistos conjuntamente, são consistentes com a hipótese de que mastócitos e basófilos possuem funções que se sobrepõem ou são complementares durante a aquisição da resposta imune, associada à IgE, a certos parasitas.

Matsuda et al. (1990) demonstraram que, embora camundongos deficientes de mastócitos (WBB6F₁-W/W^v) não manifestassem resistência contra carrapatos *Haemaphysalis longicornis*, os títulos de IgE aumentaram mais de 100 vezes após a segunda infestação. A transferência de soro destes camundongos para outros WBB6F₁-W/W^v que receberam injeções intracutâneas de cultura de mastócitos demonstrou sinais de hipersensibilidade imediata.

Por outro lado, Steeves & Allen (1991) observaram que, tanto em camundongos mastócito-deficientes W/W^v quanto em camundongos normais (+/+), os números de eosinófilos e neutrófilos aumentaram significativamente durante infestações secundárias e terciárias por *Dermacentor variabilis*. Além disso, a resistência (medida pela diminuição no peso de larvas ingurgitadas em cada infestação) foi adquirida pelas duas linhagens de camundongos.

Muitos estudos têm apontado para o papel dos mastócitos tanto na imunidade inata quanto na resposta adquirida. O papel essencial destas células na imunidade inata foi demonstrado por Echtenacher et al. (1996), quando demonstraram que camundongos mastócitos-deficientes foram menos eficientes do que camundongos normais na eliminação e sobrevivência sob infecções bacterianas. Por outro lado é evidente também o papel dos mastócitos como iniciador da resposta imune adquirida, pela expressão de diversos receptores MHC-II, ICAM-1, ICAM-3, CD43, entre outros, interagindo diretamente com linfócitos T e B e células endoteliais (OLSSON, 2003).

Em função dos expostos, o presente trabalho procura acrescentar novos dados a respeito do possível papel dos mastócitos nos mecanismos de resistência de bovinos ao *B. microplus*, principalmente com relação ao ambiente cutâneo proporcionado pelos mastócitos e que é encontrado pelo carrapato e a relação dos mastócitos com o infiltrado inflamatório no sítio de fixação.

II. OBJETIVOS

1. Geral

Verificar a existência de possível correlação do número de mastócitos dérmicos com o grau de resistência ou susceptibilidade a carrapatos *B. microplus* em bovinos mestiços F₂ Holandês x Gir antes e após infestação artificial.

2. Específicos

- 2.1. Caracterizar histopatologicamente a reação de fixação de carrapatos *B. microplus* na pele de bovinos mestiços F₂ Holandês x Gir após infestação artificial;
- 2.2. Avaliar o grau de resistência a carrapatos *B. microplus* em bovinos mestiços F₂ Holandês x Gir, antes e após infestação artificial, por meio da análise da correlação entre o número de mastócitos dérmicos e contagem de carrapatos;
- 2.3. Correlacionar contagem de carrapatos e número de mastócitos dérmicos com a idade em bovinos mestiços F₂ Holandês x Gir antes e após infestação artificial;
- 2.4. Comparar o número de mastócitos em pele não inflamada de animais Gir puros (F₀), F₁ e F₂ Holandês x; Gir

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Hospedeiros

A população experimental que foi utilizada no presente projeto é pertencente à Embrapa Gado de Leite (CNPGL) situada em Juiz de Fora-MG.

Bovinos mestiços Holandês HPB x Gir, pertencentes a uma geração F_2 composta por 148 animais, foi utilizada para avaliação da resposta celular ao *B. microplus* por meio de infestações artificiais com larvas infectantes e contagem de fêmeas adultas.

Para se obter a geração F_2 estudada, foram utilizadas 20 fêmeas Gir, caracterizadas como geração F_0 , em trabalho de superovulação e transferência de embriões (T. E.) que receberam sêmen de quatro touros da raça Holandesa, não pertencentes ao CNPGL. Dos produtos destas inseminações artificiais foram selecionados quatro touros e 44 fêmeas desta geração F_1 para se formar quatro famílias de geração F_2 , evitando-se o parentesco entre o reprodutor e as fêmeas a ele designadas, obtendo-se os 148 animais F_2 .

Os bovinos F_2 foram distribuídos em sete grupos de acordo com a data que receberam a infestação artificial de carrapatos e mantidos em piquetes de capim-estrela (*Cynodon nlemfuensis*) com, no máximo, 25 animais por piquete.

Os animais da geração F_2 não receberam tratamento carrapaticida antes da infestação artificial, uma vez que apresentavam, em sua grande maioria, infestações baixas o suficiente para não interferirem na infestação artificial. Como não houve controle das infestações naturais por carrapatos antes da realização do experimento, todos animais F_2 foram considerados pré-sensibilizados naturalmente por *B. microplus*.

Embora os animais pertencentes às gerações F_0 e F_1 não tenham recebido infestações artificiais por *B. microplus*, algumas amostras de pele destas gerações foram colhidas para serem comparadas entre si e com as amostras da geração F_2 .

2. Parasitas

Os animais F₂ receberam infestações artificiais com larvas de carrapato *Boophilus microplus*, pertencentes à cepa POA, originária do Rio Grande do Sul, mantida pelo Laboratório de parasitologia do CNPGL.

As larvas de *B. microplus* para a infestação artificial foram preparadas em laboratório no CNPGL incubando-se 0,5g de ovos em dispositivos adaptados com seringas plásticas descartáveis (aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas por seringa).

3. Infestação artificial

As infestações artificiais foram realizadas entre sete e dez dias após eclosão das larvas incubadas em estufa tipo BOD.

Para a infestação artificial foi aplicado um dispositivo por animal da geração F₂, contendo larvas de *B. microplus* infectantes, distribuindo-se as larvas ao longo da região cervical dos bovinos, de modo que as larvas pudessem atingir ambos os lados do corpo. Destarte, cada hospedeiro recebeu cerca de $1,0 \times 10^4$ larvas de *B. microplus*.

A distribuição dos 148 bovinos F₂, as datas de infestação artificial com larvas de *B. microplus*, datas de contagem de fêmeas ingurgitadas e a faixa etária dos grupos são mostrados na **Tabela 1**. O delineamento dos grupos foi baseado na data em que os animais receberam infestação artificial e a estação do ano.

Os animais das gerações F₀ e F₁ não foram infestados artificialmente.

Tabela 1. Número de animais, estação do ano quando do contagem de carrapatos, data de infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus*, data de contagem de carrapatos, faixa etária em dias e faixa etária em meses dos grupos de bovinos mestiços F₂ Gir x holandês. Jaboticabal, 2004.

Grupo (n)	Estação do ano/contagem	Data de infestação	Data de contagem	Faixa etária (dias)	Faixa etária em meses (média)
1 (22)	Chuvosa	16/02/2001	08/03/2001	382-456	12-15 (13,5)
4 (22)	Chuvosa	29/11/2002	19/12/2002	451-599	15-20 (17,5)
3 (11)	Chuvosa	21/12/2001	10/01/2002	408-719	13-25 (19)
2 (24)	Seca	17/05/2001	06/06/2001	371-462	12-15 (13,5)
5 (20)	Seca	10/07/2003	31/07/2003	750-831	25-27 (26)
6 (24)	Seca	10/07/2003	31/07/2003	632-762	21-25 (23)
7 (25)	Seca	10/07/2003	31/07/2003	485-630	16-21 (18,5)

4. Avaliação da carga parasitária

Para a determinação do nível de resistência de cada animal, foram realizadas avaliações absolutas pela contagem das fêmeas de carrapatos que completam seu ciclo após infestação artificial com número conhecido de larvas (aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas por animal).

As contagens realizaram-se no dia modal de queda dos carrapatos que, segundo a literatura, ocorre em torno do 21º dia pós-infestação (SEIFERT, 1984). Foram contadas as fêmeas semi-ingurgitadas, de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro presentes em um dos lados do animal. O resultado obtido era multiplicado por dois para se obter o número total de carrapatos presentes no hospedeiro.

A quantificação do número de ixodídeos foi realizada no período da manhã, até aproximadamente 11 horas, horário em que a maioria dos carrapatos se desprende dos animais.

5. Colheita de material para histopatologia

Momentos antes da infestação artificial e no mesmo dia da contagem dos ixodídeos foram colhidas biópsias da pele do pavilhão auricular interno direito de todos os animais F₂. Este local de biópsia foi escolhido devido à facilidade de imobilização da

região e pela presença da cartilagem auricular, a qual acompanhava o material colhido e era utilizada para se delimitar a derme profunda na histopatologia.

Sempre que havia carrapatos fixados na região supracitada, a biópsia era colhida na área de fixação do ixodídeo, caso contrário colhia-se material em pele íntegra. Assim sendo, foram obtidas 42 amostras pós-infestação com sítio de fixação de carrapatos.

Destas 42 amostras, apenas 22 foram utilizadas para contagem diferencial de células inflamatórias, obedecendo-se critério de seleção das amostras com base na visualização ideal do cone de cimento para identificação das zonas seguindo descrições do item 6.3 deste capítulo.

Todas as 148 amostras pós-infestação foram utilizadas para avaliação da população mastocitária dérmica, sendo que, das 42 biópsias que continham carrapato fixado, foram preparadas lâminas com cortes mais distantes do sítio de fixação. As amostras pré-infestação mostraram-se todas compostas por pele íntegra.

As colheitas foram realizadas no mesmo dia da contagem dos ixodídeos. Devido a problemas técnicos, não foram colhidas biópsias pré-infestação dos animais pertencentes ao Grupo 2.

Para comparação do número de mastócitos cutâneos entre os animais F_2 e os animais F_1 e F_0 (Gir e Holandês puros), foram colhidas biópsias de 22 animais F_1 (machos e fêmeas) e oito animais F_0 (vacas Gir) ainda presentes no plantel do CNPGL, embora não tivessem sido realizadas infestações artificiais de *B. microplus* nem tampouco contagens de ectoparasitas nestes animais. Não foi possível obter amostras dos touros holandeses F_0 uma vez que os animais não pertenciam ao CNPGL e somente seus semens foram comercializados para a inseminação artificial das vacas Gir.

Para a realização da biópsia, os animais foram imobilizados em troncos de contenção. As biópsias foram realizadas com auxílio de "punch" de 6 mm de diâmetro.

Os fragmentos de pele obtidos foram imersos em frascos contendo formalina tamponada a 10%, lacrados e encaminhados ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV / UNESP para processamento histológico e posterior estudo histopatológico.

6. Histopatologia

6.1. *processamento histológico*

As amostras foram processadas segundo histotécnica de rotina, com inclusão em parafina e secção em micrótomo em cortes de 4 µm de espessura. Foram montadas de cinco a sete secções por lâmina de cada amostra.

As 22 amostras que possuíam carrapatos fixados foram seccionadas o mais medialmente possível do aparelho bucal do ixodídeo, objetivando melhor visualização do sítio de fixação. Do mesmo material foram preparados cortes mais próximos do bordo e o mais distante possível do sítio de fixação do carrapato, visando as contagens de mastócitos.

Para cada amostra foram montadas duas lâminas, sendo que uma era corada pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e outra pela técnica de May-Grünwald & Giemsa. Os cortes corados em HE foram utilizados para observação de alterações teciduais e avaliação da morfologia geral do local de colheita. A coloração pela técnica de May-Grünwald & Giemsa foi realizada para identificação e contagem de granulócitos presentes na pele, inclusive para avaliação da população mastocitária.

6.2. *Avaliação dos aspectos histopatológicos gerais*

Os cortes corados em HE das amostras utilizadas nas contagens diferenciais de células inflamatórias no sítio de fixação dos carrapatos foram utilizados para observação de alterações teciduais e avaliação da morfologia geral do local de colheita. O mesmo procedimento foi realizado com os cortes corados em HE das amostras para avaliação da população mastocitária, tanto de colheitas antes como as pós-infestação.

6.3. *Contagem diferencial de células inflamatórias*

A avaliação da resposta celular ao parasitismo de carrapatos em seu ponto de fixação foi dada pela contagem de granulócitos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos e mastócitos) presentes nos cortes corados pelo May-Grünwald & Giemsa e que apresentavam cone de cemento visível, seguindo-se técnica descrita por SZABÓ &

BECHARA (1999) com ligeiras modificações. Para tanto, foram delimitadas quatro zonas distintas, de acordo com a distância do ponto de fixação do carrapato (**Figura 1**).

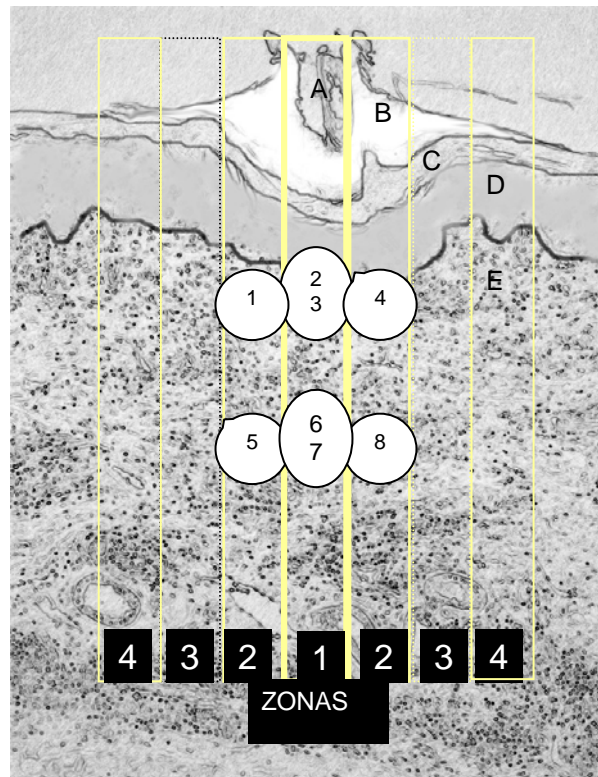


Figura 1. Fotomicrografia de sítio de fixação de carrapato contendo cone de cimento e a demarcação das zonas utilizadas para contagem diferencial de células. Os círculos representam a seqüência e a região que receberam contagens. A) Restos do aparelho bucal; B) Cone de cimento; C) Camada córnea da epiderme; D) Epiderme; E) Derme inflamada.

Apenas as zonas 1 e 2, as quais incluíam a região central do sítio de fixação, foram analisadas, utilizando-se retículo de 100 quadros integrado à ocular (Nikon 10x/20) e objetiva 100x.

A área foi delimitada pelo retículo em $0,001 \text{ mm}^2$ por meio de régua micrométrica; a contagem foi realizada em duas áreas na zona 1 e duas áreas na zona 2 na derme superficial, logo abaixo da lâmina basal da epiderme, e duas áreas nas zonas 1 e 2 a 1 mm de profundidade na derme, totalizando-se oito áreas contadas.

6.4. Avaliação da população mastocitária em derme não-inflamada

As contagens de mastócitos em pele não-inflamada foram realizadas na derme superficial, logo abaixo da lâmina basal da epiderme, e na derme profunda, próxima à cartilagem auricular, em cinco áreas de cada região escolhidas ao acaso.

Para a realização das contagens, foi utilizado microscópio de luz empregando-se retículo de 100 quadros integrado à ocular (Nikon 10x/20) e objetiva 40x. A área foi delimitada pelo retículo em $0,0625 \text{ mm}^2$ por meio de régua micrométrica.

7. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software SAS[®] (1999-2001). Com base nos dados obtidos, foram realizadas as seguintes análises estatísticas:

7.1. Contagens de carrapatos

A análise do grau de infestação dos bovinos F₂ foi realizada com todos os 148 animais, sem distinção de grupos, idade ou estação em que foi realizada a infestação artificial. Para tanto, foram obtidos a curva gaussiana de distribuição normal da frequência de carrapatos e valores da média, mediana, desvio padrão, amplitude de variação e variância. Com base nestes valores foi feita a classificação dos animais quanto ao grau de infestação seguindo-se metodologia de VERÍSSIMO (1993).

Para se avaliar a influência da sazonalidade, foi feita a comparação de médias entre os animais infestados em estação chuvosa e aqueles infestados na seca. Além disso foi feita a comparação de médias por faixa etária visando-se avaliar o efeito da idade no grau de infestação.

7.2. Avaliação do efeito da infestação artificial na população de mastócitos dérmicos

Para se averiguar a hipótese de que a infestação artificial por carrapatos poderia interferir na população mastocitária da derme, foram comparadas, utilizando-se o Teste

F, as contagens de mastócitos de amostras colhidas antes da infestação com as amostras colhidas pós-infestação artificial, tanto da derme superficial como da derme profunda e a somatória das duas regiões. As comparações entre médias foram realizadas com o teste de Tukey ($P > 0,05$).

7.3. Comparação do número de mastócitos entre os animais com altas e baixas infestações

Os valores obtidos na análise da distribuição Gaussiana das contagens de carrapatos forneceram o 1º Quartil composto por 25% da população experimental com menor infestação (8,0 carrapatos/animal), supostamente mais resistentes, e o 3º Quartil que conta com 25% da população que apresentou maior infestação (31,5 carrapatos/animal), supostamente mais susceptíveis.

Com base nestes valores foram formados dois grupos: um composto pelos animais com contagens de carrapatos abaixo de 8,0 ($n = 41$), e outro com os animais com contagens acima de 31,5 ($n = 37$). Para a comparação de médias foi utilizado o Teste T de Student.

7.4. Avaliação da correlação entre idade e grau de infestação dos hospedeiros

Para a avaliação da correlação entre idade e grau de infestação por *B. microplus* nos mestiços F2 foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson e os dados estão exibidos em gráfico de dispersão com a linha de tendência.

7.5. Avaliação da correlação entre idade e população de mastócitos em derme não-inflamada

A correlação entre idade dos hospedeiros e a população de mastócitos em derme não-inflamada foi avaliada pelo Coeficiente de Correlação de Pearson, separadamente para as amostras pré-infestação e para as amostras pós-infestação, e os dados estão exibidos em gráficos de dispersão com a linha de tendência.

7.6. Avaliação da correlação entre número de mastócitos cutâneos e grau de infestação dos hospedeiros

O Coeficiente de Correlação de Pearson também foi utilizado para se avaliar a correlação entre número de carrapatos observados nos hospedeiros e a população de mastócitos em derme não-inflamada de amostras pré-infestação e pós-infestação, e os dados estão exibidos em gráficos de dispersão com a linha de tendência.

7.7. Comparação do número de mastócitos entre os animais pertencentes às gerações F_0 , F_1 e F_2

A análise de variância entre as gerações (F_0 , F_1 e F_2) para as contagens de mastócitos foram obtidas usando-se teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As comparações entre médias foram realizadas com o teste de comparação múltipla de Dunn ($P>0,05$).

IV. RESULTADOS

1. Infestação artificial com larvas de *B. microplus*

1.1. Contagens de carrapatos

Os valores obtidos nas contagens de carrapatos estão apresentados nas **Tabelas 1B a 7B** e em histograma na **Figura 2**, com a curva de distribuição normal das contagens de *B. microplus*, além de Box-plot e intervalos de confiança. Os valores individuais mostraram grande variabilidade, observando-se amplitude de variação entre 0 e 128 carrapatos por animal, com média geral de 23,34 e desvio padrão de 22,06. Os histogramas de frequência de observações por número de carrapatos (**figura 2a**) mostram que houve 41 observações de 0 a 10 carrapatos/animal e 44 observações de 11 a 20 carrapatos/animal. Juntos, estes valores indicam que 85 animais F_2 (57,4% da população experimental) mostraram baixas infestações.

O valor do 1º quartil, composto por 25% das contagens com os menores números de carrapatos, foi de 8,0 carrapatos/animal. O 2º quartil, o qual comporta 25% das contagens com os maiores números de carrapatos, obteve valor de 31,5 carrapatos por animal.

Estes dados, associados ao valor da mediana (16,0), reafirmam a forte tendência à baixa infestação mostrada pelos animais F_2 utilizados no experimento como pode ser observado no box plot (**figura 2b**) e, além disso, denota o perfil de distribuição de herança poligênica apresentada pela característica de resistência.

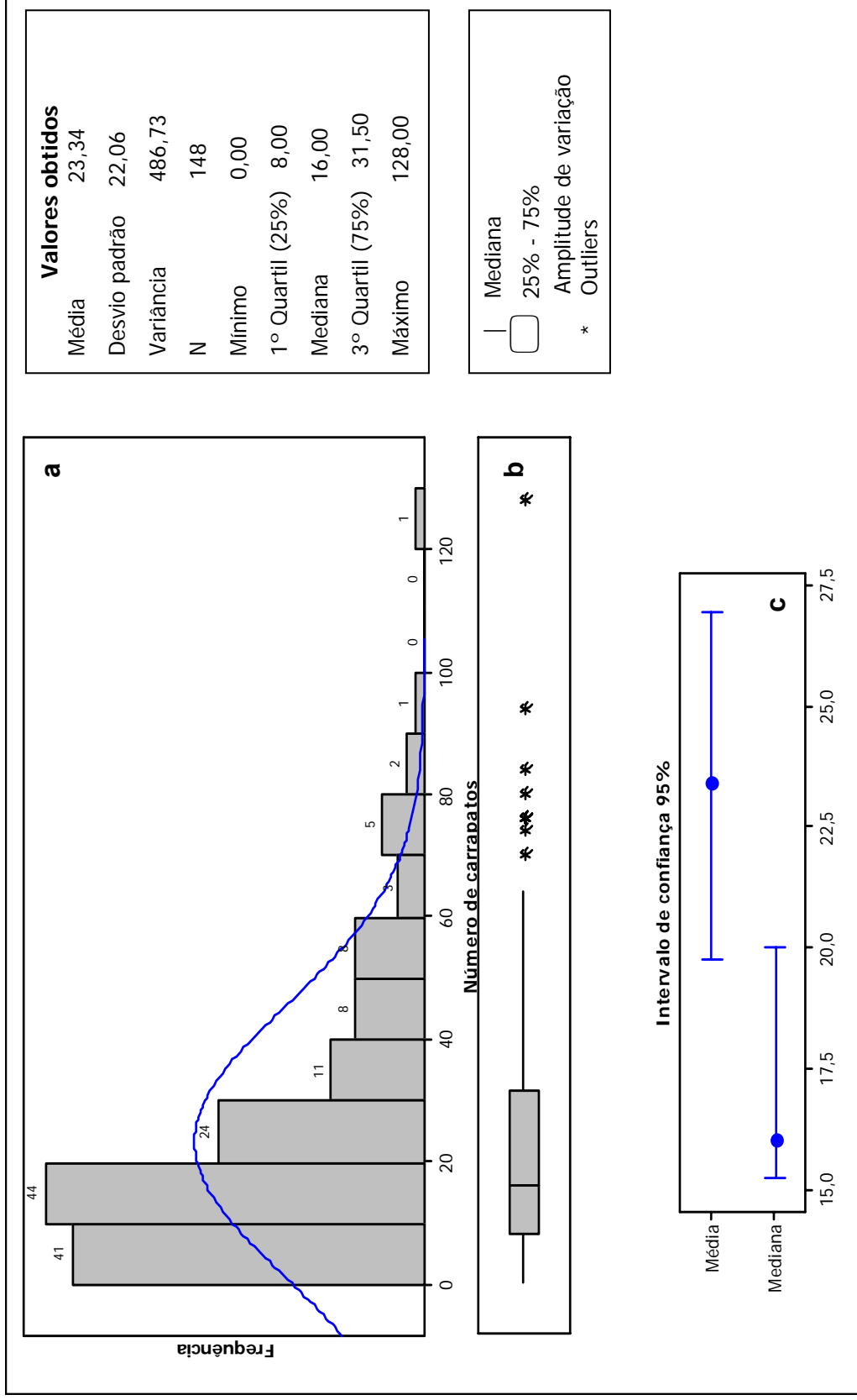


Figura 2. A) Histogramas e curva de distribuição normal de frequência das contagens de *Boophilus microplus* em animais F₂ Gir x Holandês aos 21 dias pós-infestação. **B)** Box plot da distribuição dos dados obtidos. **C)** Intervalo de confiança a 95% da média e mediana. Jaboticabal-SP, 2004.

Na **Tabela 2** estão dispostos, por grupo, datas de infestação e contagem, faixa etária e a distribuição dos animais quanto ao grau de resistência, de acordo com classificação proposta por VERÍSSIMO (1993).

Tabela 2. Distribuição dos animais quanto ao grau de resistência e média de contagem de carrapatos, por categoria e desvio padrão de animais F₂ Gir x Holandês, infestados artificialmente com aproximadamente 1,0 x 10⁴ larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo (n)	Nº de animais por categoria, segundo a média de carrapatos			Média
	≤25	26-100	≥101	
1 (22)	12 (54,6%)	9 (40,9%)	1 (4,5%)	32,00
2 (22)	17 (77,3%)	5 (22,7%)	0 (0%)	19,91
3 (11)	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0 (0%)	16,09
4 (24)	21 (87,5%)	3 (12,5%)	0 (0%)	18,25
5 (20)	16 (80%)	4 (20%)	0 (0%)	17,40
6 (24)	12 (50%)	12 (50%)	0 (0%)	27,25
7 (25)	13 (52%)	12 (48%)	0 (0%)	27,84
Média (Desvio padrão)	99 (4,22)	48 (4,05)	1 (0,38)	22,68
%	66,9%	32,5%	0,6%	100%

<26 = Resistente 26-100 = Moderadamente resistente >100 = Susceptível

Pode-se verificar que 66,29% da população foi classificada como resistente e 32,5% como moderadamente resistente; apenas um animal foi classificado como susceptível. Os diferentes grupos apresentaram diferentes distribuições dos animais entre as categorias resistente e moderadamente resistente, sendo que o Grupo 4 mostrou a maior porcentagem de animais resistentes (87,5%) e a porcentagem mínima desta categoria não ultrapassou 50%.

1.2. Avaliação da influência da sazonalidade no grau de infestação por carrapatos

As diferentes estações em que foram realizadas infestação artificial e contagem de carrapatos não interferiram no número de ixodídeos contados, como pode ser observado na **Tabela 3**. A média das contagens em estação de chuva foi praticamente idêntica à média obtida nas em período de seca (22,67 e 22,69 respectivamente).

Tabela 3. Médias das contagens de carrapatos, por grupo, em diferentes estações do ano, de bovinos mestiços F₂ Gir x holandês infestados artificialmente com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus*. Análise de comparação de médias pelo Teste T de Student. Jaboticabal, 2004.

	Estação chuvosa	Estação seca
	32,00	18,25
Médias dos grupos	19,91	17,40
	16,09	27,25
	-	27,84
Média total	22,67	22,69
Desvio padrão	8,306	5,628
Teste T	0,2360	P = 0,9976 P 0,05

1.3. Avaliação da correlação entre idade dos hospedeiros e grau de infestação por *B. microplus*

A correlação entre número de carrapatos e idade dos bovinos F₂, demonstrada na **Figura 13**, foi determinada pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (r), cujo resultado negativo (- 0,05) demonstrou que não houve significância estatística ($P = 0,4621$). Tomando o número de carrapatos como um índice de resistência / susceptibilidade ao *B. microplus*, observa-se que a idade não interferiu no grau de susceptibilidade nas condições avaliadas, embora as idades dos animais F₂ variaram somente de um ano a dois anos de idade.

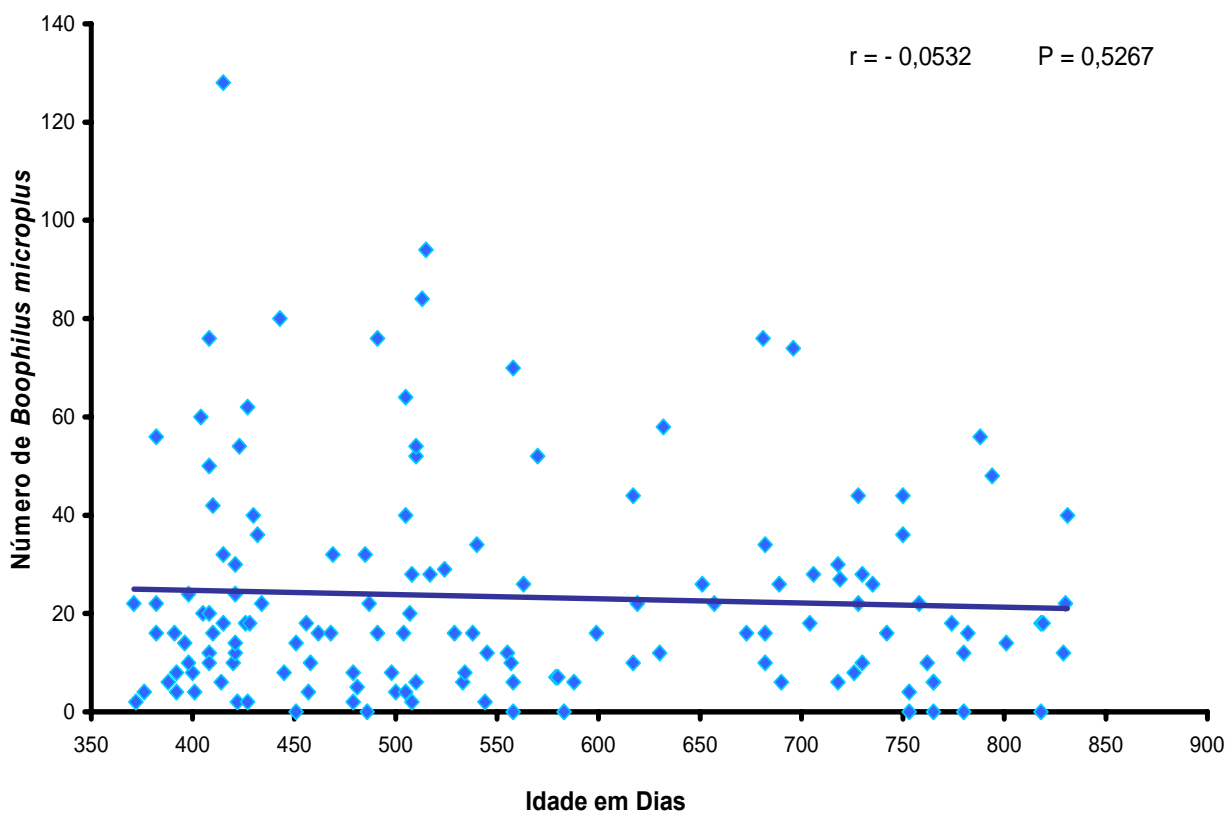


Figura 13. Correlação entre a idade dos bovinos e a infestação por *Boophilus microplus* em animais F₂ artificialmente infestados avaliados aos 21 dias pós-infestação. Jaboticabal-SP, 2004.

2. Amostras de pele, colhidas de bovinos mestiços F2 HPB x Gir após infestação artificial, com presença de sítio de fixação de carrapatos

2.1. Aspectos histopatológicos gerais

Os cortes corados em H&E, assim como as lâminas coradas pelo May-Grünwald & Giemsa contendo sítio de fixação de carrapatos foram examinados para a avaliação dos aspectos histopatológicos e citopatológicos gerais. Os fragmentos colhidos após infestação artificial e que apresentavam sítios de fixação de carrapatos caracterizaram-se por intenso infiltrado inflamatório (**Figuras 3 e 4**).

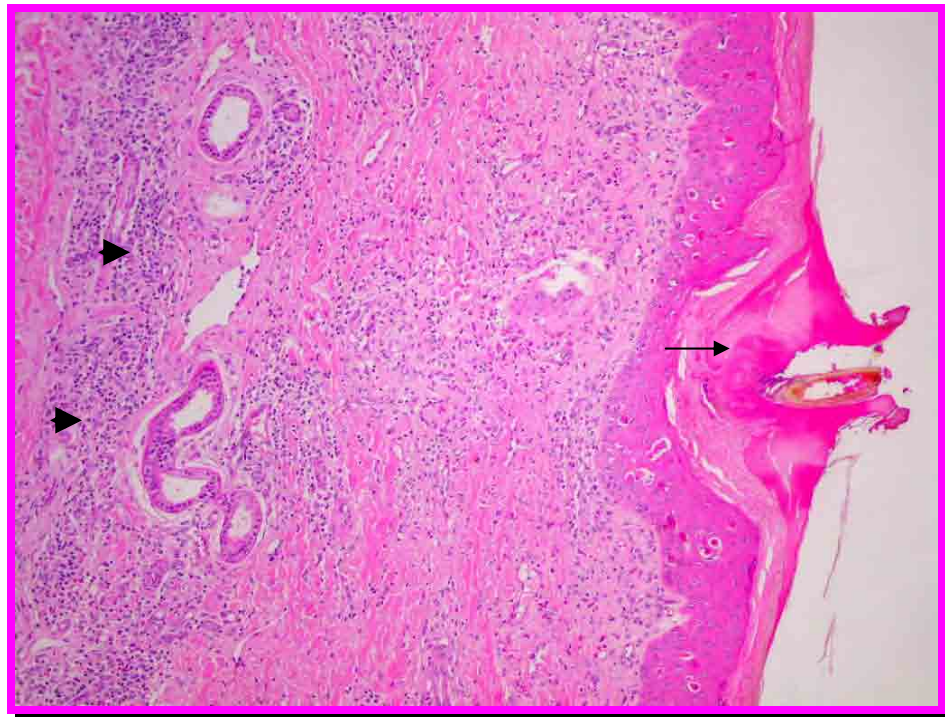


Figura 3. Fotomicrografia da região de fixação de carrapato em pele de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando cone de cimento (seta) e infiltrado inflamatório na derme (cabeças de seta). H. E. (Objetiva 4x). Jaboticabal-SP, 2004.

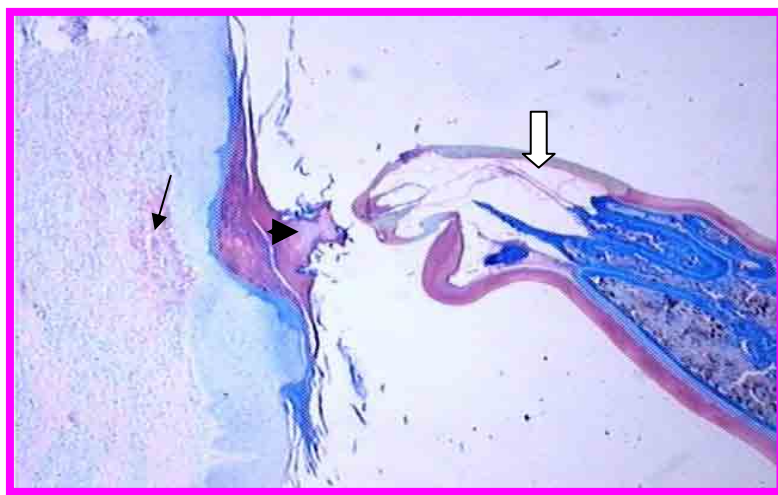


Figura 4. Fotomicrografia da região de fixação de carrapato em pele de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando o ixodídeo (seta branca), cone de cimento (cabeça de seta) e infiltrado eosinofílico na derme (seta). May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 4x). Jaboticabal-SP, 2004.

O infiltrado inflamatório do sítio de fixação mostrou-se, no exame histopatológico geral, composto principalmente por células mononucleares e eosinófilos (**Figura 5**).

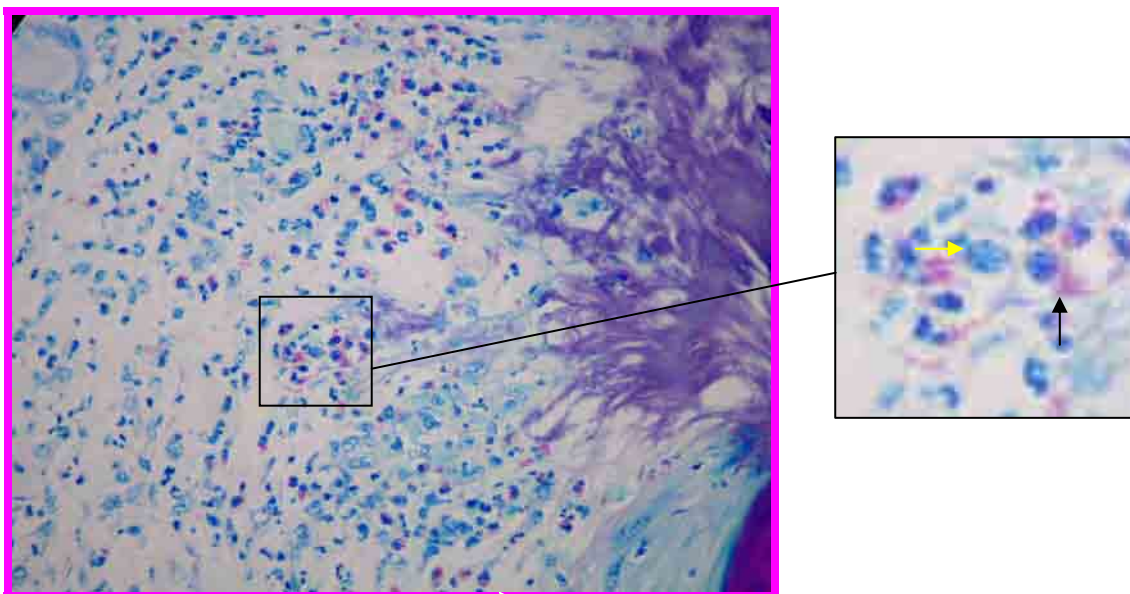


Figura 5. Fotomicrografia da região da derme na área de fixação de carrapato em pele de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando infiltrado composto predominantemente por eosinófilos (seta negra) e mononucleares (seta amarela). May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 20x) Destaque com ampliação digital de 4x. Jaboticabal-SP, 2004.

De modo geral, a derme de fragmentos cutâneos contendo lesões induzidas por carrapatos mostrava extensa dissociação de fibras conjuntivas (edema intersticial) e necrose tecidual, além do infiltrado inflamatório supracitado (**Figura 6**).

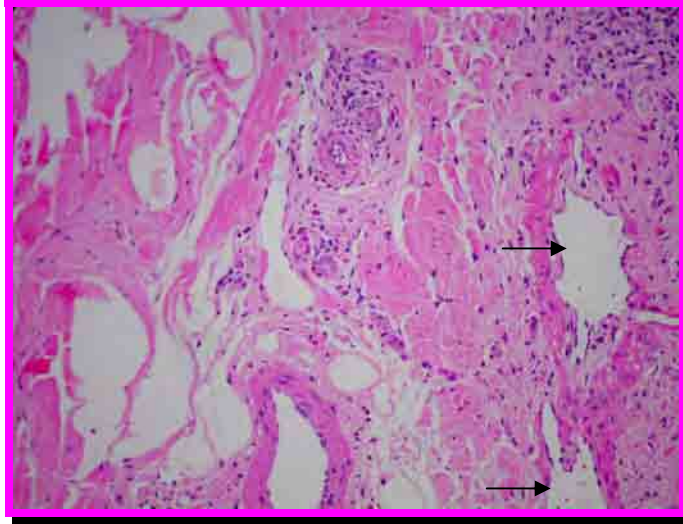


Figura 6. Fotomicrografia da região de fixação de carrapato em pele de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando dissociação de fibras conjuntivas (edema) representado pelas áreas claras no tecido intersticial da derme e vasodilatação linfática (setas). H. E. (Objetiva 20x). Jaboticabal-SP, 2004.

Foi freqüentemente observada numerosa quantidade de corpos apoptóticos na epiderme próxima ao sítio de fixação dos carrapatos (**Figura 7**), espongiose e hiperplasia de epiderme.

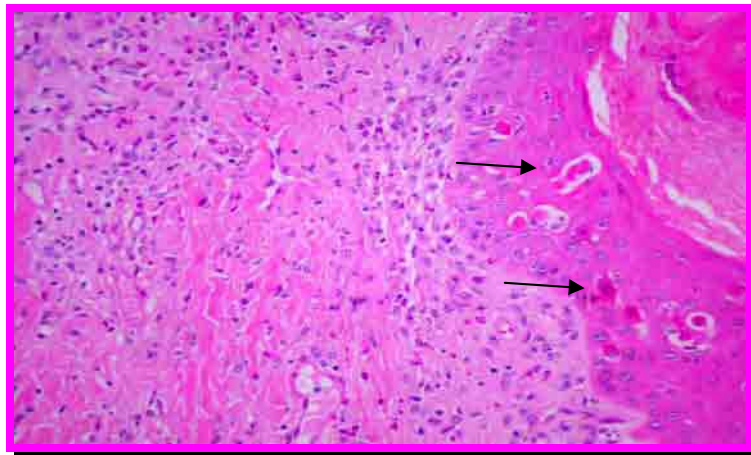


Figura 7. Fotomicrografia da região de fixação de carrapato em pele de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando corpos apoptóticos na epiderme (setas negras). Notar edema representado pelas áreas claras no tecido intersticial da derme e infiltrado inflamatório. H. E. (Objetiva 20x). Jaboticabal-SP, 2004.

2.2. Contagem diferencial de células inflamatórias no sítio de fixação e avaliação da correlação com o grau de infestação por carrapatos

Os resultados obtidos na contagem diferencial de células no sítio de fixação estão exibidos nas **Tabelas 1A.** e **Figuras 8 e 9.** As amostras utilizadas para esta avaliação pertenciam a diferentes grupos de animais mestiços F_2 e a distribuição dos animais na obedeceu a classificação pelo grau de infestação por carrapatos.

Foi observado que no infiltrado celular predominaram eosinófilos (47,8%), seguidos das células mononucleares (28,3%) e neutrófilos (14,4%). As porcentagens de basófilos variaram de 0 a aproximadamente 2% do total de células.

A análise de Correlação de Pearson, apresentada na **Tabela 2A,** mostrou que, embora não tenha havido correlação entre mastócitos e eosinófilos, houve correlação negativa e significativa entre mastócitos e neutrófilos ($C = -0,414$, $P = 0,056$) e entre mastócitos e basófilos ($C = -0,450$, $P = 0,035$), ou seja, quanto maior o número de mastócitos, menor a contagens de neutrófilos e basófilos. Por outro lado, não houve correlação significativa entre grau de infestação e número de células inflamatórias

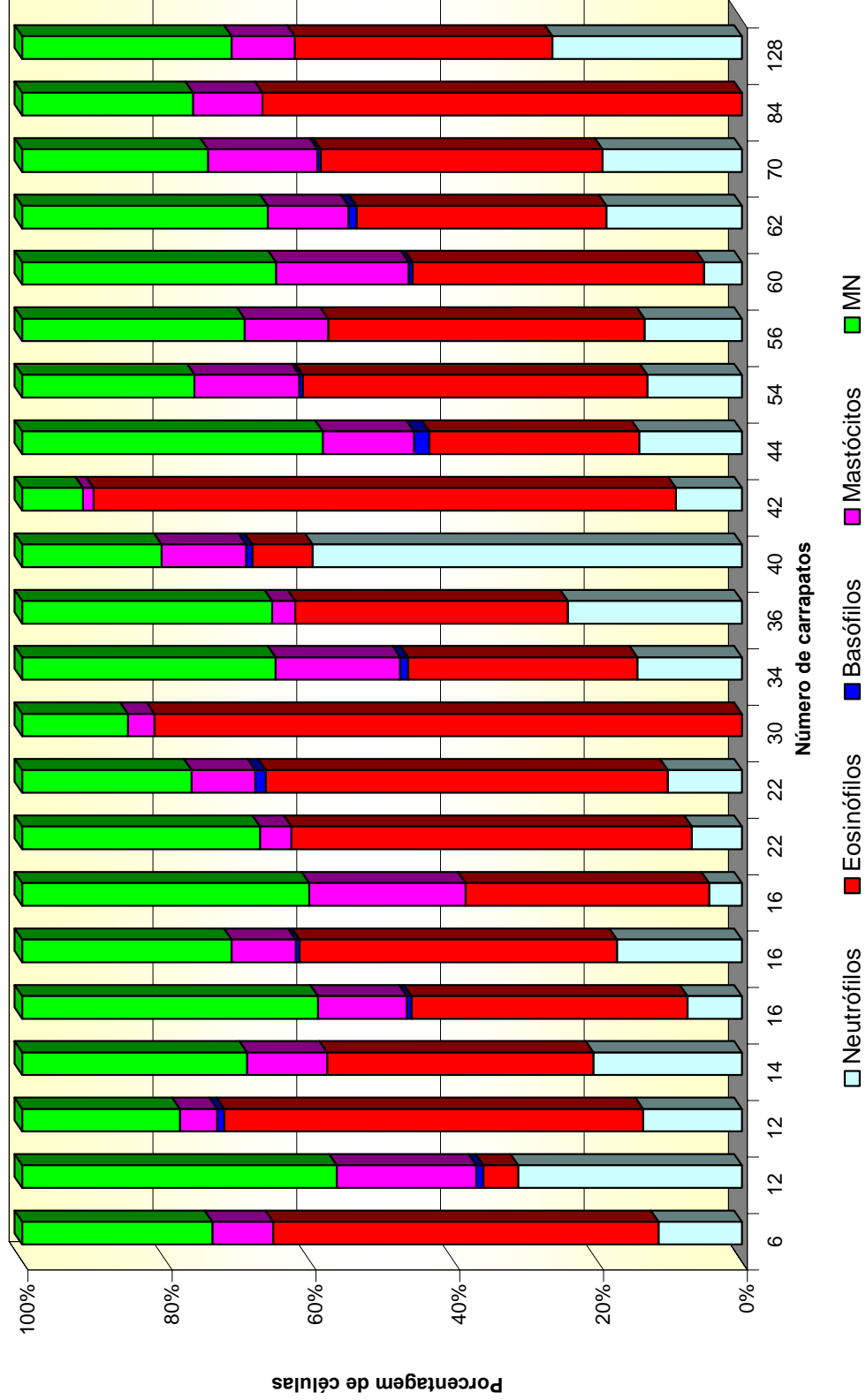


Figura 8: Porcentagem global de células inflamatórias em biópsias colhidas de sítio de fixação após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês. No eixo X estão dispostos os números de carrapato dos animais relativos à amostra. Jaboticabal-SP, 2004.

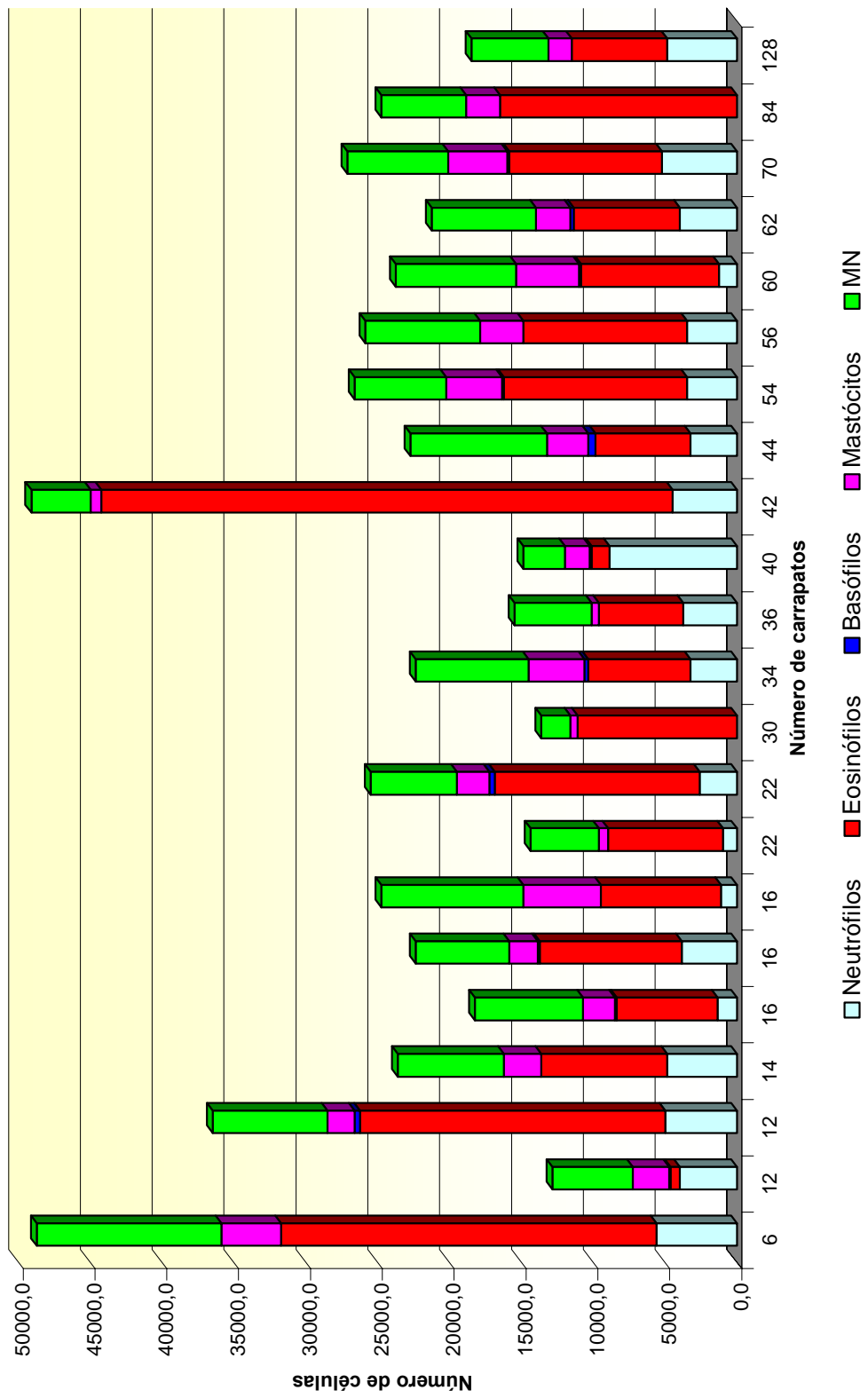


Figura 9: Contagem global de células inflamatórias em biópsias colhidas de sítio de fixação após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês. No eixo X estão dispostos os números de carrapato dos animais relativos à amostra. Jaboticabal-SP, 2004.

3. Amostras de pele não-inflamada de bovinos mestiços F2 HPB x Gir colhidas antes e após infestação artificial com carrapatos

3.1. Aspectos histopatológicos gerais

Os cortes corados em H&E, assim como as lâminas coradas pelo May-Grünwald & Giemsa foram examinados para a avaliação dos aspectos histopatológicos e citopatológicos gerais. A maioria das amostras colhidas antes da infestação artificial não demonstrava sinais de lesão tecidual, entretanto, algumas biópsias apresentavam infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos e eosinófilos, característicos do infiltrado induzido por carrapatos e presença de basófilos, porém sem sinais de fixação por carrapato, como cone de cimento, cavidade alimentar e/ou fragmentos de peça bucal do ixodídeo. Basófilos e eosinófilos foram raramente encontrados nas lâminas coradas pelo May-Grünwald & Giemsa nos tecidos não lesados.

Pôde-se observar nas contagens pós-infestação que um maior número de mastócitos era freqüentemente acompanhado por infiltração eosinofílica (**Figura 10**).

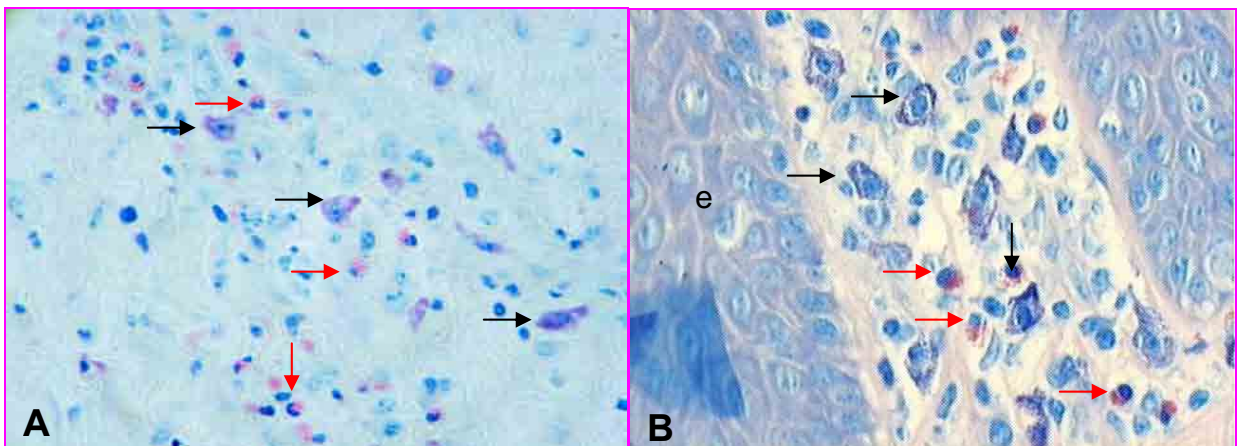


Figura 10. Fotomicrografias da derme de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando mastócitos (setas negras) acompanhados de eosinófilos (setas vermelhas). A) Derme profunda. May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 20x). B) Derme superficial em região de papila dérmica fazendo saliência na epiderme (e). May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 40x). Jaboticabal-SP, 2004.

Mastócitos presentes na derme profunda encontravam-se ora em posições perivasculares, ora infiltrando o tecido intersticial da derme.

A identificação dos mastócitos se dava pela coloração arroxeada dos grânulos, conferida pela coloração de May-Grünwald & Giemsa, e pela morfologia das células.

Mastócitos apresentavam-se ora fusiformes, ora arredondados, geralmente com os núcleos ovalados e bastante basofílicos, com a cromatina disposta periféricamente e nucléolos evidentes. Mastócitos não desgranulados normalmente apresentavam seus grânulos posicionados periféricamente, formando um halo claro perinuclear (**Figura 11**).

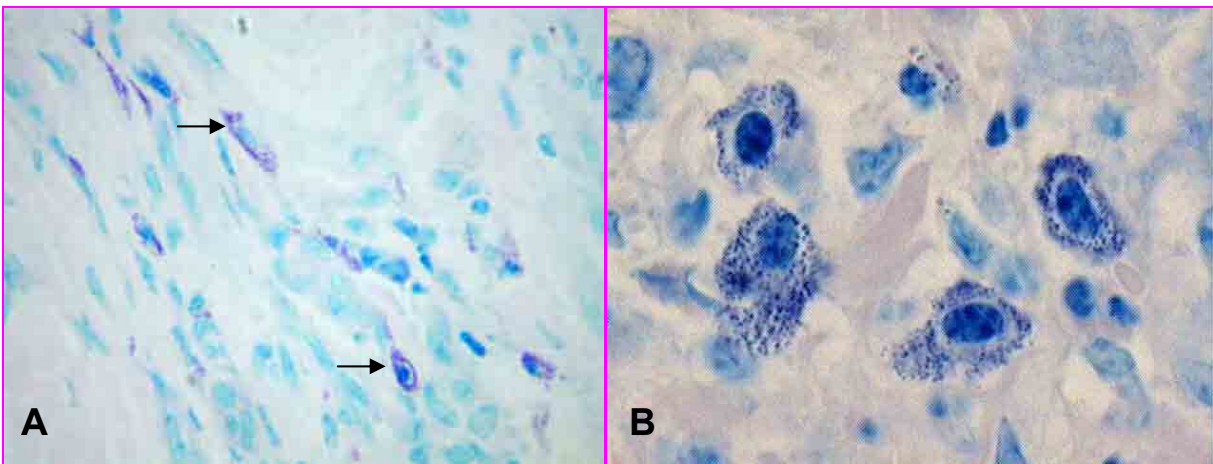


Figura 11. A) Fotomicrografia da derme de bovino mestiço F₂ artificialmente infestado com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* mostrando aspecto fusiforme dos mastócitos (setas). May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 20x). **B)** Detalhe de mastócitos mostrando grânulos citoplasmáticos bem delimitados e núcleos ovalados e basofílicos. May-Grünwald & Giemsa (Objetiva 100x). Jaboticabal-SP, 2004.

Foram contados somente os mastócitos que apresentavam núcleo e grânulos intra-citoplasmáticos evidentes. Eventuais células que apresentavam morfologia que dificultava sua diferenciação, principalmente entre mastócitos e basófilos, eram desconsideradas. Basófilos, geralmente, apresentavam-se menores e com granulação citoplasmática intensamente basofílica. Eosinófilos exibiam-se caracteristicamente com grânulos avermelhados e núcleos polimórficos, muitas vezes com aspecto bilobulado.

3.2. Avaliação do efeito da infestação artificial no número de mastócitos em bovinos mestiços F₂ HPB x Gir

As idades individuais, contagens de *B. microplus*, contagens de mastócitos em derme superficial e profunda de biópsias colhidas antes e após infestação artificial com larvas de carrapatos estão separadas por grupos experimentais e exibidas nas **Tabelas 1B a 7B**. A contagem total de mastócitos foi obtida pela soma das contagens de derme superficial e derme profunda.

As médias dos valores obtidos em todos os grupos estão condensadas na **Tabela 4**. Com exceção do Grupo 7, que apresentou valores semelhantes nas contagens pré e pós-infestação tanto na derme superficial quanto na derme profunda, os grupos sofreram aumento na população mastocitária pós-infestação que chegaram até aproximadamente 10 vezes o valor obtido pré-infestação.

Tabela 4. Médias de idade, número de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo (n)	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1 (22)	418	32,00	15,04	30,84	13,76	24,87	28,80	55,71
2 (22)	511	19,91	-	19,05	-	22,25	-	41,31
3 (11)	515	16,09	16,00	70,40	3,20	29,76	19,20	91,05
4 (24)	408	18,25	10,76	70,80	4,51	40,00	15,27	110,80
5 (20)	788	17,40	32,17	51,36	39,75	44,80	71,92	96,16
6 (24)	704	27,25	33,73	65,20	22,13	43,73	55,87	108,93
7 (25)	537	27,84	22,91	21,57	21,63	20,45	44,54	42,02
Média (Desvio padrão)			21,77 (9,51)	47,03 (22,92)	17,50 (13,57)	32,27 (10,40)	39,27 (22,17)	78,00 (30,74)

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

As comparações, pelo teste F, entre as médias de mastócitos obtidas antes e após a infestação artificial estão apresentadas na **Tabela 5**, e mostraram que houve

diferença altamente significativa ($P < 0,01$) entre as médias de contagens pré e pós-infestação, tanto na derme superficial quanto na derme profunda e derme total.

Tabela 5. Médias de números de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas de animais F₂ Gir x Holandês antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas de *B. microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

	derme superficial (DS)	derme profunda (DP)	total (DS + DP)
Pré-infestação	21,77	17,50	39,27
Pós-infestação	47,03	32,27	78,00
Teste F	21,90*	12,56**	22,76*

* P = 0,0001 ** P = 0,0005

Os dados referentes ao número de mastócitos na derme superficial, derme profunda e número total, estão representados nas **Figuras 1B a 3B** na forma de histogramas com a curva de distribuição normal. As comparações entre as curvas denotam a interferência da infestação artificial no número de mastócitos, desviando a curva à direita tanto na derme superficial quanto na derme profunda e, conseqüentemente, no valor total. Este também é um indicativo de que há a presença de número maior de mastócitos quando da contagem pós-infestação.

As médias de mastócitos na derme superficial antes e depois da infestação artificial foram de 21,77 e 47,03, respectivamente e mostram que houve aumento significativo ($F = 21,90$ e $P = 0,0001$). O gráfico de comparação entre as médias está exposto na **Figura 4B**, na forma de box plot, onde se pode observar a grande amplitude de variação.

O comparativo de valores da derme profunda antes e depois da infestação estão expressos na **Figura 5B**. A média das contagens de mastócitos na derme profunda, que antes da infestação artificial era de 17,50, aumentou significativamente ($F=12,56$ e $P = 0,0005$) para 32,27 no material colhido após a infestação.

A **Figura 6B** mostra que a média na derme total (derme superficial + derme profunda) na contagem pré-infestação foi de 39,27 e, após a infestação, foi significativamente maior ($F=22,76$; $P = 0,0001$), com valor de 78 mastócitos/mm².

Dentre as 148 amostras analisadas, 42 apresentavam sítio de fixação de carrapatos e, para a avaliação da população de mastócitos dérmicos, tomou-se a precaução de se avaliar o tecido o mais distante possível do foco inflamatório. Para se avaliar a possível interferência destes focos na contagem de mastócitos dérmicos, as contagens foram separadas em: amostras com sítio de fixação (n=42) e amostras sem sítio de fixação (n=106). A **Tabela 6** mostra os valores médios por conjunto e os valores obtidos pela análise de variância e teste de comparação múltipla de Dunn.

Tabela 6. Médias de idade, número de carrapatos e números de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas de animais F₂ Gir x Holandês antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas de *B. microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
SC*	555,19	20,58	25,56	47,63	20,17	29,86	45,73	77,48
CC**	550,55	30,33	16,47	40,08	18,16	38,93	34,64	79,01
R ²	6,49	-99,64	34,49	42,30	23,46	-55,84	13,30	-0,27
Pr	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05	ns P>0,05

* SC= Amostras **sem** sítio de fixação de carrapatos

** CC= Amostras **com** sítio de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

Os valores médios das contagens de mastócitos observados nas duas situações mostraram-se próximos e a diferença não foi estatisticamente significativa em nenhuma das contagens. Baseado nestes dados, pode-se afirmar que, nas amostras com sítio de fixação, o procedimento de contagens de mastócitos distantes do foco inflamatório obteve sucesso em evitar a interferência deste.

3.3. Comparação de número de mastócitos dérmicos entre animais resistentes e susceptíveis

Os valores obtidos na análise estatística das contagens de carrapatos forneceram, na curva de distribuição Gaussiana o 1º Quartil que delimita os 25% de animais com as menores infestações (abaixo de 8,0 carrapatos/animal) e 3º Quartil,

com 25% da população experimental com as maiores contagens de carrapatos (acima de 31,5 carrapatos/animal). Com base nestes valores foram formados dois grupos: um composto pelos animais com contagens de carrapatos abaixo de 8,0 ($n = 41$) e caracterizados como “Resistentes”, e outro com contagens mais altas, acima de 31,5 ($n = 37$), aqui denominados “Susceptíveis”. Os resultados obtidos estão dispostos nas **Figuras 1C a 3C** e resumidas na **Figuras 12**.

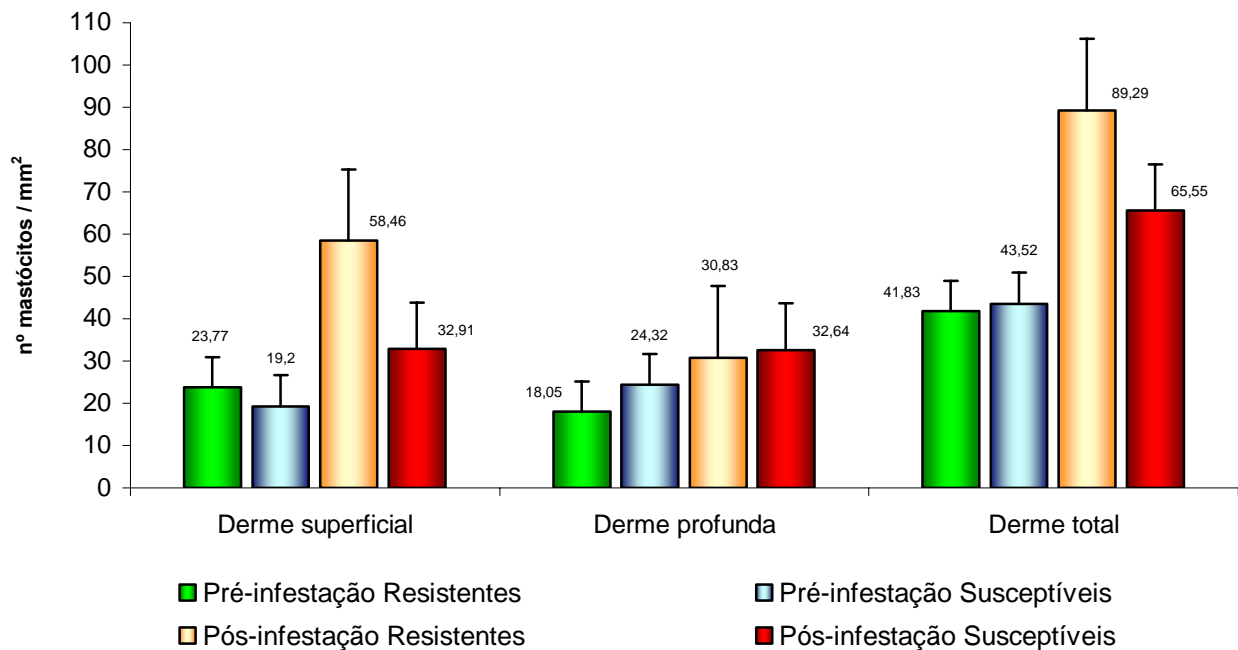


Figura 12. Comparação de médias de mastócitos entre animais resistentes e susceptíveis nas colheitas **pré-infestação e pós-infestação artificial** com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas de *B. microplus*. Jaboticabal-SP, 2004. .

O número de mastócitos detectados na derme superficial dos bovinos susceptíveis foi significativamente menor que dos animais resistentes ($P < 0,05$) após a infestação. Já na derme profunda, as médias de animais resistentes e susceptíveis foram muito próximas (39,83 e 32,64 respectivamente), repetindo o observado em amostras colhidas pré-infestação.

3.4. Avaliação da correlação entre idade e número de mastócitos cutâneos em animais artificialmente infestados com carrapatos

As avaliações da interferência do fator idade de bovinos F₂ nas contagens de mastócitos dérmicos estão apresentadas na forma de gráficos de dispersão nas **Figuras 14 a 16**, com as curvas de tendência linear, valor do Coeficiente de Pearson (r) e valor de P.

Embora a amplitude das idades dos mestiços F₂ fosse pequena (de 10 a 28 meses), foi encontrada correlação altamente significativa com o número de mastócitos na derme superficial (r = 0,2876 e P = 0,0021), profunda (r = 0,39 e P = 0,0001) e total (r = 0,3727 e P = 0,0001) de amostras colhidas antes da infestação artificial, ou seja, foi detectado número maior de mastócitos nos animais mais velhos em relação aos mais jovens nas colheitas pré-infestação. Entretanto, correlação significativa nas colheitas pós-infestação só foi observada na região da derme profunda (r = 0,1746 e P = 0,0377).

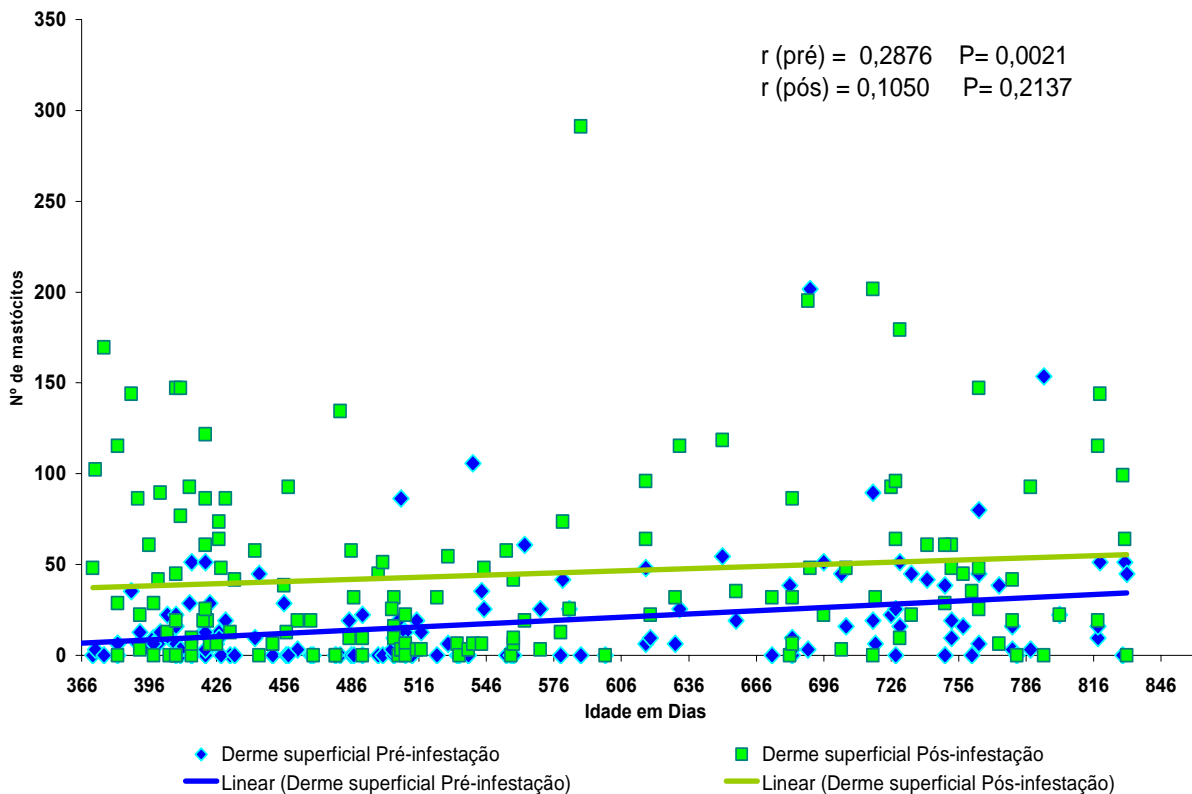


Figura 14. Correlação entre a idade dos bovinos e o número de mastócitos na derme superficial de animais F₂ artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

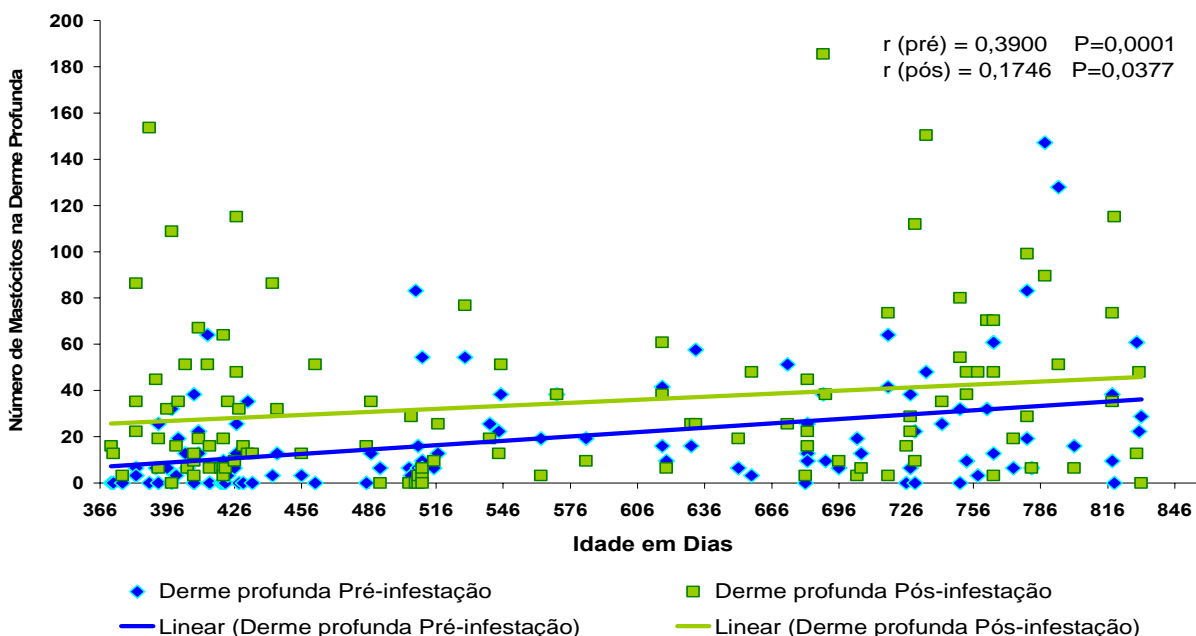


Figura 15. Correlação entre a idade dos bovinos e o número de mastócitos na derme profunda de animais F_2 artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

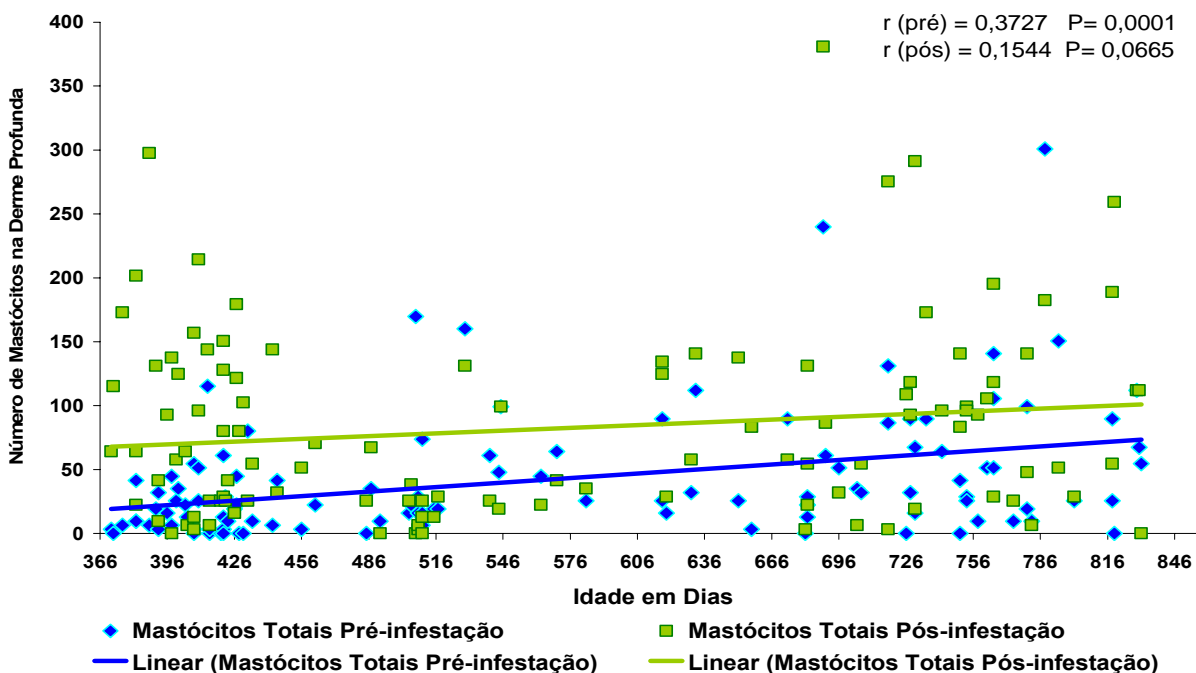


Figura 16. Correlação entre a idade dos bovinos e o número de mastócitos na derme total de animais F_2 artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

3.5. Avaliação da correlação entre número de carrapatos e número de mastócitos cutâneos

Na **Figura 16** estão exibidos os pontos de correlação entre número de mastócitos na derme superficial em colheitas pré e pós-infestação e número de carrapatos. Pode-se observar que nas amostras pré-infestação o grau de infestação não interferiu no número de mastócitos na derme superficial ($r = 0,0510$ e $P = 0,5932$). Porém, as amostras pós-infestação mostraram correlação negativa estatisticamente significativa ($r = -0,2005$ e $P = 0,0167$), i. e., quanto maior o número de carrapatos, menor foi o número de mastócitos observados.

A linha de tendência da **Figura 17**, assim como os valores do coeficiente de Pearson, mostram que tanto nas amostras pré quanto nas amostras pós-infestação, o grau de infestação por carrapatos não interferiu no número de mastócitos ($r = 0,0305$, $P = 0,7493$ e $r = 0,0195$, $P = 0,8179$).

Na soma das duas regiões avaliadas (**Figura 18**) não há significância estatística na correlação mastócitos cutâneos x grau de infestação, embora permaneça a tendência de menor contagem de mastócitos em animais mais infestados por carrapatos.

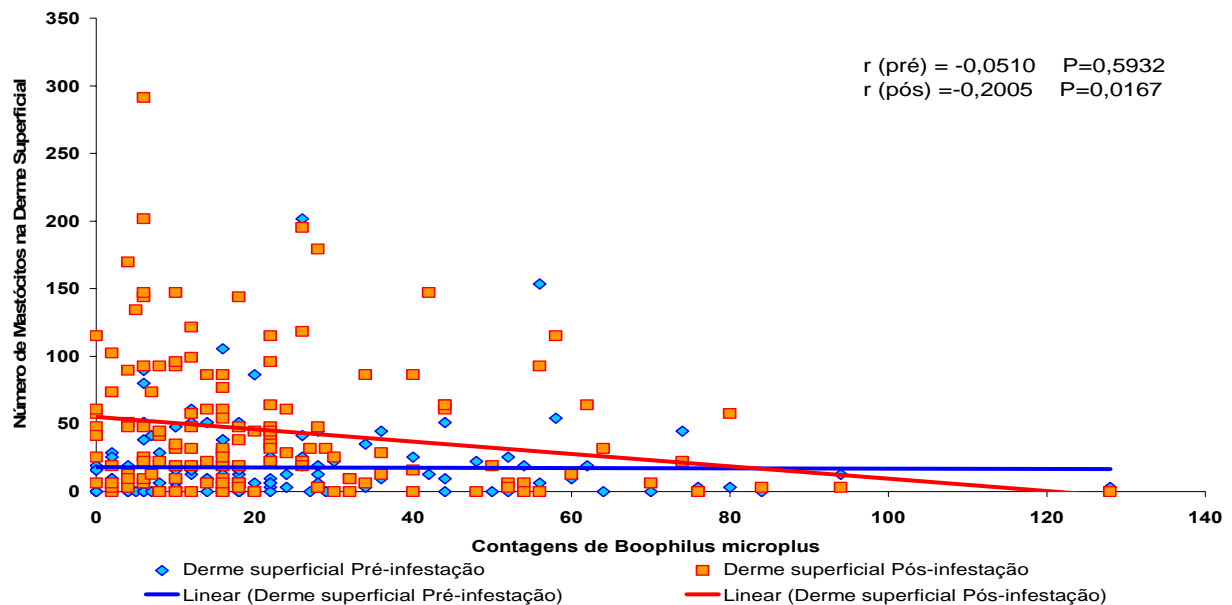


Figura 16. Correlação entre o número de carrapatos e o número de mastócitos na derme superficial de animais F_2 artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

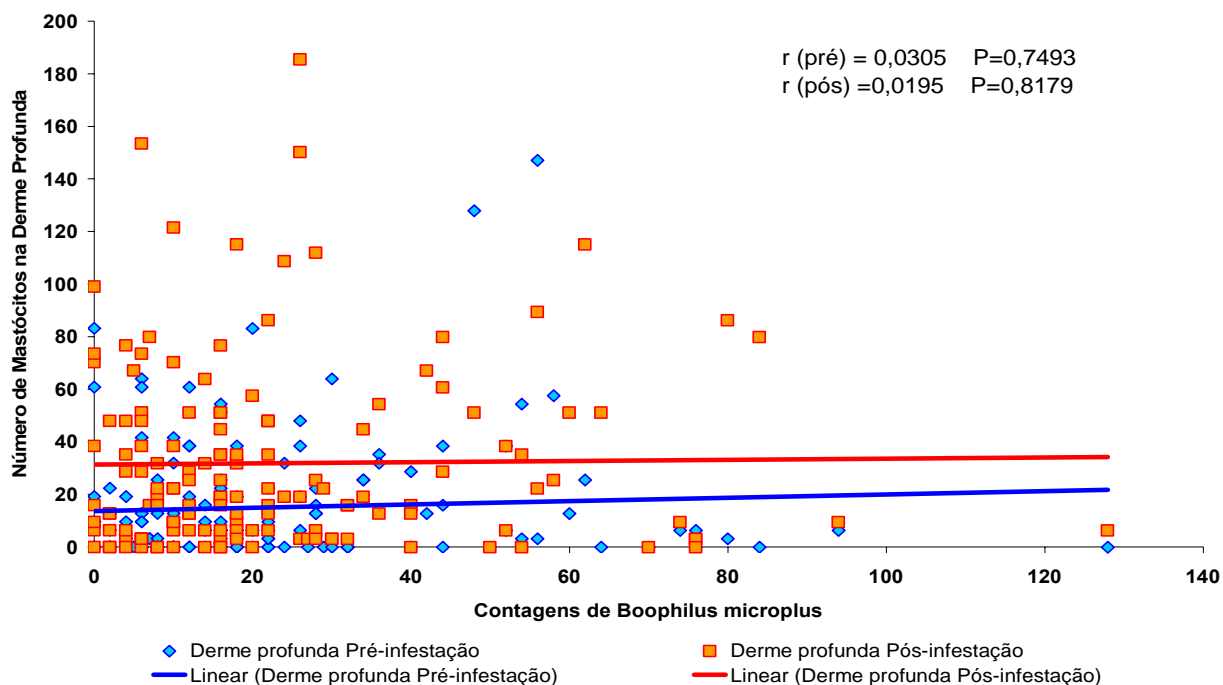


Figura 17. Correlação entre o número de carrapatos e o número de mastócitos na derme profunda de animais F_2 artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

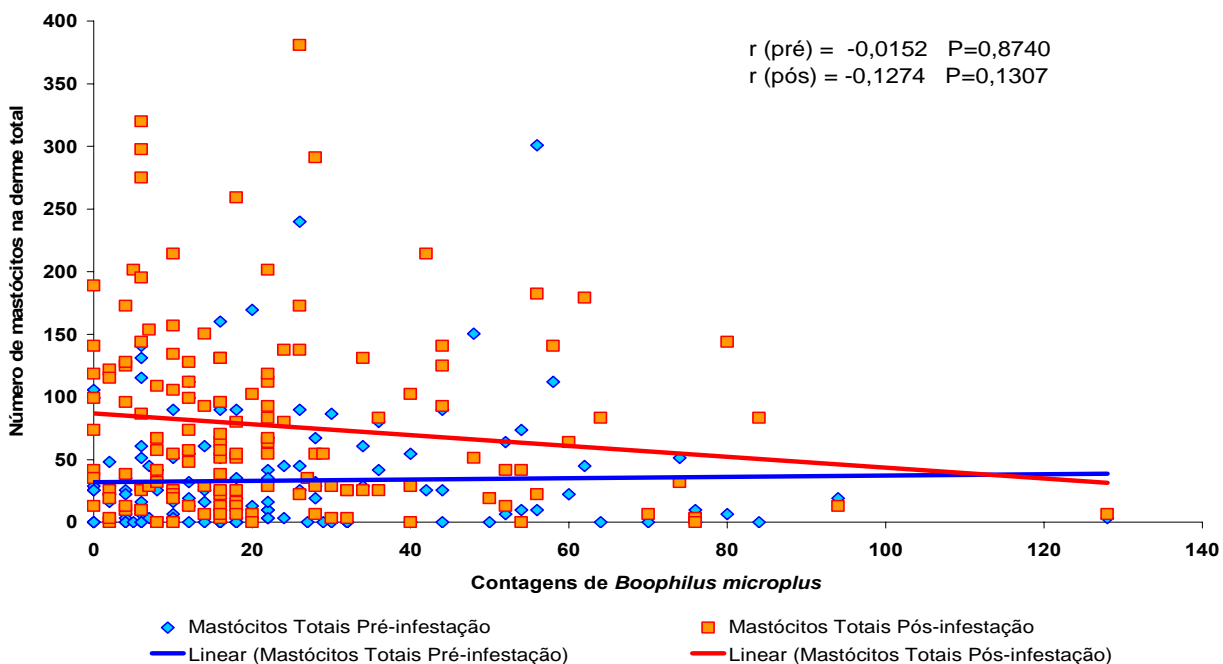


Figura 18. Correlação entre o número de carrapatos e o número de mastócitos na derme total de animais F_2 artificialmente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

4. Comparação do número de mastócitos cutâneos entre animais F₀, F₁ e F₂

As contagens de mastócitos em derme superficial, profunda e total em biópsias colhidas dos animais F₀ e F₁ são exibidas nas **Tabelas 1D e 2D**, respectivamente.

As médias de números de mastócitos em amostras colhidas de animais F₀ e F₁, os quais não receberam infestação artificial de carrapatos, e os valores de mastócitos obtidos de animais F₂ antes de infestação artificial por *B. microplus* estão expostas na **Tabela 13**.

Considerando-se que os números de amostras de pele de animais F₀ e F₁ foram pequenas e que os desvios padrões encontrados mostraram-se bastante elevados, não se obteve diferença significativa entre as três gerações em nenhuma das regiões da derme avaliadas para contagens de mastócitos, sugerindo que o grau de sangue zebuino não é fator determinante para maior presença de mastócitos em pele de bovinos.

Tabela 13. Médias das contagens de mastócitos em pele de animais Gir puros (F₀) e mestiços F₁ e F₂ de Gir x Holandês. Os valores estão apresentados como média desvio padrão por mm² e porcentagem (entre parênteses). Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo	Derme superficial		Derme profunda		Total	
F ₀ (n= 8)	29.2	37.8 ^a	11.6	10.4 ^a	40.8	39.3 ^a
	(71.6%)		(28.4%)		(100%)	
F ₁ (n=22)	28.9	30.4 ^a	9.9	14.7 ^a	38.8	40.8 ^a
	(74.5%)		(25.5%)		(100%)	
F ₂ (n=112)	23,0	29,8 ^a	19,6	25,2 ^a	42,6	49,4 ^a
	(54.0%)		(46.0%)		(100%)	

n = Número de amostras.

Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente.

V. DISCUSSÃO

A interação carrapato-hospedeiro, observada entre o carrapato *Boophilus microplus* e os bovinos, é extremamente complexa e conta com vários fatores ambientais, fisiológicos, imunológicos, genéticos, entre tantos outros, que interferem e modulam ação e reação dos dois elementos-chave desta relação. Há pelo menos 50 anos pesquisadores procuram elucidar como estes fatores agem sobre a relação carrapato-hospedeiro e como o homem pode interferir, antropocentricamente, nesta relação em favor do hospedeiro.

Em 1941, VILLARES já sugerira que, de modo geral, bovinos zebuínos são mais resistentes aos carrapatos que taurinos, o que, posteriormente, foi confirmado por outros autores (UTECH et al., 1978; ROCHA, 1984; MORAES et al., 1986; SARTOR, 1992).

Bovinos mestiços (europeu x zebu), a princípio, apresentam grau de resistência superior ao dos taurinos puros, e próximo ao dos zebuínos puros (RIEK, 1962; FRANCIS & LITTLE, 1964; JOHNSTON & HAYDOCK, 1969; BYFORD et al., 1976; UTECH et al., 1978). Entretanto, parece que a resistência de mestiços está diretamente relacionada com o grau de sangue zebuíno que estes apresentam (TEODORO et al., 1984; LEMOS et al., 1985).

No presente trabalho, animais F₂ Gir x Holandês infestados artificialmente com larvas de *B. microplus* apresentaram média de 22,68 carrapatos por animal, o que, segundo classificação de VERÍSSIMO (1993), caracteriza-os como de alta resistência. Esses resultados concordam com relatos de Byford et al. (1976) e Utech et al. (1978), os quais observaram que animais mestiços apresentavam de moderada a alta resistência.

A distribuição dos bovinos, segundo o grau de resistência proposto por VERÍSSIMO (1993), mostra que a influência do sangue zebuíno prevalece sobre a do taurino, uma vez que 66,9% dos animais foram caracterizados como resistentes e

32,5% mostraram-se moderadamente resistentes. Apenas um animal dentre os 148 avaliados apresentou alta infestação por carrapatos.

Embora a média de carrapatos dos animais deste experimento tenha sido baixa, grande variabilidade foi observada, denotando que aspectos individuais exercem papel importante na caracterização da resistência aos carrapatos. Villares (1941) e Riek (1962) demonstraram que até dentro da mesma raça há animais que apresentam diferentes graus de suscetibilidade.

Uma vez que os animais em apreço eram netos de touros HPB e vacas Gir, seria interessante que se avaliasse também a infestação artificial em animais F_2 descendentes de touros Gir e vacas HPB, para se avaliar a possível influência de características genéticas ligadas ao sexo.

Ficou demonstrado que o fator idade, embora não fosse grande a diferença entre os grupos (12 a 27 meses de idade), não interferiu nos resultados obtidos de contagens de carrapatos (Coeficiente de Pearson = - 0,05; $P = 0,4621$). Alguns autores relatam diferenças na resistência entre animais jovens e adultos, entretanto, indubitavelmente o fator raça exerce influência muito mais forte (SAHIBI et al., 1997).

Nossos resultados corroboram os achados de Guaragna et al. (1992) que, estudando infestações artificiais em tourinhos holandeses e mantiqueiras de um a dois anos de idade, não observaram diferença significativa para a idade, embora os autores tenham detectado efeitos de estação e raça.

A sazonalidade não exerceu influência na contagem de carrapatos, haja visto que a média de carrapatos/animal dos animais que receberam infestações artificiais no “período das águas” (fevereiro de 2001, dezembro de 2001 e novembro de 2002), foi de 22,67. Já os grupos infestados na estação de seca (junho de 2001 e julho de 2003) apresentaram média similar, de 22,69 carrapatos/animal.

Nossos dados sugerem que o efeito da sazonalidade não interfere nos mecanismos de resistência do hospedeiro nem na vida parasitária do ixodídeo, e sim na biologia dos carrapatos, uma vez que, por se tratar de infestação artificial, a fase de vida livre, a qual está mais sujeita aos efeitos da sazonalidade, foi abolida, fornecendo

médias de infestações praticamente idênticas entre os grupos infestados em estação de chuva e estação de seca.

Comparando-se a resistência das raças Canchim e Nelore, por meio de infestações natural (Oliveira et al., 1989) e artificial (Oliveira & Alencar, 1990), demonstrou-se que a diferença ocorre em qualquer estação do ano, havendo efeito significativo na interação raça X estação. Da mesma forma, Guaragna et al. (1992) observaram efeitos de ano, estação e raça.

Na Austrália, Utech et al. (1978) observaram maior contagem de carrapatos no verão em relação ao inverno. Doube & Wharton (1980) relatam uma flutuação sazonal na expressão da resistência ao carrapato em gados das regiões central e sudeste da Austrália, independentemente da raça ou do estado nutricional dos animais. Em trabalho realizado com infestação natural de carrapatos de diferentes espécies em gado africano, Latif et al. (1991) observaram que animais resistentes demonstraram pouca ou nenhuma flutuação sazonal na carga parasitária, enquanto animais susceptíveis apresentaram aumento de até sete vezes no número de carrapatos quando o desafio era alto.

Moreno (1984) observou dois picos principais do *B. microplus* em Minas Gerais, o primeiro de setembro a dezembro, final do período seco e início das chuvas, e o segundo nos meses de abril, maio e junho, após as chuvas mais intensas e início da seca. Em estudo realizado no município de Pelotas/RS, por meio de contagens de partenógenas e teleóginas em vacas holandesas HPB, Brum et al. (1987) encontraram três gerações de carrapatos por ano, tendo no outono o maior pico. A variação sazonal do *B. microplus* no Planalto Catarinense foi estudada no período de março de 1979 a fevereiro de 1982, tendo sido encontrados os menores níveis de infestação de agosto a novembro e os maiores de janeiro a abril, sendo a correlação entre os três anos superior a 76% (Souza et al., 1988).

Em todas as amostras contendo sítio de fixação de carrapatos avaliadas neste experimento foram realizadas avaliações dos aspectos histopatológicos gerais visando identificar o ambiente histológico onde foram contadas as células inflamatórias.

As alterações histológicas gerais observadas nos fragmentos cutâneos do ponto de fixação do carrapato foram bastante homogêneas entre as amostras avaliadas. Embora os aspectos pudessem variar de lâmina para lâmina, alguns pontos em comum foram observados.

O aspecto do cone de cimento produzido pelo carrapato foi bastante uniforme, estendendo-se do extrato córneo até próximo à camada basal da epiderme. Esta estrutura apresentava-se como uma massa homogênea eosinofílica, de aspecto vítreo e cuneiforme, semelhante ao cone produzido por *R. sanguineus* descrito por Szabó e Bechara (1999). O cone de cimento parece auxiliar na fixação de carrapatos que apresentam peça bucal curta, como é o caso do gênero *Rhipicephalus*. No caso de carrapatos de peça bucal longa (*Amblyomma*, *Hyalomma*), os quais penetram o hipostômio profundamente na derme do hospedeiro, o cone de cimento é formado perirostralmente, dentro da derme. Segundo Daniel et al. (2000), nestes carrapatos com aparelho bucal longo, parece que a função do cone de cimento é de proteger os tecidos adjacentes do ixodídeo das suas enzimas salivares, ou ainda isolar a cavidade neoformada do meio externo para criar um gradiente negativo que favoreceria o processo de alimentação (ARTHUR, 1970). O *Ixodes ricinus*, ixodídeo de peça bucal longa, aparentemente não produz cone de cimento, entretanto foi observado que o hipostômio mostrava-se recoberto por uma membrana de colágeno (BROSSARD & FIVAZ, 1982).

Praticamente todas as amostras mostraram intensa dissociação de fibras do tecido conectivo da derme, provocada principalmente pela infiltração de exsudato no meio intersticial. Este tipo de reação parece ser inespecífica, uma vez que pode ser observada em diversas outras situações de lesão tecidual, parasitária ou não. A formação de edema em consequência do parasitismo de carrapatos já foi bastante descrita e parece acompanhar o processo, qualquer que seja a espécie do hospedeiro e do ácaro. Szabó & Bechara (1999) descreveram a presença de intenso infiltrado produzido pelo *R. sanguineus* em hospedeiros resistentes (cobaias) e susceptíveis (cães), embora a composição celular fosse diferente entre ambos. Os mesmos autores descreveram outras alterações teciduais que coincidem com nossos achados como:

hiperplasia da epiderme, edema intracelular, espongirose, hemorragia e necrose. Aspectos semelhantes são descritos por Gill & Walker, 1985 e por Daniel et al., 2000. O infiltrado inflamatório era composto predominantemente por eosinófilos e células mononucleares, o que foi confirmado posteriormente na contagem global de células no sítio de fixação de carrapatos.

Embora sem aparente significado, o grande número de corpos apoptóticos observados na epiderme dos sítios de fixação foi digno de nota. Isto pode ser explicado como consequência da hiperplasia observada, ou seja, o organismo utiliza a apoptose para regredir tecidos que sofreram hiperplasia.

As contagens diferenciais de células presentes no sítio de fixação mostraram grande variabilidade entre os animais, semelhantemente ao observado por Szabó & Bechara (1999).

As correlações entre contagens de carrapatos e o número de células avaliadas no sítio de fixação mostraram-se todas não-significativas, entretanto as análises de correlação entre as células contadas mostraram resultados interessantes. A correlação entre número de mastócitos e de basófilos mostrou-se negativa e estatisticamente significativa ($r = -0,45$; $P = 0,035$), dando a entender que, quanto maior a população mastocitária, menor é a infiltração de basófilos. Sabe-se que tanto mastócitos quanto basófilos sintetizam e liberam histamina, entre outros mediadores em comum, e possuem receptores para IgE (WEDEMEYER & GALLI, 2000), assim sendo podemos supor que se há menos mastócitos no tecido, poderia haver maior estímulo para infiltração de basófilos ocupando o papel dos mastócitos.

Outro dado interessante encontrado, mas não muito claro, foi a correlação negativa e significativa entre número de mastócitos e número de neutrófilos. Partindo-se da suposição que as baixas contagens de mastócitos foram provocadas pela alta taxa de desgranulação e não visualização dos grânulos intracitoplasmáticos, tal correlação mastócito neutrófilo poderia ser explicada pela produção de IL-8, que atrai neutrófilos, pelos mastócitos.

Embora não tenha havido correlação significativa entre eosinófilos e mastócitos, ou entre eosinófilos e carrapatos, ficou evidente que na grande maioria das amostras

predominaram eosinófilos e, mesmo quando estes não predominaram, representavam grandes porcentagens. Os eosinófilos corresponderam a 47,5% do infiltrado inflamatório de todas as amostras avaliadas, sendo seguido pelas células mononucleares (27,7%) e neutrófilos (22,9%), ou seja, quase metade do infiltrado inflamatório era composta por eosinófilos.

Estes dados concordam com aqueles observados por Schleger et al. (1976), que verificaram, na avaliação da resposta celular em taurinos infestados por larvas de *B. microplus*, predomínio, a partir de 3 horas após a fixação das larvas, de eosinófilos no infiltrado inflamatório em hospedeiros pré-sensibilizados. Além disso, os autores encontraram diferenças significativas entre animais resistentes e susceptíveis nas características da população de eosinófilos presente no tecido. Brossard & Fivaz (1982) também observaram grande número de eosinófilos nas avaliações mais tardias (cinco dias) feitas no sítio de fixação de larvas de *I. ricinus* em coelhos resistentes e susceptíveis, enquanto que Szabó & Bechara (1999) só observaram aumento de eosinófilos, assim como de basófilos nos hospedeiros resistentes não-naturais (cobaias) de *R. sanguineus*.

O papel dos eosinófilos na resposta de hospedeiros aos carrapatos ainda é incerto. Brown et al. (1982) sugeriram que eosinófilos e basófilos possuem papel importante na expressão de resistência a carrapatos quando observaram diminuição na resistência de cobaias sensibilizadas após tratamento com soro anti-eosinófilo e anti-basófilo. Por outro lado, foi observado que eosinófilos liberam substâncias inibidoras de histamina (HUNCHER, 1975 citado por BROSSARD & FIVAZ, 1982) e histaminase (ZEIGER et al., 1976 citados por BROSSARD & FIVAZ, 1982) que modulam negativamente a resposta imediata aos carrapatos, podendo ser este um mecanismo de evasão dos carrapatos à resposta imune dos hospedeiros.

Um aspecto importante que deve ser discutido a respeito dos resultados obtidos neste trabalho é que a colheita de amostras pós-infestação deu-se 21 dias após a implantação das larvas. Como a infestação não se deu em câmara de contenção do ixodídeo, não se sabe exatamente quando os carrapatos fixaram-se no hospedeiro,

provavelmente induzindo características histológicas bastante variadas como as observadas.

De qualquer forma, se for considerado que as fixações ocorreram no mesmo período, estes são dados de bastante relevância, uma vez que não foi encontrada nenhuma referência a respeito do aspecto histológico de infestações por tão longo tempo, sendo que, a avaliação encontrada na literatura com maior tempo foi de 144 horas (seis dias) feita por Gill & Walker em 1985, avaliando-se aspectos histológicos de infestações por *Hyalomma anatolicum anatolicum* em coelhos.

A avaliação da resposta imune ao final do repasto sanguíneo pode ser interessante pois mostra como se dá a integração carrapato-hospedeiro após tantos dias, uma vez que, para tanto, o carrapato teve que se evadir dos mecanismos de defesa e encontrou ambiente favorável para completar seu ciclo. Ficou demonstrado, neste experimento, que células características de respostas agudas, como os neutrófilos, tinham presença marcante, podendo reforçar as suposições de que o carrapato modifica constantemente os antígenos presentes na saliva na tentativa de driblar a resposta imune do hospedeiro

Da mesma forma que nas amostras de pele bovina com presença de carrapato fixado, houve avaliação dos aspectos histopatológicos gerais das amostras utilizadas para contagens de mastócitos, antes e após infestação artificial.

Foram encontradas algumas amostras que apresentavam infiltrado inflamatório característico de reação à picada por carrapatos, composto predominantemente por eosinófilos, neutrófilos e mononucleares. Entretanto, nenhum sinal da presença do parasita foi observado, ou seja, presença do próprio carrapato ou de partes deste, cone de cemento, solução de continuidade na epiderme ou cavidade de alimentação. Além disso, a presença de carrapatos na biópsia não foi notificada, como foi padronizado no procedimento experimental.

É provável que tais amostras tenham sido colhidas próximas a algum sítio de fixação do qual o carrapato tinha se desprendido há pouco tempo, havendo então presença de antígenos do ixodídeo induzindo resposta imune. Considerando-se a capacidade migratória dos granulócitos, podemos supor também que, embora não

houvesse lesão no local da biópsia, as células infiltradas poderiam estar se dirigindo a algum foco lesado.

Nas lâminas que não apresentavam qualquer foco inflamatório, principalmente nas colheitas pré-infestação artificial, raramente foram observados eosinófilos e basófilos nas lâminas coradas por May-Grunwald-Giemsa, o que não é surpreendente, uma vez que estas células estão presentes no meio intravascular e só infiltram tecidos quando há estímulo quimiotático (COSTA et al., 1997).

Com relação à avaliação da população mastocitária da derme de bovinos F₂ Gir x HPB, os resultados apresentados neste trabalho mostram que a infestação artificial por *B. microplus* proporcionou maior contagem de mastócitos na derme dos animais, independentemente da presença ou proximidade do carrapato fixado à cútis. Esta observação pode ser representada pelo aumento de aproximadamente 50% no número de mastócitos dérmicos comparando-se as médias de contagens totais antes (39,27 mastócitos/mm²) e ao final da infestação artificial (78,0 mastócitos/mm²).

A avaliação estatística dos valores obtidos com as contagens de mastócitos mostrou diferenças altamente significativas quando comparadas as contagens antes e após infestação artificial, tanto na derme superficial (P=0,0001) quanto na derme profunda (P=0,0005) e derme total (P=0,0001).

Tem-se afirmado que há acúmulo de mastócitos tanto nos focos de inflamação aguda quanto crônica, entretanto o mecanismo para que haja este acúmulo não está ainda claro (OLSSON, 2003). Devido à rápida cinética de acúmulo de mastócitos, é provável que a redistribuição dos mastócitos adjacentes por migração direta seja o principal mecanismo atuante. Trabalhos reportam o aumento no número de mastócitos na mucosa de vias aéreas de cães uma hora após indução alergênica (TURNER et al., 1988) e aumento significativo, em humanos, no número de mastócitos na submucosa de pulmões de asmáticos após seis horas da exposição a antígenos (MONTEFORT et al., 1994). Outra possibilidade, porém menos provável, seriam os mecanismos de proliferação, prolongamento da sobrevivência e diferenciação de precursores de mastócitos oriundos do sangue periférico (OLSSON, 2003).

Aumento na densidade de mastócitos em tecidos inflamados de humanos têm sido descritos em diversas doenças como asma e artrite reumatóide (KOSHINO et al., 1996; GOTIS-GRAHAM, 1997). Segundo Wang et al. (1998), esses aumentos podem ocorrer pelo recrutamento de precursores de mastócitos da circulação seguida de maturação local, proliferação local de mastócitos residentes ou migração de mastócitos maduros de tecidos adjacentes.

Grande variabilidade no número de mastócitos foi observada tanto entre grupos quanto entre animais, demonstrando o caráter de herança poligênica quantitativa da resistência ao carrapato. Um exemplo disto é que a média total do Grupo 4 elevou de 15,27 mastócitos/mm² (antes da infestação) para 110,8 mastócitos/mm² nas amostras pós-infestação, ou seja, um aumento de 7,25 vezes do valor inicial. Já no outro extremo, o Grupo 7 apresentou 44,54 mastócitos/mm² e continuou no mesmo patamar com 42,02 mastócitos/mm² na contagem pós-infestação. Como existem inúmeros fatores do meio ambiente que podem estar interferindo nestes valores e grande parte destes não foi controlada, é provável que efeitos ambientais estejam atuando nos resultados obtidos.

Dentre as biópsias pós-infestação dos 148 animais estudados, não foram identificados mastócitos em 13 amostras na derme superficial, nove na derme profunda e seis na derme total, entretanto aumento no número de eosinófilos foi observado, suscitando reação cutânea. A intensa desgranulação mastocitária descrita em reações de hipersensibilidade imediata pode, eventualmente, desprover os mastócitos de grânulos intracitoplasmáticos não havendo a coloração metacromática característica usada na identificação das células. Portanto, acreditamos que os mastócitos estavam presentes mas não puderam ser identificados, necessitando-se, assim, de técnicas de imunohistoquímica utilizando marcadores de membrana ou citoplasmáticos para identificação das células.

Schleger et al. (1976) descreveram redução no número de mastócitos de até 60,7% próximo ao sítio de fixação de larvas de *B. microplus* em hospedeiros pré-sensibilizados.

Gow et al. (2004) observaram, em reações alérgicas em pele de humanos após 60 minutos de exposição a alérgenos, aumento significativo na desgranulação de mastócitos cutâneos com concomitante aumento no número de eosinófilos acompanhado pelo aumento na concentração de eotaxina na microcirculação da pele.

A comparação do número de mastócitos entre os animais com altas e baixas contagens de carrapatos, realizada entre animais que apresentavam contagens de carrapatos abaixo do 1º quartil (8,0) e acima do 3º quartil (31,5) demonstrou que só houve diferença estatística nas contagens de mastócitos presentes na derme superficial de amostras colhidas após infestação artificial, onde o número de mastócitos detectados na derme superficial dos bovinos susceptíveis (32,91) foi menor que dos animais resistentes (58,46) após a infestação.

Reforçando estas observações, a análise de correlação entre número de mastócitos na derme superficial e contagens de carrapatos mostrou linha de tendência negativa, ou seja, quanto maior a contagem de carrapatos, menor a população mastocitária na derme superficial. Esta correlação não foi observada na derme profunda e total. O fato de animais com maior infestação apresentarem maior número de mastócitos na derme superficial e não na derme profunda pode indicar alguma ligação com a susceptibilidade destes. Se houver alguma limitação na capacidade dos mastócitos em chegar à derme superficial onde está o hipostômio do *B. microplus*, e conseqüentemente, uma menor presença de mediadores mastocitários, este parasito encontrará ambiente mais propício para a fixação e repasto sanguíneo.

Estes resultados podem sugerir que o ambiente criado pela maior densidade de mastócitos na derme superficial pode estar definindo o maior grau de resistência destes animais, uma vez que o *B. microplus* possui hipostômio curto, o qual a penetração fica restrita geralmente à epiderme, promovendo contato mais íntimo da saliva do ixodídeo com a população mastocitária da derme superficial. MUKAI et al. (2001) avaliando número de mastócitos em diferentes raças de bovinos encontrou média de 61,73 células/mm² na derme superficial de Gir, sabidamente mais resistente que o Holandês PC que apresentou média de 48,76 mastócitos/mm². A avaliação da correlação entre bovinos resistentes e susceptíveis a carrapatos de hipostômio longo (*Amblyomma*,

Hyalomma, etc.) e distribuição de mastócitos na derme poderia contribuir para o esclarecimento destes achados.

A liberação de histamina por mastócitos ativados induz, entre outros efeitos, intenso prurido que leva o animal a praticar a autolimpeza, por meio da lambedura, livrando-se das larvas que o teriam provocado. Rocha (1976), citado por MORAES (1988) demonstrou que quando os bovinos são presos de tal forma que não possam praticar a lambedura, a diferença na infestação entre grupos de animais susceptíveis e resistentes torna-se menos evidente e o grau de infestação aumenta em ambos os grupos.

Embora a correlação entre idade e contagens de carrapatos não tenha sido significativa, a avaliação da correlação entre idade e número de mastócitos na pele mostrou que nas amostras colhidas antes da infestação artificial houve correlação significativa tanto na derme superficial quanto na derme profunda e derme total, ou seja, foi detectado maior número de mastócitos nos animais mais velhos em relação aos mais jovens. Entretanto nas colheitas pós-infestação tal correlação só foi observada na derme profunda.

Pode-se sugerir então que quanto maior a idade do hospedeiro, maior a população mastocitária na pele do indivíduo, podendo ser resultado da maturidade imunológica deste, ou ainda supor que um maior tempo de exposição ao desafio poderia induzir proliferação dos mecanismos de defesa ao parasitismo.

As amostras colhidas de animais F_0 e F_1 , assim como o foi com todo o material de mestiços F_2 , receberam avaliação das alterações histopatológicas gerais. Na comparação dos aspectos histopatológicos gerais de animais F_0 , F_1 e F_2 , pouca ou nenhuma diferença morfológica significativa foi observada e, quando encontrada, não era grupo-específica. É esperado que em estado de homeostase da pele, vários mecanismos estejam trabalhando e provendo tais diferenças mínimas observadas.

As contagens totais de mastócitos não diferiram entre os animais mestiços e puros, opondo-se aos achados de Sartor (1992) que observou média de 73 mastócitos cutâneos/mm² contra 41 em mestiços F_1 Gir x Holandês. Moraes et. al (1992) demonstraram que mastócitos cutâneos em zebuínos são muito mais numerosos que

em gado Holandês (médias de 110,2 contra 43,1 em bezerros holandeses), o que pode explicar, pelo menos em parte, a resistência mais alta para carrapatos de gado indiano. Não obstante, Mukai et al. (2001) observou contagens de mastócitos em gado Gir semelhantes às do gado europeu, inclusive Holandês, mas diferente estatisticamente de animais mestiços. Tais resultados confrontantes destes trabalhos podem ser explicados pelas diferenças nas condições experimentais, sexo, idade e características genéticas, local de biópsia, e outros fatores relativos aos grupos experimentais. De qualquer maneira, o número total de mastócitos demonstrado nos grupos deste estudo é um pouco menor ao observado nos outros trabalhos.

Mastócitos normalmente estão distribuídos ao longo do tecido conjuntivo, onde eles podem ser mais numerosos sob a superfície epitelial da pele e adjacente a vasos sanguíneos ou linfáticos (GALLI, 1993). O carrapato *B. microplus* possui aparelho bucal mais curto em comparação a outros gêneros de ixodídeos como *Amblyomma spp.*, assim sendo, uma concentração mais alta de mastócitos na derme superior pode ser mais eficiente na rejeição ao seu parasitismo. Segundo Brown (1988a), a alta densidade de mastócitos é provavelmente um atributo de resistência inata bovina aos carrapatos.

A importância dos mastócitos nos mecanismos de resistência dos hospedeiros foi descrita por Matsuda et al. (1985), quando demonstraram que camundongos mastócito-deficientes (WBB6F1-W/Wv) falharam na manifestação de resistência contra *Haemophysalis longicornis*, diferentemente dos camundongos mastócito-normais (WBB6F1-+/+). Após transplante de medula óssea de camundongos WBB6F1-+/+, mastócitos desenvolveram na pele de camundongos WBB6F1-W/Wv e promoveram resistência ao *H. longicornis* nestes hospedeiros. Posteriormente, os autores administraram mastócitos derivados de culturas de medula óssea diretamente na pele de camundongos WBB6F1-W/Wv e a resistência só foi detectada nos locais de aplicação onde mastócitos se desenvolveram (MATSUDA et al., 1987 citados por _____, 1990).

Mastócitos possuem receptores de alta afinidade para IgE em sua superfície, sendo que sua atividade é mediada principalmente por estes receptores (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1984).

A histamina contida nos grânulos de mastócitos pode causar prurido e estimular a auto-limpeza pelo hospedeiro (SCHLEGER et al, 1976). A lambadura é apontada como um fator importante de resistência e eliminação de carrapatos (KOUDESTAAL et al., 1978), embora tenha sido demonstrado que o desprendimento dos carrapatos de hospedeiros resistentes pode acontecer até mesmo sem a auto-limpeza.

O uso de cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus* demonstrou promover bom grau de resistência aos animais mestiços. Estudos provaram que, geralmente, animais mestiços zebu x europeu apresentam, assim como o zebu puro, um número significativamente menor de carrapatos em relação aos europeus puros (RIEK, 1962, FRANCIS & LITTLE, 1964; JOHNSTON & HAYDOCK, 1969).

Com base nos resultados obtidos e dificuldades encontradas no presente trabalho, poder-se-ia sugerir, como abordagens futuras, a avaliação de mastócitos desgranulados - uma vez que células neste estado não se corariam pela metodologia empregada - por meio de imunohistoquímica, dosagem de histamina nos fragmentos avaliados, ou ainda a contagem de células de Langerhans que são importantes apresentadores de antígenos para o sistema imune e que estão presentes na epiderme.

A real relação entre número de mastócitos na pele de hospedeiros e sua resistência aos carrapatos permanece obscura. Resultados contraditórios conduzem à necessidade de novos estudos para desvendar esta relação. Obviamente mastócitos não agem sozinhos nos mecanismos de resistência, entretanto seu papel nestes mecanismos é essencial e pode vir a ser um futuro fator de seleção de bovinos.

VI. CONCLUSÕES

1. Os bovinos mestiços F₂ Gir x Holandês mostraram-se, em sua maioria, resistentes ou moderadamente susceptíveis ao *B. microplus*
2. A infestação artificial por *B. microplus* induz aumento altamente significativo no número de mastócitos, tanto na derme superficial quanto na derme profunda de bovinos F₂ Gir x Holandês;
3. O aumento no número de mastócitos foi acompanhado por intenso infiltrado de eosinófilos, sendo que estes predominaram no infiltrado inflamatório em resposta à fixação de carrapatos;
4. O exame histopatológico do sítio de fixação dos carrapatos após 21 dias da infestação artificial mostrou alterações gerais semelhantes às observadas por outros autores em períodos mais curtos de fixação;
5. Só pôde ser observada correlação significativa entre número de carrapatos e contagem de mastócitos na derme superficial. Também houve correlação altamente significativa entre idade e número de mastócitos;
6. Não foram observadas diferenças significativas nas contagens de mastócitos dérmicos entre as amostras examinadas das gerações F₀, F₁ e F₂;
7. A contagem diferencial de células no sítio de fixação de carrapatos mostrou que além dos eosinófilos terem predominado o infiltrado celular inflamatório, seguidos pelas células mononucleares e neutrófilos, houve significativa correlação negativa entre mastócitos e basófilos e entre mastócitos e neutrófilos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **Int J Parasitol**, v.3, p.195-200, 1973.

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

ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Exp. Appl. Acarol**, v.7, p.5-13, 1989.

ANDRADE, A.B.F.; SILVA, R.G.; COSTA, A.J. et al. Genetic and Environmental aspects of the resistance of zebu cattle to the tick *Boophilus microplus*. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998, Armidale. **Proceedings...** Armildade, n.27, p.339-342, 1998.

ARTHUR, D. R. Ticks an its implications. **Adv. In Parasitol.**, v.8, p.275-307, 1970.

ASKENASE, P. W. Immunopathology of parasitic diseases: involviment of basophils and mast cells. **Springer Sem. Immunopathol.**, v.2, p.417-442, 1980.

BALASHOV, Y. S. Blood sucking ticks (Ixodoidea) – Vectors of disease of man and animals. **Misc. Publ. Ent. Soc. Amer.**, v.8, p.161-186, 1972.

BARKER, S.C.; MURRELL ,A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Exp. Appl. Acarol.**, v.28, n.1-4, p.55-68, 2002.

BARRIGA, O. O.; SILVA da, S. S.; AZEVEDO, J. S. C. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. **J. Parasitol.**, v.79, n.5, p.710-715, 1993.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature**, v.420, n.6917, p.875-878, 2002.

BLOOM, B. R. Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. **Nature**, v.279, n.5708, p.21-26, 1979.

BONSMA, J.C.; PRETORIUS, A.J. Influence of color coat cover on adaptability of cattle. **Farming in South Africa**, v.18, p.101-120, 1943.

BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Política Agrícola. **Estatísticas agrícolas**. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/ch03/3_1.xls>. Acesso em: 07/02/2003

BOYCE, J. A. et al. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. **J. Exp. Med.**, v.182, p.49-57, 1995.

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

BROWN, S. J. Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. **Vet. Parasitol.**, v.28, p.321-34, 1988a.

BROWN, S. J. Western blot analysis of *Amblyomma americanum*-derived stage-specific and shared antigens using serum from guinea pigs expressing resistance. **Vet. Parasitol.**, v.28, p.163-171, 1988b.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.31, n.3, p.593-598, 1982.

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

BROWN, S. J. et al. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum* derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. **J. Immunol.**, v.133, p.3319-3325, 1984.

BRUM, J.G.W. et al. Flutuação sazonal de *B. microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.39, n.6, p.891-896, 1987.

BUZETTI, W. A. S. **Hiperplasia e morte celular programada (apoptose) de mastócitos de mucosa (MMC) no intestino delgado de ratos experimentalmente infectados com *Hymenolepis diminuta*.** 2001. 66 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2001.

BYFORD, I.; COLDITZ, P.; SIBBICK, R. A tick resistant dairy breed. **Queensland Agric. J.**, v. 102, n.1, p.11-15, 1976.

CAPRON, M. et al. Eosinophils: from low to high affinity immunoglobulin E receptors. **Allergy**, v.50, suppl.25, p.20-23, 1995.

CHAMPAGNE, D. E. The role of saliva vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitol. Today**, v.10, p.430-433, 1994.

COSTA, J. J. et al. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. **J. Am. Med. Assoc.**, v.278, n.22, p.1815-1822, 1997.

DANIEL, D. et al. Dermal reactions of cross breed calves to the attachment of *Amblyomma variegatum* (ixodid tick) larvae. **Israel J. Vet. Med.**, Raanana, v.55, n.4, 2000. Disponível em: < http://www.isrvma.org/article/55_4_6.htm >. Acesso em: 1 dez 2004.

De CASTRO, J. J. et al. Towards the selection of cattle for tick resistance in Africa. **Exp. Appl. Acarol.**, v.12, n.3-4, p.219-227, 1991.

Den HOLLANDER, N.; ALLEN, J. R. *Dermacentor variabilis*: acquired resistance to ticks in Balb/c mice. **Exp. Parasitol.**, v.59, p.118-129, 1985.

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, n.10, p.1178-1179, 1980.

ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N.; HULTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature**, v.381, n.6577, p. 75-77, 1996.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, p.434-439, 1999.

FONSECA, A. H. Patogenia dos carrapatos nos animais e nos seres humanos. Disponível em: < <http://www.cfmv.org.br/rev19/tecnico1.htm#Patogenia> >. Acesso em: 07/02/2003.

FRAGA, A. B. et al. Análise de Fatores Genéticos e Ambientais que Afetam a Infestação de Fêmeas Bovinas da Raça Caracu por Carrapatos (*Boophilus microplus*). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1578-1586, 2003 (Supl. 1)

FRANCIS, J.; LITTLE, D. A. Resistance of Droughtmaster cattle to infestation and babesiosis. **Aust. Vet. J.**, v.40, n.7, p.247-253, 1964.

FREITAS, M. G. **Entomologia e acarologia médica e veterinária**. Belo Horizonte: Precisa, 1982, 253p.

FRISCH, J. E. Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 4., 1994, Guelf, Ontario. **Proceedings...**Guelf, 1994, p.293-295.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol.**, v.29, n.1, p.57-71, 1999.

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

FURLONG, J. et al. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein X Zebu crossbreed cows. In:

CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande: APCV, 1996. p.340.

GALLI, S. J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, v.328, n.4, p.257-265, 1993.

GALLI, S. J.; SZEBO, K. M.; GEISLER, E. N. The kit-ligand, stem cell factor. **Adv. Immunol.**, v.55, p.1-96, 1994.

GALLI, S. J. Mast cells and eosinophil. **Curr. Opin. Hematol.**, v.7, p.32-39, 2000.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. (ed) **Fundamental Immunology**. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven. p.1137-1184, 1999.

GALLI, S. J.; WEDEMEYER, J.; TSAI, M. Analyzing the roles of mast cells and basophils in host defense and other biological responses. **Int. J. Hematol.**, v.75, n.4, 2002.

GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R.; LEIFERMAN, K. M. The biology of the eosinophilic leukocyte. **Annu. Rev. Med.**, v.44, p.85-101, 1993.

GILL, H. S. Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. **Parasitology**, v.93, n.2, p.305-315, 1986.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. Differential cellular responses at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on susceptible and tick-resistant rabbits. **Parasitology**, v.91, p.591-607, 1985.

GOMES, A. O Carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: Ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. P. 10-37.

GORDON, J. R.; ALLEN, J. R. The basophil response in blood and bone marrow of tick-infested guinea pigs. **Can. J. Comp. Med.**, v.43, n.4, p.380-383, 1979.

GORDON, J. R.; ALLEN, J. R. Factor V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. **J. Parasitol.**, v.77, p.167-170, 1991.

GOTIS-GRAHAM, I.; McNEIL, H.P. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. **Arthritis Rheum.**, v.40, p.479-489, 1997.

GOW, M. A. et al. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. **Clin. Exp. Allergy**, v.34, n.8, p.1276-1282, 2004.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GUARAGNA, G.P. et al. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*B. microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v.49, n.2, p.73-82, jul./dez. 1992.

GUIMARÃES, A. M. et al. Ultra structure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *Boophilus microplus* ticks. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 69-74, 1998.

HALES, J. R. S. et al. Cutaneous hyperaemia elicited by larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.34, p.37-46, 1981.

HEWETSON, R. W. Resistance of cattle to cattle tick *Boophilus microplus*. II. The inheritance of resistance to experimental infestation. **J. Agric. Res.**, v.19, p.495-505, 1968.

HOLROYD, R. G. et al. Effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on performance of *bos indicus* cross cows and their progeny. **Aust. J. Exp. Agric.**, n.xx, v. 28, p. 1-10, 1987.

HORN, S. C. Programa nacional de controle de parasitoses. In: *Curso de Parasitologia Animal*, v.2, p. 21-42, 1988.

INDICADORES RURAIS. Brasília: **CNA**, v.5, n. 29, 2001. 6 p.

IRANI, A. A. et al. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** , v. 83, p.4464–4468, 1986.

ISHIZAKA, T.; ISHIZAKA, K. Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy.**, v.34, p.188-235, 1984.

JOHNSTON, L. A. Y.; HAYDOCK, K. P. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on production of Brahman-cross and British-breed cattle in northern Australia. **Aust. Vet. J.**, v.45, n.4, p.175-179, 1969.

JONES, T. C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Imunopatologia. In: _____ **Patologia veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000. p.185-204.

JONSSON, N. N. et al. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.**, v. 78, p. 65-77, 1998.

JONSSON, N. N. et al. Evaluation of tickGARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. **Vet. Parasitol.**, v.88, n.3-4, p.275-285, 2000.

KANAKLATA, et al. Dermal reactions in cattle and rabbits to the inoculation of whole tissue extracts of engorged female *Boophilus microplus* ticks. **Indian J. Parasitol.**, v.10, n.2, p.259-264, 1986.

KOSHINO, T. et al. Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. **J. Asthma**, v.33, p.89-95, 1996.

KOUDSTAAL, D.; KEMP, D. H.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: rejection of larvae from British cattle. **Parasitology**, v.76, p.379-386, 1978.

LATIF, A. A. et al. Histopathology of attachment sites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* on zebu cattle of varying resistance to ticks. **Vet. Parasitol.**, v.38, n.2-3, p.205-213, 1991.

LEMOS, A. M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. **Documento EMBRAPA/CNPGL**, Coronel Pacheco. 6. 1986. 42p.

LEMOS, A. M. et al. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Anim. Prod.**, v.41, n.2, p.197-191, 1985.

MADALENA, F.E. et al. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). **Rev. Bras. Genet.**, v.8, n.2, p.361-375, 1985.

MARSHALL , J. S.; KING, C. A.; McCURDY, J. D. Mat cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. **Curr. Pharm. Des.**, v.9, n.1, p.11-24, 2003.

MARTINEZ, M. L. et al. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004. Disponível em: <<http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/palest12.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2004.

MATSUDA, H. et al. Inability of genetically mast cell-deficient W/W^V mice to acquire resistance against larval *Haemophysalis longicornis* ticks. **J. Parasitol.**, v.71, p.443-449, 1985

MATSUDA, H. et al. Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemophysalis longicornis* ticks in mice. **J. Immunol.**, v.144, n.1, p.259-262, 1990.

MONTEFORT, S. C. et al. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.1411–1421, 1994.

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

MORAES, F. R. **Avaliação comparativa e recíproca da relação parasito-hospedeiro em taurinos e zebuínos naturalmente infestados por *Boophilus microplus* (CANESTRINI). Aspectos morfológicos e patológicos.** 1988. 106f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.

MORAES, F.R. et al. Ecologia de carrapato. XV: Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebrinos a *B. microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n.1, p.45-53, 1986.

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

MORELLI JÚNIOR, J. **Reação de hipersensibilidade cutânea em bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* ao carrapato *Boophilus microplus* (Acarina: Oxididae)**. 2000. 96f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MORENO, E.C. **Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da Região metalúrgica de Minas Gerais**. 1984. 105f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1984.

MOSSMAN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of T(H)1 and T(H)2 responses. **Parasitol Today**, v.7, n.3, p. 49-53, 1991.

MUKAI, L. S. et al. Correlação entre o número de carrapatos e número de mastócitos da pele de bovinos de raças suscetíveis e resistentes ao carrapato *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) In: X ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 2001, Pirassununga. **Resumos: X ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. v.X. p.88 – 88.

MURAKAMI, T. O.; SILVA, D. M. Estudos preliminares da sensibilidade “in vitro” de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na região de Ribeirão Preto, SP. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.64, supl., p.34, 1997.

NAGAR, S. K.; SAXENA, V. K.; RAOZADA, R. N. Studies on the rate of infestation of *Boophilus microplus* (acarina: Ixodidae) on Indian attle: its activity and infestation differential. **Int. J. Anim. Sci.**, v.45, n.3, p.173-173, 1978.

NILSSON, G; SCHWARTZ, L. B. Mast cell heterogeneity: Structure and mediators. In: BUSSE, W. W.; HOLGATE, S. T. **Asthma and Rhinitis**. Boston: Blackwell Science, 1995. p.195-208.

NILSSON, G.; COSTA, J. J.; METCALFE, D. D. Mast cells and basophils. In: GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. **Inflammations: Basic principles and clinical correlates**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.97-117.

OBEREM, P. T. The immunological basis of host resistance to ticks – a review. **J. South African Vet. Assoc.**, v.55, n.4, p.215-217, 1984.

O’KELLY, J. C.; SPIERS, W.G. Observations on body temperature of the host and resistance to the tick *Boophilus microplus* (acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.20, n.5, 498-505, 1983.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus* II. Infestação artificial. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.22, n.4, p.433-438, 1987.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplu*) e ao berne (*D. hominis*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.42, n.2, p.127-35, 1990.

OLIVEIRA, G.P., ALENCAR, M.M., FREITAS, A.R. Resistência de bovinos ao carrapato *B. microplus* II. Infestação natural. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.24, n.10, p.1267-1271, 1989.

OLIVEIRA, G. P.; FREITAS, A. R. Diagnóstico da situação de carrapato / resistente *Boophilus microplus*, Canestrini 1887 em fazendas da região de São Carlos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.65, supl., p.24, 1998

OLSSON, N. **Mast Cell Migration in Inflammatory Diseases**. 2003. 50f. Tese de Doutorado (Doctor of Philosophy) – Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala, 2003. Disponível em: < http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3615.pdf >. Acesso em: 20 nov. 2004.

PAESEN, G. C. et al. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. **Mol. Cell.**, v.3, n.5, p.661-671, 1999.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: Controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Rev. Patol. Trop**, v. 23, n. 2, p. 145-146, 1994.

PROGRAMA de melhoria do couro cru. Uberlândia: Braspelco, 2004. Programa de orientação de indústria de couro aos pecuaristas para produção de couro cru. Disponível em: < http://www.braspelco.com.br/pt/programa2_f.htm >. Acesso em: 19 jun. 2004.

RECHAV, Y., CLARCKE, F. C.; DAUTH, J. Acquisition of immunity in cattle against the blue tick, *Boophilus decoloratus*. **Exp. Acarol.**, v.11, p.51-56, 1991.

RENDEL, J. Breeding for milk products in the tropics. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS. n.2, 1971. Proceed., 1971. 452p.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick/host interaction. **Exp. Appl. Acarol.**, v.7, p.15-20, 1989.

RIBEIRO, J. M. C. et al. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, v.161, p.332-344, 1985.

RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G.T.; ROBINSON, D.R. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. **J. Parasitol.**, v.74, p.1068-1069, 1988.

RIEK, R. F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v.32, p.204-209, 1956.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the ticks. VI. Resistance of cattle to infestations with the ticks *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v.13, p.532-550, 1962.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*: stages of their life cycle of the parasite against which resistance is manifest. **J. Parasitol.**, v.54, p.667-673, 1968.

ROBERTS, J. A. Behavior of larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) on cattle of differing degrees of resistance. **J. Parasitol.**, v.57, p.651-656, 1971.

ROCHA, U. F. **Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini)**. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1984. 32p. (Boletim Técnico, 3).

ROTHENBERG, M. D. Eosinophilia. In: EPSTEIN, F. H. Mechanism of disease. **New Engl. J. Med.**, v.338, n.22, p.1592-1600, 1998.

SAHIBI, H. et al. Hyalomma ticks: bovine resistance under field conditions as related to host age and breed. **Parasite**, v.4, n.2, p.159-165, 1997.

SARTOR, I. F. et al. Estudo comparativo da resistência ao carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari) em bovinos das raças Gir, Holandês e mestiços. **Vet. Zootec.**, v.4, p.25-33, 1992.

SAUER, J. R. et al. Tick salivary gland physiology. **Annu. Ver. Entomol.**, v. 40, p. 245-247, 1995.

SCEPEK, S.; MOQBEL, R.; LINDAU, M. Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. **Parasitol. Today**, v.10, n.7, p.276-278, 1994.

SCHLEGER, A. V.; LINCOLN, D. T.; BOURNE, A. S. Arteriovenous anastomoses in the dermal vasculature of the skin of *Bos taurus* cattle, and their relationship with resistance to the tick, *Boophilus microplus*. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.34, p.27-35, 1981.

SCHLEGER, A. V. et al. *Boophilus microplus*: celular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Austr. J. Biol. Sci.**, v.29, p.499-512, 1976.

SEIFERT, G. W. Selection of beef cattle in Northern Australia for resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*): research and application. **Prev. Vet. Med.**, v.2, p.553-558, 1984.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, v.10, p.385-409, 1992.

SOARES, V. E. et al. Análise *in vitro* da ação de carrapaticidas em amostras de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) colhidas de bovinos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v.22, n.1, p.71-75, 2001.

SOUZA, A.P. et al. Variação sazonal de *B. microplus* no Planalto Catarinense. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.23, n.6, p.627-630, jun. 1988.

SPICKETT, A. M. et al. Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a Bushveld region of South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.56, n.4, p.245-250, 1989.

STEEVES, E. B.; ALLEN, J. R. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. **Int. J. Parasitol.**, v.21, n.2, p.265-268, 1991.

SUNDSTRÖM, M. **Signal Transduction in Mast Cell Migration**. 2001. 53f. Tese de Doutorado (Doctor of Philosophy) – Faculty of Medicine, Uppsala University, Uppsala, 2001. Disponível em: < http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-1474.pdf >. Acesso em 20 nov. 2004.

SUTHERST, R. W. et al. Intra-specific competition of *Boophilus microplus* (Canestrini) on cattle. **J. Appl. Ecol.**, v.10, p.855-863, 1973.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Exp. Appl. Acarol.**, v.23, n.11, p.915-928, 1999.

TATCHELL, R. J. Interaction between ticks and their hosts. **Int. J. Parasitol.**, xxxxxx, v.17, n.2, p.597-606, 1987.

TATCHELL, R. J.; MOORHOUSE, D. E. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. **Parasitology**, v.58, n.2, p.441-459, 1968.

TEODORO, R. L. et al. Resistencia genética dos bovinos ao carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de touros mestiços sob infestação artificial. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 21, Belo Horizonte, MG. 1984. Anais... Belo Horizonte, 1984, p.54.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitol. Today**, v.6, p.157-160, 1990.

TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **Parasitology**, v.25, p.57-81, 1939.

TURNER, C.R.; KOLBE, J.; SPANNHAKE, E.W.. Rapid increase in mast cell numbers in canine central and peripheral airways. **J. Appl. Physiol.**, v.65, p.445-451, 1988.

USHIO, H. et al. Protective immunity and mast cell and eosinophil responses in mice infested with larval *Haemophysalis longicornis* ticks. **Parasite Immunol.**, v.15, p.209-214, 1993.

UTECH, K. B. W.; WHARTON, R. H.; KERR, J. D. resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v.29, p.885-895, 1978.

VERISSIMO, C. J. **Controle do Carrapato dos Bovinos**. Jaboticabal : Funep, 1993. 26p.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Características do pelame e infestação por carrapatos em bovinos Gir e mestiços (Holandês x Gir). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, Fortaleza, 1996. Anais...Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996, p.379-380.

VERÍSSIMO, C.J. et al. Resistência e suscetibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus*. **B. Ind. Anim.**, v.54, n.2, p.1-10, 1997.

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.

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

WANG, H. W. et al. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. **J. Clin. Invest.**, v.102, n.8, p.1617-1626, 1998.

WEDEMEYER, J.; GALLI, S. J. Mast cells and basophils in acquired immunity. **Brit. Med. Bull.**, v.56, n.4, p.936-955, 2000.

WELLER, P. F.; DVORAK, A. M. Human eosinophils development, maturation and functional morphology. In: BUSSE, W.; HOLGATE, S. T., eds. **Asthma and rhinitis**. Boston, Mass: Blackwell Scientific Publications; 1994: p.225, 274.

WHARTON, R. H. et al. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. **Aust. J. Agric. Res.**, v.21, p.163-181, 1970.

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

WIKEL, S. K. Tick modulation of host cytokines. **Exp. Parasitol.**, v.84, p.304-309, 1996b.

WIKEL, S. K. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. **Bioscience**, v.49, n.4, p.311-320, 1999.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitol. Today**, v.13, n.10, p.383-389, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A : Contagem diferencial de células inflamatórias no sítio de fixação e avaliação da correlação com o grau de infestação por carrapatos

Tabela 1A. Contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de células inflamatórias em biópsias colhidas de sítio de fixação após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês. Jaboticabal-SP, 2004.

Animal	Número carrapatos	Número de células / mm ²					MN*	Total
		Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Mastócitos			
1	6	56,3	261,3	0,0	41,3	128,8	487,5	
2	12	40,0	6,3	1,3	25,0	56,3	128,8	
3	12	50,0	212,5	3,8	18,8	80,0	365,0	
4	14	48,8	87,5	0,0	26,3	73,8	236,3	
5	16	13,8	70,0	1,3	22,5	75,0	182,5	
6	16	38,8	98,8	1,3	20,0	65,0	223,8	
7	16	11,3	83,8	0,0	53,8	98,8	247,5	
8	22	10,0	80,0	0,0	6,3	47,5	143,8	
9	22	26,3	142,5	3,8	22,5	60,0	255,0	
10	30	0,0	111,3	0,0	5,0	20,0	136,3	
11	34	32,5	71,3	2,5	38,8	78,8	223,8	
12	36	37,5	58,8	0,0	5,0	53,8	155,0	
13	40	88,8	12,5	1,3	17,5	28,8	148,8	
14	42	45,0	397,5	0,0	7,5	41,3	491,3	
15	44	32,5	66,3	5,0	28,8	95,0	227,5	
16	54	35,0	127,5	1,3	38,8	63,8	266,3	
17	56	35,0	113,8	0,0	30,0	80,0	258,8	
18	60	12,5	96,3	1,3	43,8	83,8	153,8	
19	62	40,0	73,8	2,5	23,8	72,5	212,5	
20	70	52,5	106,3	1,3	41,3	70,0	271,3	
21	84	0,0	165,0	0,0	23,8	58,8	247,5	
22	128	48,8	66,3	0,0	16,3	53,8	185,0	
Média	39,82	34,3	114,0	1,2	25,3	67,5	238,5	
Desvio padrão		20,81	85,54	1,47	13,44	23,72	98,92	
%		14,4	47,8	0,5	10,6	28,3	100,0	

*MN: Células mononucleares

Tabela 2A. Correlação entre contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e entre número de células inflamatórias em biópsias colhidas de sítio de fixação após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês. Jaboticabal-SP, 2004.

	Carrapatos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Mastócitos	MN*
Neutrófilos	C = 0,234 P = 0,294					
Eosinófilos	C = -0,121 P = 0,591	C = -0,276 P = 0,214				
Basófilos	C = 0,221 P = 0,324	C = 0,939 P = 0,000	C = -0,308 P = 0,163			
Mastócitos	C = -0,159 P = 0,479	C = -0,414© P = 0,056	C = 0,074 P = 0,743	C = -0,450© P = 0,035		
MN*	C = -0,318 P = 0,150	C = -0,330 P = 0,134	C = 0,239 P = 0,283	C = -0,345 P = 0,116	C = 0,770 P = 0,000	
Total	C = -0,203 P = 0,365	-	-	-	-	-

MN: Células mononucleares

C: Coeficiente de Correlação de Pearson

P: < 0,05

©: Correlação significativa estatisticamente

APÊNDICE B : Avaliação do efeito da infestação artificial no número de mastócitos em bovinos mestiços F₂ HPB x Gir

Tabela 1B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 1**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 1	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1*	382	56	6,4	0,0	3,2	22,4	9,6	22,4
2	392	8	6,4	22,4	25,6	19,2	32,0	41,6
3*	400	8	22,4	41,6	3,2	16,0	25,6	57,6
4*	404	60	9,6	12,8	12,8	51,2	22,4	64,0
5	405	20	6,4	0,0	6,4	6,4	12,8	6,4
6	408	76	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	3,2
7*	408	12	16,0	0,0	38,4	12,8	54,4	12,8
8	410	16	28,8	76,8	22,4	19,2	51,2	96,0
9	412	10	-	0,0	-	9,6	-	9,6
10	414	6	51,2	92,8	64,0	51,2	115,2	144,0
11*	415	128	3,2	0,0	0,0	6,4	3,2	6,4
12	415	32	0,0	9,6	0,0	16,0	0,0	25,6
13	422	2	28,8	19,2	0,0	6,4	28,8	25,6
14*	423	54	6,4	6,4	3,2	35,2	9,6	41,6
15	426	18	12,8	6,4	6,4	9,6	19,2	16,0
16*	427	62	19,2	64,0	25,6	115,2	44,8	179,2
17	427	2	9,6	73,6	12,8	48,0	22,4	121,6
18	430	40	0,0	86,4	0,0	16,0	0,0	102,4
19	432	36	44,8	12,8	35,2	12,8	80,0	25,6
20	443	32	-	115,2	-	25,6	-	140,8
21	445	8	28,8	0,0	12,8	32,0	41,6	32,0
22	456	18	0,0	38,4	3,2	12,8	3,2	51,2
Média	418	32,00	15,04	30,84	13,76	24,87	28,80	55,71

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 2B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 2**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 2	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1	451	14	-	6,4	-	0,0	-	6,4
2	451	0	-	6,4	-	6,4	-	12,8
3	457	4	-	12,8	-	0,0	-	12,8
4*	458	10	-	92,8	-	121,6	-	214,4
5*	468	16	-	19,2	-	19,2	-	38,4
6	469	32	-	0,0	-	3,2	-	3,2
7	479	2	-	0,0	-	0,0	-	0,0
8	491	16	-	9,6	-	3,2	-	12,8
9*	498	8	-	44,8	-	22,4	-	67,2
10	500	4	-	51,2	-	76,8	-	128,0
11	505	40	-	16,0	-	12,8	-	28,8
12	505	64	-	32,0	-	51,2	-	83,2
13*	513	84	-	3,2	-	80,0	-	83,2
14	533	6	-	6,4	-	3,2	-	9,6
15	534	8	-	0,0	-	0,0	-	0,0
16	538	16	-	3,2	-	0,0	-	3,2
17	555	12	-	57,6	-	16,0	-	73,6
18	557	10	-	0,0	-	22,4	-	22,4
19*	558	70	-	6,4	-	0,0	-	6,4
20*	558	6	-	9,6	-	0,0	-	9,6
21	558	0	-	41,6	-	0,0	-	41,6
22	599	16	-	0,0	-	51,2	-	51,2
Média	511	19,91	-	19,05	-	22,25	-	41,31

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 3B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 3**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 3	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1*	408	20	-	44,8	-	57,6	-	102,4
2	408	50	-	19,2	-	0,0	-	19,2
3	415	18	-	6,4	-	6,4	-	12,8
4	479	8	-	-	-	-	-	-
5	481	5	-	134,4	-	67,2	-	201,6
6	486	0	-	57,6	-	16,0	-	73,6
7	524	29	-	32,0	-	22,4	-	54,4
8	579	7	41,6	12,8	3,2	16,0	44,8	28,8
9	580	7	0,0	73,6	3,2	80,0	3,2	153,6
10	588	6	6,4	291,2	3,2	28,8	9,6	320,0
11	719	27	-	32,0	-	3,2	-	35,2
Média	515	16,09	16,00	70,40	3,20	29,76	19,20	91,05

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 4B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 4**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 4	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1	371	22	3,2	48,0	0,0	16,0	3,2	64,0
2	372	2	-	102,4	-	12,8	-	115,2
3	376	4	6,4	169,6	0,0	3,2	6,4	172,8
4*	382	16	6,4	28,8	3,2	35,2	9,6	64,0
5*	382	22	35,2	115,2	6,4	86,4	41,6	201,6
6	388	6	6,4	144,0	0,0	153,6	6,4	297,6
7	391	16	12,8	86,4	6,4	44,8	19,2	131,2
8	392	4	3,2	3,2	0,0	6,4	3,2	9,6
9*	396	14	9,6	60,8	6,4	32,0	16,0	92,8
10	398	24	12,8	28,8	32,0	108,8	44,8	137,6
11*	398	10	6,4	0,0	0,0	0,0	6,4	0,0
12*	401	4	16,0	89,6	19,2	35,2	35,2	124,8
13	408	10	3,2	147,2	0,0	9,6	3,2	156,8
14*	410	42	12,8	147,2	12,8	67,2	25,6	214,4
15	420	10	0,0	19,2	0,0	6,4	0,0	25,6
16	421	30	0,0	25,6	0,0	3,2	0,0	28,8
17*	421	24	3,2	60,8	0,0	19,2	3,2	80,0
18*	421	12	12,8	121,6	0,0	6,4	12,8	128,0
19*	421	14	51,2	86,4	9,6	64,0	60,8	150,4
20	428	18	0,0	48,0	0,0	32,0	0,0	80,0
21	434	22	9,6	41,6	0,0	12,8	9,6	54,4
22	443	80	3,2	57,6	3,2	86,4	6,4	144,0
23*	458	16	-	48,0	-	67,2	-	115,2
24*	462	16	22,4	19,2	0,0	51,2	22,4	70,4
média	408	18,25	10,76	70,80	4,51	40,00	15,27	110,80

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 5B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 5**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 5	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1*	750	36	9,6	28,8	32,0	54,4	41,6	83,2
2	753	0	19,2	60,8	9,6	38,4	28,8	99,2
3	753	4	16,0	48,0	9,6	48,0	25,6	96,0
4*	758	22	6,4	44,8	3,2	48,0	9,6	92,8
5	765	6	80,0	147,2	60,8	48,0	140,8	195,2
6	765	0	44,8	48,0	60,8	70,4	105,6	118,4
7*	765	6	38,4	25,6	12,8	3,2	51,2	28,8
8	774	18	3,2	6,4	6,4	19,2	9,6	25,6
9	780	12	0,0	19,2	19,2	28,8	19,2	48,0
10	780	0	16,0	41,6	83,2	99,2	99,2	140,8
11*	782	16	3,2	0,0	6,4	6,4	9,6	6,4
12	788	56	153,6	92,8	147,2	89,6	300,8	182,4
13*	794	48	22,4	0,0	128,0	51,2	150,4	51,2
14	801	14	9,6	22,4	16,0	6,4	25,6	28,8
15	818	0	16,0	115,2	9,6	73,6	25,6	188,8
16	818	18	51,2	19,2	38,4	35,2	89,6	54,4
17	819	18	-	144,0	-	115,2	-	259,2
18	829	12	51,2	99,2	60,8	12,8	112,0	112,0
19	830	22	44,8	64,0	22,4	48,0	67,2	112,0
20*	831	40	25,6	0,0	28,8	0,0	54,4	0,0
Média	788	17,40	32,17	51,36	39,75	44,80	71,92	96,16

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 6B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 6**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 6	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1	632	58	54,4	115,2	57,6	25,6	112,0	140,8
2	651	26	19,2	118,4	6,4	19,2	25,6	137,6
3	657	22	0,0	35,2	3,2	48,0	3,2	83,2
4*	673	16	38,4	32,0	51,2	25,6	89,6	57,6
5*	681	76	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	3,2
6*	682	16	3,2	6,4	9,6	16,0	12,8	22,4
7*	682	34	3,2	86,4	25,6	44,8	28,8	131,2
8	682	10	9,6	32,0	12,8	22,4	22,4	54,4
9	689	26	201,6	195,2	38,4	185,6	240,0	380,8
10	690	6	51,2	48,0	9,6	38,4	60,8	86,4
11	696	74	44,8	22,4	6,4	9,6	51,2	32,0
12*	704	18	16,0	3,2	19,2	3,2	35,2	6,4
13*	706	28	19,2	48,0	12,8	6,4	32,0	54,4
14*	718	30	22,4	0,0	64,0	3,2	86,4	3,2
15	718	6	89,6	201,6	41,6	73,6	131,2	275,2
16	726	8	0,0	92,8	0,0	16,0	0,0	108,8
17	728	44	51,2	64,0	38,4	28,8	89,6	92,8
18	728	22	25,6	96,0	6,4	22,4	32,0	118,4
19*	730	28	44,8	179,2	22,4	112,0	67,2	291,2
20	730	10	16,0	9,6	0,0	9,6	16,0	19,2
21*	735	26	41,6	22,4	48,0	150,4	89,6	172,8
22	742	16	38,4	60,8	25,6	35,2	64,0	96,0
23*	750	44	0,0	60,8	0,0	80,0	0,0	140,8
24	762	10	19,2	35,2	32,0	70,4	51,2	105,6
Média	704	27,25	33,73	65,20	22,13	43,73	55,87	108,93

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

Tabela 7B. Idade, contagens de carrapatos *Boophilus microplus* e número de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas antes e após infestação artificial com aproximadamente $1,0 \times 10^4$ larvas em animais F₂ Gir x Holandês pertencentes ao **Grupo 7**. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo 7	Idade (dias)	Número de carrapatos	Nº de mastócitos / mm ²					
			Derme Superficial		Derme profunda		Total	
			AI	PI	AI	PI	AI	PI
1	485	32	0,0	9,6	0,0	16,0	0,0	25,6
2	487	22	22,4	32,0	12,8	35,2	35,2	67,2
3	491	76	3,2	0,0	6,4	0,0	9,6	0,0
4	504	16	9,6	25,6	6,4	0,0	16,0	25,6
5	505	4	19,2	9,6	3,2	28,8	22,4	38,4
6	507	20	86,4	0,0	83,2	0,0	169,6	0,0
7	508	2	9,6	3,2	6,4	0,0	16,0	3,2
8	508	28	12,8	3,2	16,0	3,2	28,8	6,4
9	510	52	0,0	6,4	6,4	6,4	6,4	12,8
10	510	54	19,2	-	54,4	-	73,6	-
11*	510	6	6,4	22,4	9,6	3,2	16,0	25,6
12	515	94	12,8	3,2	6,4	9,6	19,2	12,8
13	517	28	6,4	3,2	12,8	25,6	19,2	28,8
14	522	32	0,0	-	16,0	-	16,0	-
15	529	16	105,6	54,4	54,4	76,8	160,0	131,2
16	540	34	35,2	6,4	25,6	19,2	60,8	25,6
17	544	2	25,6	6,4	22,4	12,8	48,0	19,2
18	545	12	60,8	48,0	38,4	51,2	99,2	99,2
19	563	26	25,6	19,2	19,2	3,2	44,8	22,4
20	570	52	25,6	3,2	38,4	38,4	64,0	41,6
21	583	0	6,4	25,6	19,2	9,6	25,6	35,2
22	617	10	48,0	96,0	41,6	38,4	89,6	134,4
23	617	44	9,6	64,0	16,0	60,8	25,6	124,8
24	619	22	6,4	22,4	9,6	6,4	16,0	28,8
25	630	12	16,0	32,0	16,0	25,6	32,0	57,6
Média	537	27,84	22,91	21,57	21,63	20,45	44,54	42,02

* Amostras com sítios de fixação de carrapatos

AI: Antes da infestação artificial

PI: Após infestação artificial

- : Parcela perdida

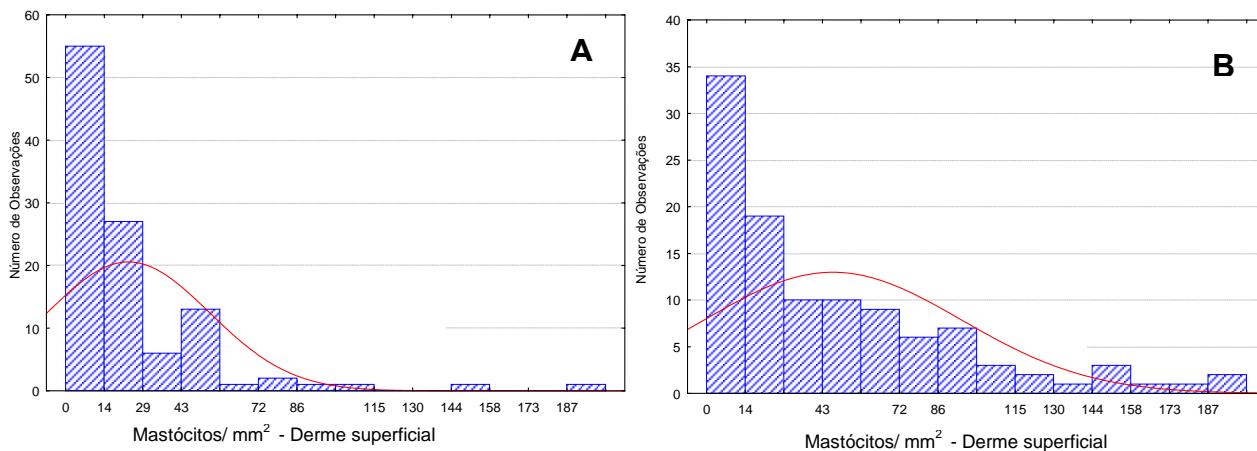


Figura 1B. Histogramas e curva de distribuição Normal das contagens de mastócitos em derme superficial da pele de animais F₂ Gir x Holandês. A) Pré-infestação artificial. B) Pós-infestação artificial com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

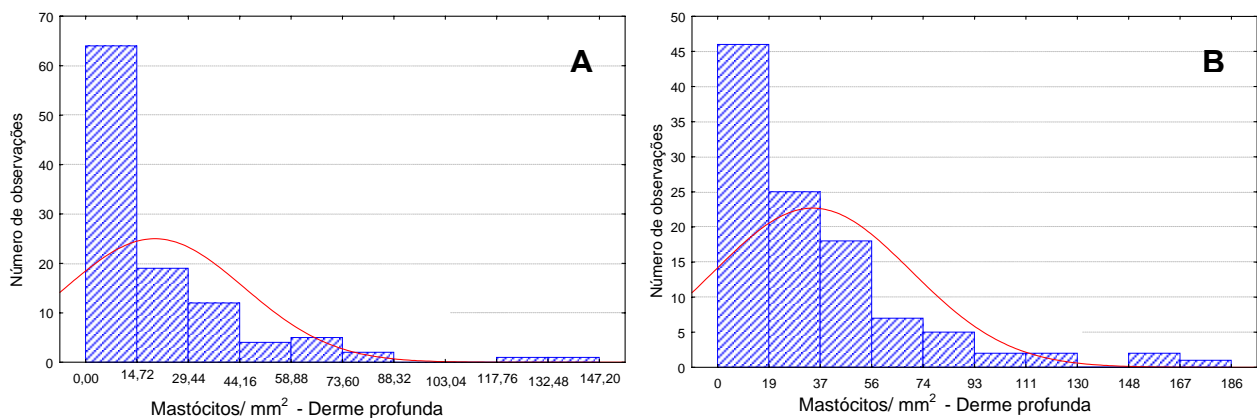


Figura 2B. Histogramas e curva de distribuição Normal das contagens de mastócitos em derme profunda da pele de animais F₂ Gir x Holandês. A) Pré-infestação artificial. B) Pós-infestação artificial com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

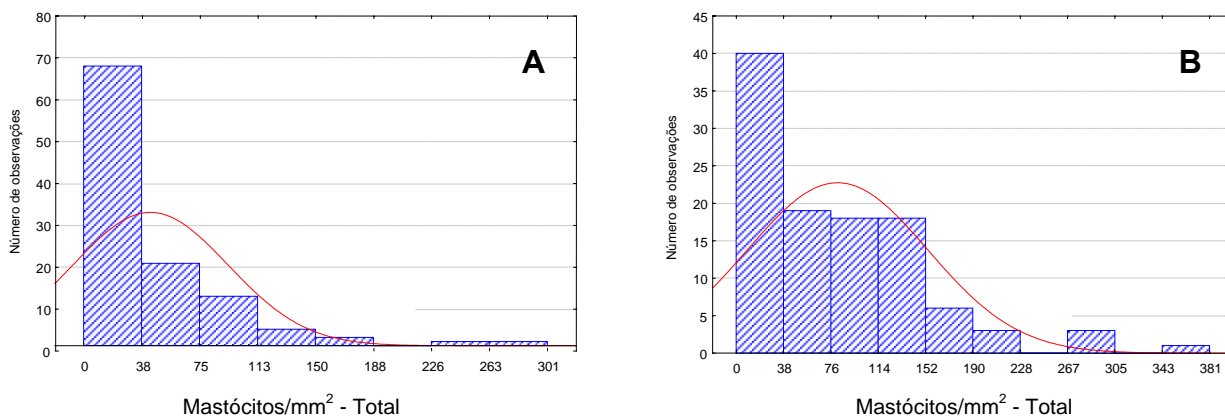


Figura 3B. Histogramas e curva de distribuição Normal das contagens de mastócitos totais (derme superficial + derme profunda) em pele de animais F₂ Gir x Holandês. A) Pré-infestação artificial. B) Pós-infestação artificial com larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

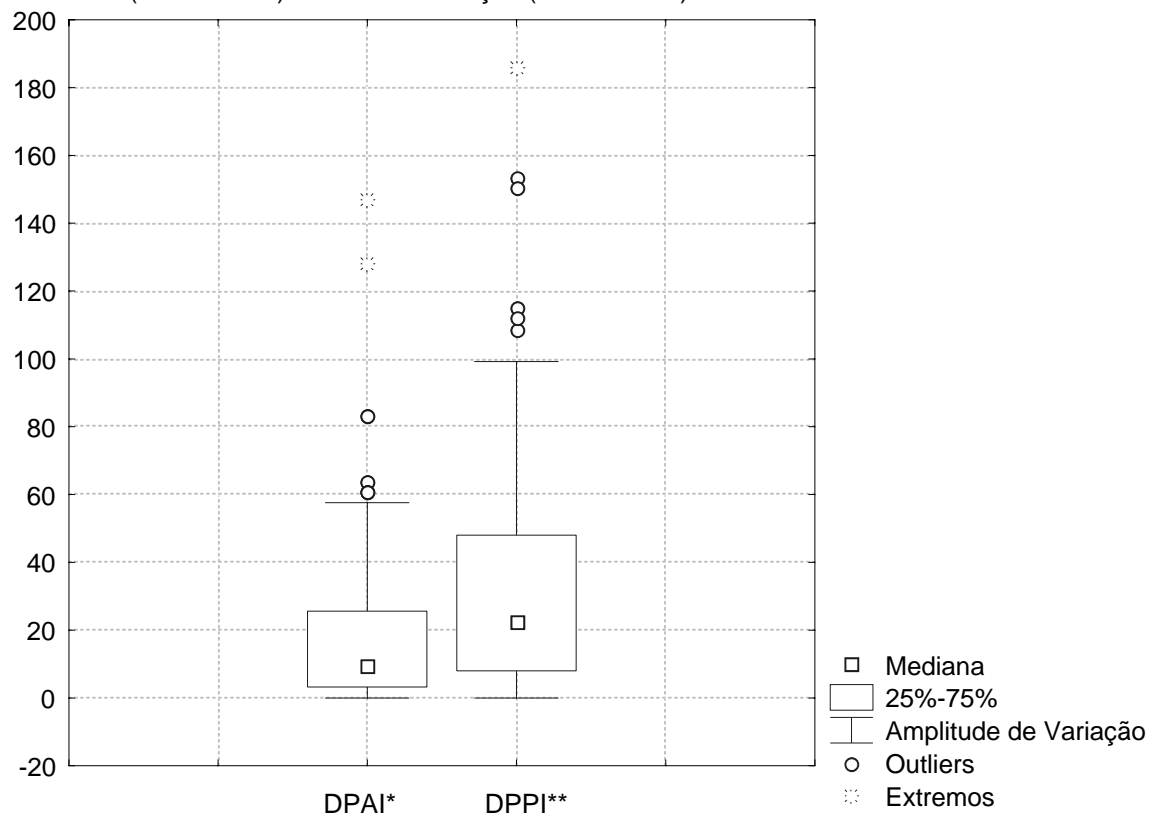


* DSAI: Derme superficial antes da infestação

** DSPI: Derme superficial após infestação

Figura 4B. Box plot de comparação entre medianas e valores obtidos antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* nas contagens de mastócitos em derme superficial de animais F_2 . Jaboticabal-SP, 2004.

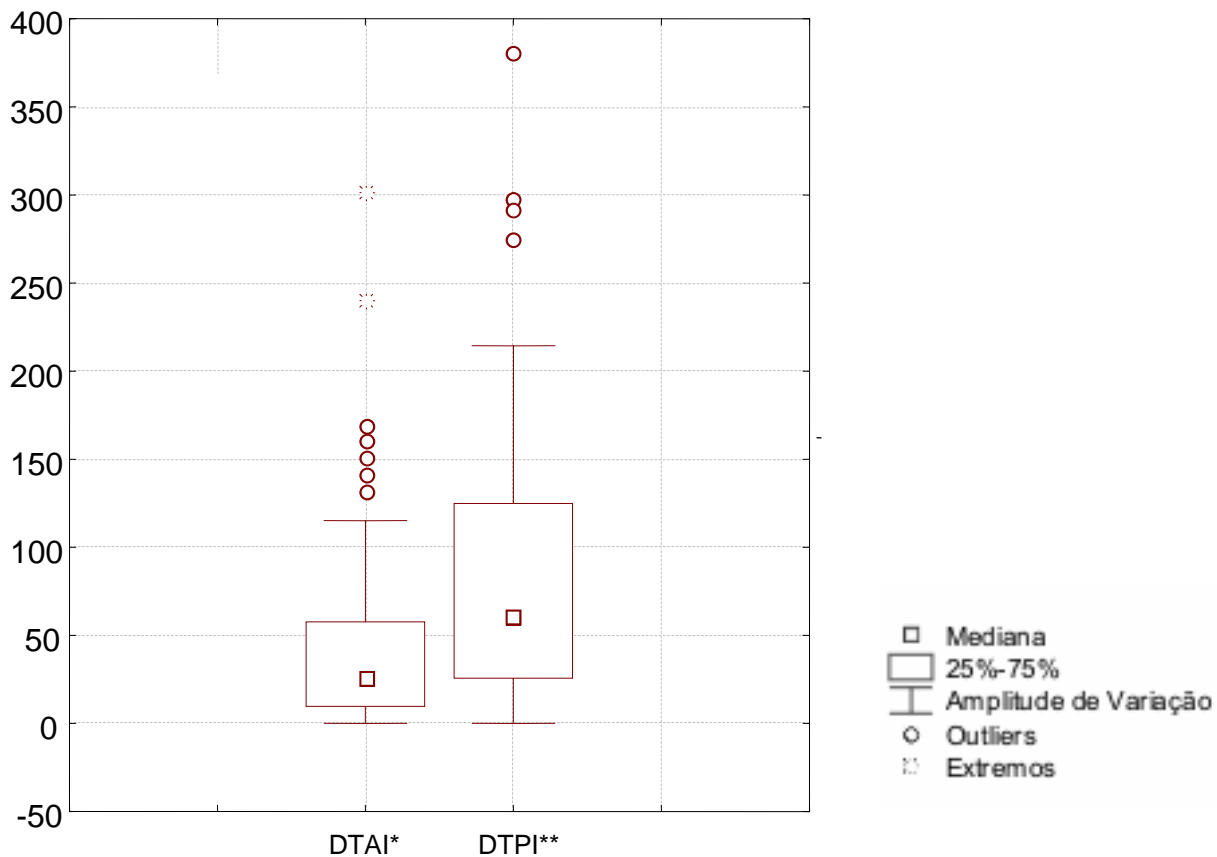
Comparativo do número de Mastócitos da Derme Profunda Pré-infestação (Mast.DPPré) com Pós-infestação (Mast.DPPós)



* DPAI: Derme profunda antes da infestação artificial

* DPPI: Derme profunda antes da infestação artificial

Figura 5B. Box plot de comparação entre medianas e valores obtidos antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* nas contagens de mastócitos em derme profunda de animais F_2 . Jaboticabal-SP, 2004.



*DTAI: Derme total antes da infestação artificial

**DTPI: Derme total pós-infestação artificial

Figura 6B. Box plot de comparação entre medianas e valores obtidos antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus* nas contagens de mastócitos em derme total (superficial + profunda) de animais F_2 . Jaboticabal-SP, 2004.

**APÊNDICE C : Comparação de número de mastócitos dérmicos entre
animais resistentes e susceptíveis**

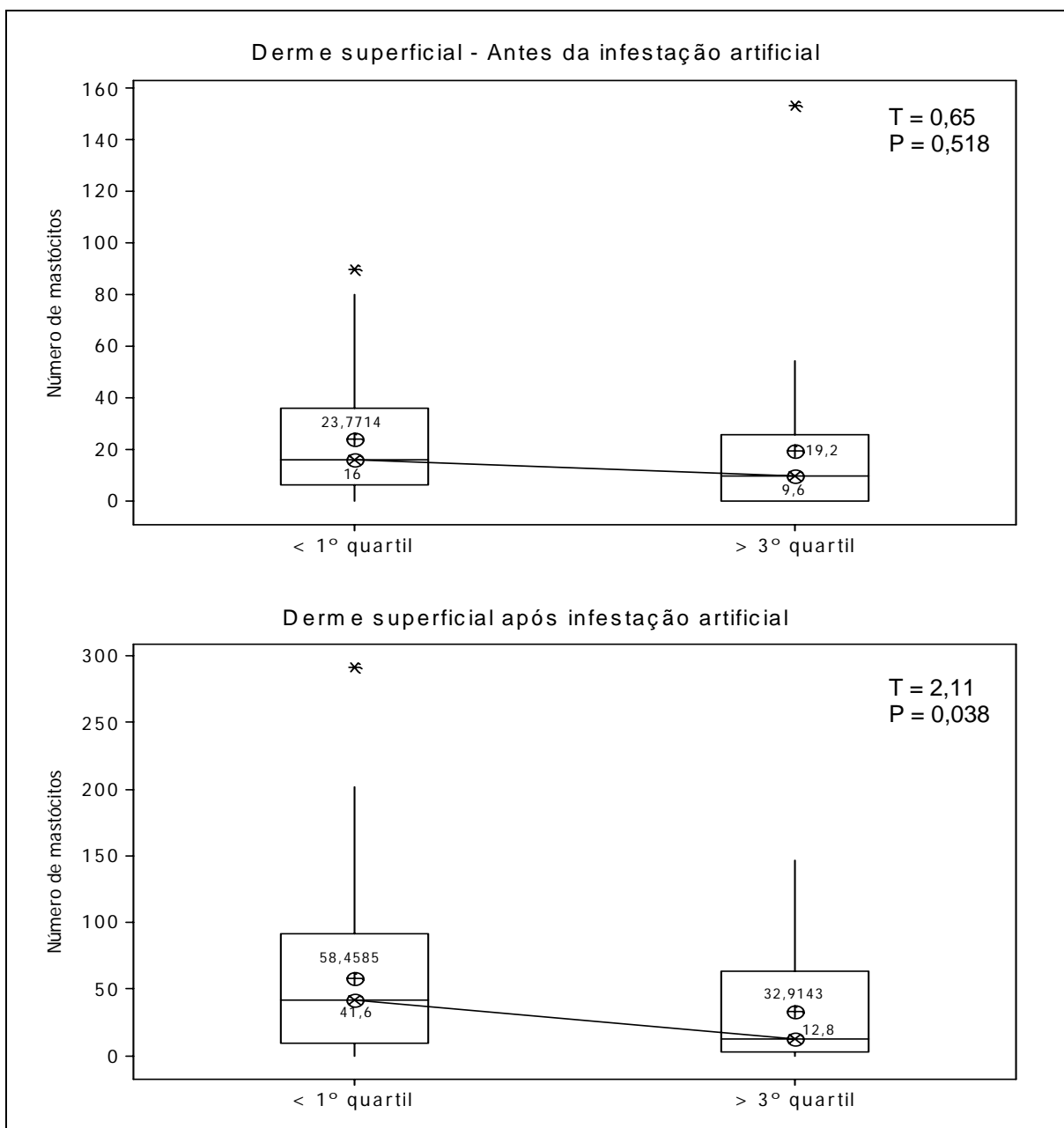


Figura 1C. Box plot de comparação entre animais resistentes e susceptíveis de medianas e valores obtidos de contagens de mastócitos em derme superficial. Biópsias colhidas de animais F₂ antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

T: Teste de Tukey

P < 0,05

⊕ : Mediana

⊕ : Média

□ : 25-75%

— : Amplitude de variação

* Outliers

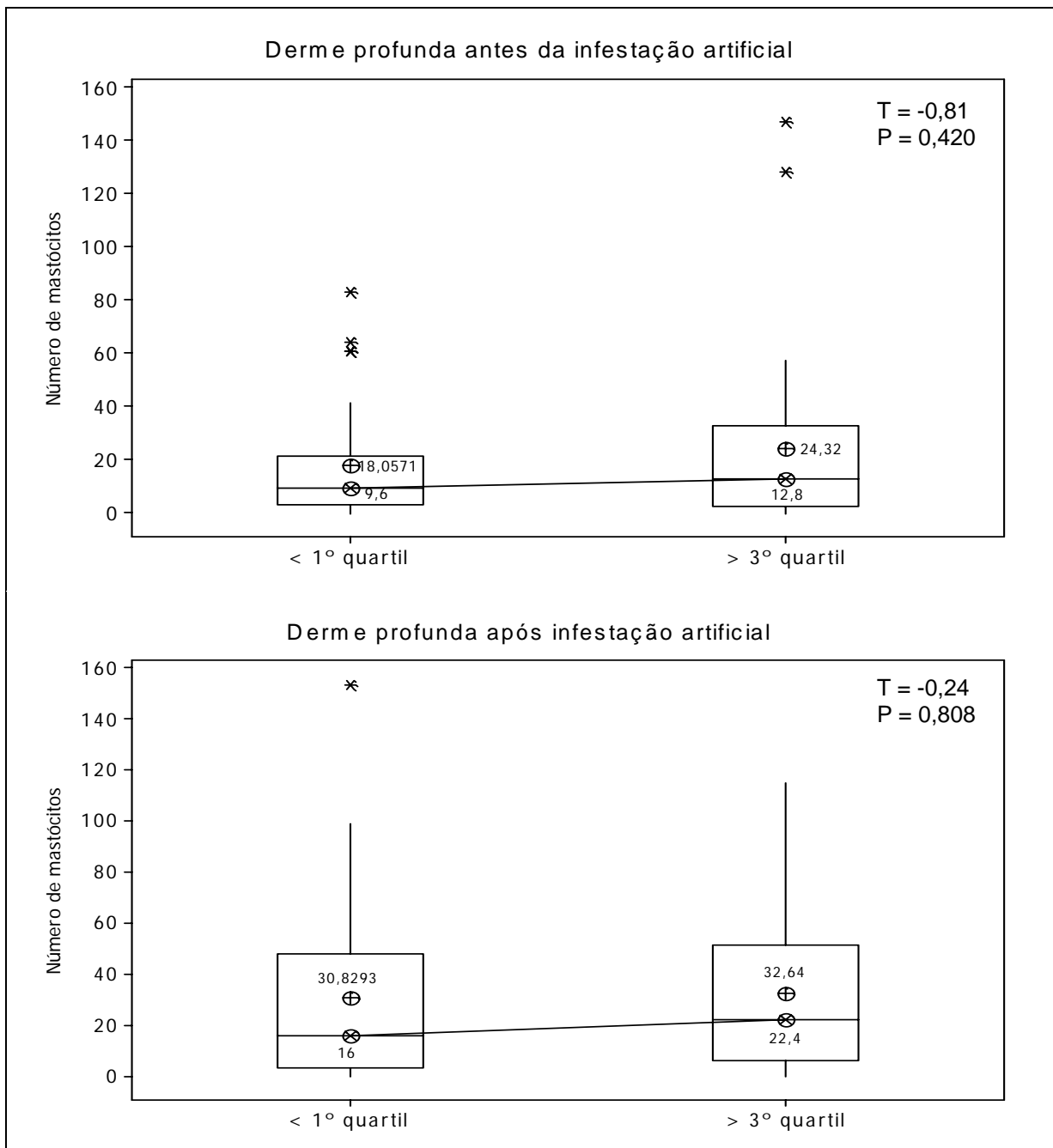


Figura 2C. Box plot de comparação entre animais resistentes e susceptíveis de medianas e valores obtidos de contagens de mastócitos em derme profunda. Biópsias colhidas de animais F₂ antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

T: Teste de Tukey

⊕ : Mediana

□ : 25-75%

* Outliers

P < 0,05

⊗ : Média

▭ : Amplitude de variação

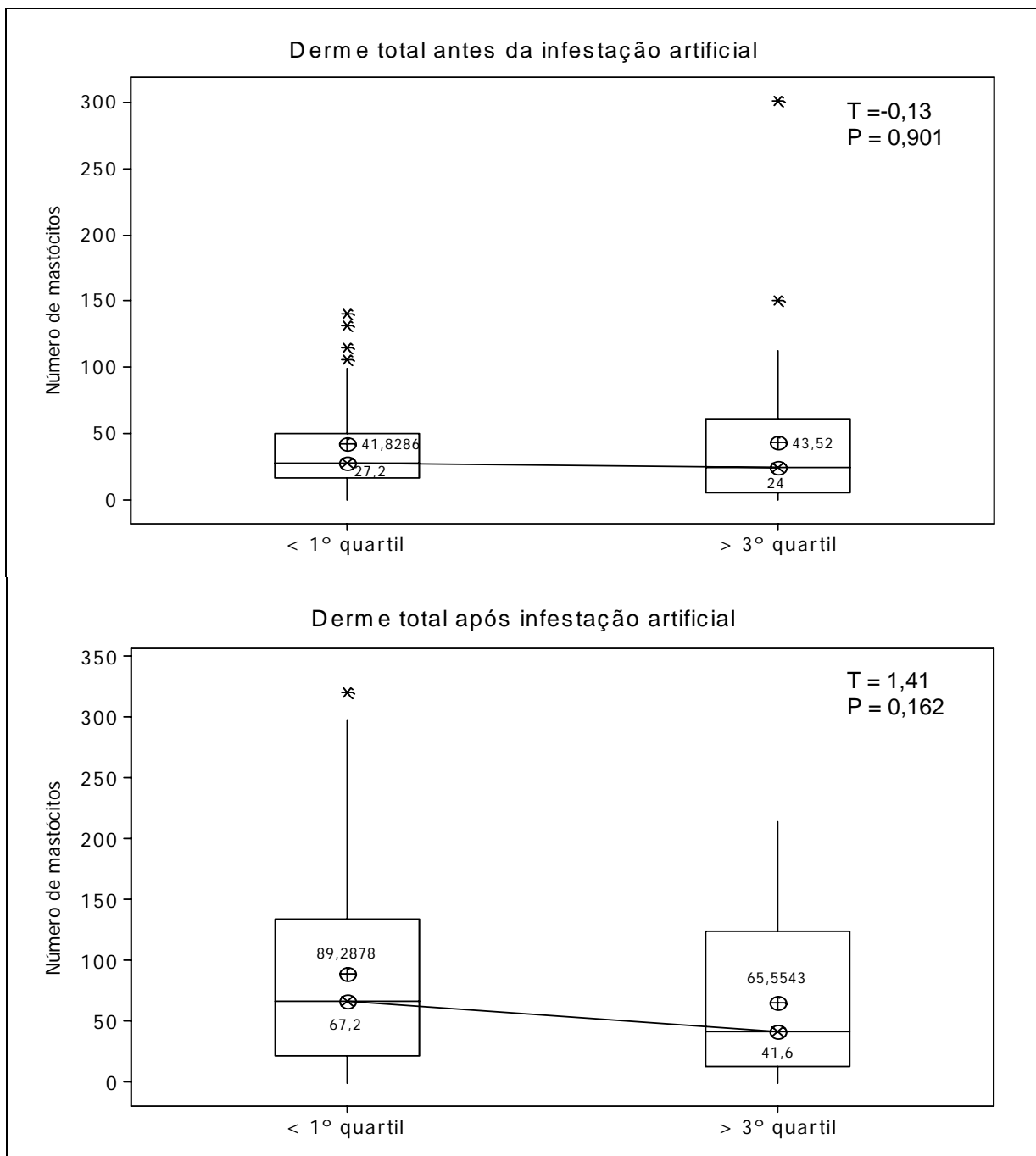


Figura 3C. Box plot de comparação entre animais resistentes e susceptíveis de medianas e valores obtidos de contagens de mastócitos em derme total. Biópsias colhidas de animais F₂ antes e após infestação artificial com $1,0 \times 10^4$ larvas de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

T: Teste de Tukey

P < 0,05

⊕ : Mediana

⊙ : Média

□ : 25-75%

— : Amplitude de variação

* Outliers

**APÊNDICE D : Comparação do número de mastócitos cutâneos entre
animais F₀, F₁ e F₂**

Tabela 1D. Contagens de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas de vacas Gir puras (F₀) sem infestação artificial de *B. microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo F ₀	Contagem pré-infestação (número de mastócitos / mm ²)		
	Derme Superficial	Derme profunda	Total
1	108,8	0	108,8
2	28,8	16	44,8
3	16	9,6	25,6
4	6,4	12,8	19,2
5	0	0	0
6	12,8	6,4	19,2
7	60,8	32	92,8
8	0	16	16
Média	29,2	11,6	40,8

Tabela 2D. Contagens de mastócitos cutâneos em biópsias colhidas de animais F₁ Gir x Holandês sem infestação artificial de *Boophilus microplus*. Jaboticabal-SP, 2004.

Grupo F ₁	Contagem pré-infestação (nº de mastócitos / mm ²)		
	Derme Superficial	Derme profunda	Total
1	115,2	38,4	153,6
2	16	3,2	19,2
3	44,8	51,2	96
4	32	3,2	35,2
5	70,4	9,6	80
6	32	6,4	38,4
7	16	0	16
8	16	0	16
9	19,2	6,4	25,6
10	12,8	28,8	41,6
11	67,2	32	99,2
12	83,2	3,2	86,4
13	28,8	6,4	35,2
15	38,4	22,4	60,8
16	0	0	0
17*	0	0	0
18	3,2	3,2	6,4
19	3,2	0	3,2
14	0	0	0
20	6,4	3,2	9,6
21	19,2	0	19,2
22	12,8	0	12,8
Média	26,53	9,07	35,60