UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA - EEL

RENATO DA SILVA TEIXEIRA

**Avaliação do efeito imunomodulador e carrapaticida de
micro-organismos probióticos em bovinos da
raça Girolando**

Lorena – SP
2017

RENATO DA SILVA TEIXEIRA

**Avaliação do efeito imunomodulador e carrapaticida de
micro-organismos probióticos em bovinos da
raça Girolando**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientação: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Teixeira, Renato da Silva

Avaliação do efeito imunomodulador e carrapaticida de micro-organismos probióticos em bovinos da raça Girolando / Renato da Silva Teixeira; orientador Ismael Maciel de Mancilha - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017.
106 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Probióticos. 2. Lactobacillus. 3. Rhipicephalus (boophilus) microplus. 4. Rgst-hl. 5. Bovinos. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

BIOGRAFIA

Renato da Silva Teixeira, filho de Luiz Cláudio Teixeira e Marli Lima da Silva Teixeira, nasceu em 28 de abril de 1987 na cidade de Volta Redonda - RJ.

Em 2008, concluiu o curso de graduação em Ciências Biológicas no Centro Universitário Geraldo Di Biase (UGB, Volta Redonda - RJ), tendo desenvolvido atividades em nível de iniciação científica e monitoria, no Laboratório de Microbiologia, focando suas pesquisas sobre probióticos, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto Sanches Pereira.

Em 2011, concluiu o curso de Pós-Graduação “*Latu Sensu*” em Análises Clínicas pelo Centro Universitário de Barra Mansa (UBM, Barra Mansa - RJ). Nesta mesma data, concluiu também a Pós-Graduação em nível de Mestrado, junto ao Programa em Biotecnologia Industrial, da Escola de Engenharia de Lorena – USP. Nesta oportunidade avaliou o efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos.

No ano de 2012, ingressou no doutorado, na mesma instituição, dando continuidade à linha de pesquisa com probióticos aplicados a saúde animal, sob a orientação do Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha.

Atualmente acumula os cargos públicos de professor da Secretaria de Educação do Estado do Rio de Janeiro e outro no Laboratório da Secretaria de Saúde do Município de Volta Redonda.

Possui experiência acadêmica no ensino superior, lecionando as disciplinas de Biotecnologia, Microbiologia, Imunologia e Anatomia e Fisiologia Humana, nos cursos de Ciências Biológicas, Enfermagem e Educação Física da Associação Educacional Dom Bosco – AEDB, situada no município de Resende - RJ, e no curso de Ciência Biológicas do Centro Universitário Geraldo Di Biase – UGB, situado na cidade de Volta Redonda – RJ, instituições com as quais mantém vínculo empregatício até a presente data.

Aos meus pais Luiz e Marli, por me darem o bem mais precioso, a oportunidade de estudar.

À minha futura esposa Kryseine, por compartilhar dos mesmos sonhos que os meus.

Esta conquista também pertence a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer de mim uma pessoa abençoada e por colocar “anjos” em minha trajetória de vida, para os quais vão os meus sinceros e eterno agradecimento.

Ao meu orientador, professor Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela confiança e atenção depositadas em mim, pelo exemplo de profissional e pelas orientações e ensinamentos transmitidos ao longo desses anos, os quais contribuíram para meu amadurecimento. Professor saiba que nunca esquecerei o quanto foi difícil essa caminhada, e de que graças a sua dedicação e esforço, as pedras foram retiradas me permitindo chegar até aqui.

A toda minha família, em especial aos meus pais, ao meu irmão Renann e aos meus avós. Em tempos onde as famílias estão acabando, eu tive a sorte de tê-los para receber princípios e valores que com certeza fizeram de mim uma pessoa de bom caráter. Como não sou ligado a religiões, agradeço também por vocês me incluírem em suas orações.

À Kryslaine (Krys), pelo amor e companheirismo dados constantemente. Como se não bastasse o seu incentivo, você participou diretamente deste projeto, foram dezenas de sábados dentro do laboratório com muito trabalho. Amor, como é bom saber que lutamos junto pelos mesmos objetivos, como é bom compartilhar os momentos da vida ao seu lado.

Aos meus sogros Edilamar e Luiza, por me tratarem como um filho.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Sanches Pereira. “Carlinhos” se hoje há brilho em meu caminho, foi porque você iluminou o início da minha trajetória. Se hoje consigo caminhar sozinho, foi porque você estendeu as mãos para eu dar os primeiros passos. Se hoje colho bons frutos, foi porque você plantou a semente da minha árvore. Saiba que tudo que fez por mim está “guardado debaixo de sete chaves dentro do coração”.

Ao professor Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior da UFRGS, que mesmo sem me conhecer pessoalmente, não mediu esforços para me ajudar e orientar na parte de imunização. Ao professor Dr. Luís Fernando Parizi, pela preparação das vacinas. Sem o auxílio de vocês meu projeto não sairia do papel.

Ao proprietário da Fazenda São Francisco, Dr. Benedito Marcondes Neto, por ceder gentilmente o espaço e os animais, permitindo a execução deste trabalho. Aos funcionários Fábio Miguel, Leandro Aparecido de Souza e especialmente ao Sr. João Miguel e ao José Roberto Soares, pela dedicação durante todo o experimento, sem a ajuda de vocês no manejo dos animais, o trabalho seria impossível.

A todos os professores que durante minha vida escolar deram sua parcela de contribuição, especialmente ao professor Dr. Mauro Sérgio Cruz Souza Lima da UFPI, por servir de espelho para mim.

Ao Centro Universitário Geraldo Di Biase, por ter cedido o espaço para as análises. A amiga Josely Alvarenga do Laboratório, por cuidar de todos os materiais que precisei.

Aos membros da banca, pelas contribuições que enobreceram o meu trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que verdadeiramente torcem por mim.

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar”;
É melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final;
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder;
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

RESUMO

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito imunomodulador e carrapaticida de micro-organismos probióticos em bovinos da raça Girolando**. 2017. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.

A infestação por carrapatos é uma das principais parasitoses que afetam a bovinocultura prejudicando a saúde do animal por meio de hábito hematófago, além de gerar perdas econômicas para o seu controle, sendo o uso de carrapaticidas o principal método utilizado. O uso negligenciado destes produtos induz a geração de resistência tornando necessário o desenvolvimento de métodos alternativos, como a imunização por vacinas e o uso de probióticos. Probióticos são alimentos funcionais, compostos de micro-organismos vivos, que quando ingeridos em doses adequadas e com frequência, conferem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro por meio de diferentes mecanismos de ação. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito imunomodulador e carrapaticida de micro-organismos probióticos em bovinos da raça Girolando. Para tanto, durante 154 dias, foram estudados 30 animais distribuídos em 06 grupos e submetidos a diferentes tratamentos, a saber: Grupo A (controle) os animais não receberam tratamento específico; Grupo B (efeito vacina) nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram imunizados com a proteína rGST-HI; Grupo C (efeito probiótico EEL) os animais receberam, durante 70 dias, uma dose diária de 10 mL, da preparação probiótica EEL; Grupo D (efeito vacina + probiótico EEL) nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram vacinados e receberam durante 70 dias, 10 mL da preparação probiótica EEL; Grupo E (efeito probiótico PT) os animais receberam, durante 70 dias, uma dose de 10 mL da preparação probiótica ProbioTick e Grupo F (efeito vacina + probiótico PT) nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram vacinados e receberam diariamente, durante 70 dias, 10 mL da preparação probiótica ProbioTick. A cada 14 dias foram realizadas coletas de sangue para avaliação da hemostasia, do estado de anemia e o desenvolvimento da resposta imune humoral. Os resultados demonstraram que os tratamentos não afetaram significativamente a hemostasia, bem como os parâmetros eritrocíticos dos animais. No tocante ao sistema imunológico, verificou-se que os animais tratados com as preparações probióticas apresentaram maior número de linfócitos quando comparado ao grupo controle diferindo estatisticamente no 70º dia, sendo que os percentuais encontrados para os grupos C, D, E e F foram respectivamente de 55,8%; 63,5%; 60,8% e 59,4%. Os animais que foram vacinados (grupo B) e tratados com as preparações probióticas (Grupos D e F), apresentaram níveis superiores de anticorpos totais IgG (72,769; 93,735 e 98,825 mg/dL) e quanto aos anticorpos IgG anti rGST-HI, os animais dos Grupos D e F tiveram seus valores aumentados quando comparados aos do Grupo B por um período mais prolongado, onde no 98º dia, as densidades ópticas medidas foram de 0,868 e 0,915. Desta forma, conclui-se que as preparações probióticas foram capazes de modular a resposta imunológica dos animais.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. rGST-HI. Bovinos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, R. S. **Evaluation of the immunomodulatory and acaricide effect of probiotic microorganisms in Girolando cattle.** 2017. 106 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.

Tick infestation is the main parasitic diseases that affect the cattle farming. In addition to impairing the health of the animal by means of a hematophagous habit, it also generates economic losses regarding its control, being the use of acaricides the main method used. Its neglected use has led to cases of resistance, which turn necessary the development of alternative methods such as the immunization with vaccines and the use of probiotics. Probiotics are functional food that contains live microorganisms that when ingested in appropriate amount bring benefits to the hosts through different mode of action. Thus, the present work aimed to evaluate the immunomodulatory and acaricide effect of probiotic microorganisms in Girolando cattle. Therefore, during 154 days, 30 animals were distributed in 6 groups, and submitted to different treatments: Group A (control), the animals did not received any treatment. Group B (vaccine effect), on the initial, 14 and 28 days, the animals were immunized with rGST-H1. Group C (probiotic effect EEL, the animals received, for 70 days, a daily dose of 10 mL of the probiotic EEL preparation. Group D (vaccine + probiotic EEL effect), on the initial, 14 and 28 days, the animals were vaccinated and received for 70 days, 10 mL probiotic preparation EEL. Group E (probiotic effect PT), the animals received, for 70 days, a dose of 10 mL of probiotic preparation ProbioTick and Group F (vaccine + PT probiotic effect), on the initial, 14 and 28 days, the animals were vaccinated and received daily for 70 days, 10 mL ProbioTick. In each 14 days blood samples were collected and exams were performed to evaluate hemostasis, anemia status and development of the immune response. The results showed that the different treatments did not affect hemostasis and the erythrocytic parameters of the animals. Regarding the immune system, the results showed that the animals treated with probiotic preparations presented a higher number of lymphocytes when compared to the control group, differing statistically on the 70th day, being that the percentages found for groups C, D, E and F were respectively 55.8%; 63.5%; 60.8% and 59.4%. In addition, animals treated with the probiotic (Groups D and F) and vaccinated (B) showed higher levels of total IgG antibodies (72.769, 93.735 and 98.825 mg/dL) and as for the IgG anti rGST-H1 antibodies, only the animals in Groups D and F had their values increased for a longer period, where on the 98th day, The optical densities measured were 0.868 and 0.915. Therefore, the probiotic preparations evaluated were able to modulate the immune response of animals.

Keywords: Probiotics. *Lactobacillus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. rGST-H1. Cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeitos dos probióticos no sistema imune.	32
Figura 2 – Dimorfismo sexual do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	35
Figura 3 – Ciclo biológico do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	36
Figura 4 – Visão geral dos processos fisiológicos do carrapato com destaque para as moléculas passíveis de serem avaliadas como vacina	43
Figura 5 – Esquema do delineamento experimental empregado.	48
Figura 6 – Concentração de hemoglobina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos	59
Figura 7 – Percentual de hematócrito no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos	59
Figura 8 – Cinética de produção de IgG sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos	67
Figura 9 – Cinética de produção de IgM sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos	68
Figura 10 – Cinética de produção de IgG específica anti rGST-HI sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas de micro-organismos probióticos usados como aditivos na alimentação animal autorizados pelo MAPA.....	22
Tabela 2 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de plaqueta ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	53
Tabela 3 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do tempo de protrombina (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos	54
Tabela 4 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do tempo de tromboplastina parcial ativada (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos	55
Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	58
Tabela 6 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem global de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.....	61
Tabela 7 – Valores médios da frequência relativa de linfócitos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos	62
Tabela 8 – Valores médios da frequência relativa de eosinófilos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 PROBIÓTICOS	20
2.1.1 Probióticos na saúde animal	24
2.1.2 Efeito antiparasitário	27
2.1.3 Efeito imunomodulador	31
2.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	35
2.2.1 Ciclo biológico	36
2.2.1.1 Fase de vida livre	36
2.2.1.2 Fase parasitária	37
2.2.2 Epidemiologia	37
2.2.3 Patogenia	39
2.2.4 Controle e tratamento	40
2.2.4.1 Controle imunológico	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 ANIMAIS	46
3.2 MICRO-ORGANISMOS	46
3.3 PREPARAÇÃO PROBIÓTICA EEL	46
3.4 IMUNIZAÇÃO	47
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	49
3.6.1 Determinação do TP e TTPa	49
3.6.2 Hemograma e contagem de plaquetas	50
3.6.3 Detecção de IgG e IgM total	50
3.6.4 Detecção de IgG anti rGST-HI	50
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA	52
4.2 AVALIAÇÃO DO TECIDO HEMATOPOÉTICO	57
4.2.1 Eritrograma	57
4.2.2 Leucograma	61

4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	66
5 CONCLUSÕES	72
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	94
APÊNDICES.....	95

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma das mais importantes fontes geradoras de riquezas do Brasil, sendo que no setor pecuário, destacam-se a avicultura, bovinocultura e suinocultura, fazendo o país figurar entre um dos líderes mundiais em produção e exportação. Segundo estudo realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016), estima-se que a produção de carne deve passar de 26,2 milhões de toneladas em 2016 para 34,1 milhões em 2026, um acréscimo de 29,8%. Especificamente, projeta-se um aumento de 34,6% na produção de carne de frango, 21% na de carne bovina e 31,3% na de carne suína. No entanto, para se manter no mercado internacional por um período mais duradouro, é fundamental que o país consiga sanar os principais entraves impostos ao produto brasileiro, como por exemplo, as condições sanitárias do rebanho e o atendimento às exigências dos consumidores quanto à qualidade da carne e derivados.

No tocante às condições sanitárias do rebanho destaca-se a infestação por carrapatos que são ectoparasitos hematófagos que causam enormes prejuízos aos sistemas de produção e ganha maior relevância diante da intensificação do sistema de criação. Além de afetar diretamente a produção animal por meio de sua ação espoliativa e da transmissão de doenças, para seu controle, os produtores são obrigados a desembolsar valores significativos para a aquisição de insumos e gastos com mão-de-obra. No Brasil estima-se que a cada ano, devido a infestação por carrapatos, gasta-se aproximadamente U\$ 968 milhões de dólares, sendo responsável pelo decréscimo de 40% na produção leiteira (RODRIGUES; LEITE, 2013). Grisi et al. (2014), considerando o número total de animais em risco e os efeitos negativos do parasitismo sobre a produtividade do gado, afirmam que este valor pode chegar a U\$ 3,24 bilhões de dólares.

O uso de carrapaticidas é o principal método de controle utilizado, devendo ser levado em consideração que esses produtos nem sempre são utilizados de maneira correta acarretando diversos outros problemas. Segundo Furlong (2005), observa-se negligência quanto à conservação, validade, dose e aplicação destes produtos, levando a inúmeros casos de resistência dos carrapatos em relação aos respectivos princípios ativos. Salienta-se ainda a toxicidade aos próprios animais e ao ser humano, interferindo na saúde do aplicador além da possibilidade de deixar resíduos na carne, leite, derivados e no meio ambiente. Neste contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos para o controle deste parasito.

Probióticos são considerados alimentos funcionais, compostos de micro-organismos vivos, que quando ingeridos em doses adequadas e com frequência, trazem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Neste contexto, destacam-se principalmente, a modulação da microbiota do trato gastrointestinal e a estimulação da imunidade pelo aumento dos níveis de anticorpos, citocinas e atividade dos macrófagos. Assim, animais tratados com probióticos poderão ter suas condições de saúde preservadas, tornando menos susceptíveis à infestação por parasitos, reduzindo custos para o produtor e melhorando a qualidade de vida do animal, bem como dos produtos derivados.

O uso de probióticos em animais visando o combate de endoparasitos vem sendo estudado e tem revelado resultados promissores no tocante ao efeito antiparasitário apresentado por cepas específicas de *Lactobacillus* (PEREIRA, 2007; COUTINHO, 2008; COELHO, 2010; TEIXEIRA, 2011; FREITAS, 2011; COUTINHO 2012), porém, para o controle de ectoparasitos as pesquisas são escassas. Desta forma, o uso de micro-organismos probióticos juntamente com um antígeno purificado, pode ser considerado um método alternativo no combate aos carrapatos, por meio da indução da resistência dos bovinos frente a esses parasitos por meio da imunidade.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação de espécies de lactobacilos, que apresentam propriedades probióticas, como agentes imunomoduladores e antiparasitários em bovinos da raça Girolando. Especificamente avaliou-se o efeito de preparações probióticas associado à imunização com vacina composta por glutathione S-transferase *Haemaphysalis longicornis* (rGST-HI), sobre a hemostasia dos bovinos; o tecido hematopoiético dos animais; bem como a resposta imune humoral contra carrapatos, por meio da dosagem dos níveis séricos de anticorpo IgG anti glutathione S-transferase (GST-HI), IgG e IgM totais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

O interesse sobre os probióticos foi incrementado provavelmente no ano de 1908 quando Eli Metchnikoff sugeriu que a longevidade dos camponeses búlgaros era resultado do consumo de bebidas lácteas fermentadas. Atribui-se a Lilly e Stillwell a primeira definição do termo probiótico, em 1965 eles o definiram como sendo o antônimo de antibiótico, ou seja, “uma substância produzida por um micro-organismo capaz de estimular o crescimento de outro micro-organismo”. No ano de 1974, Parker propõe uma versão diferente, “organismos e substâncias que contribuíam para o equilíbrio microbiano intestinal”. Seguindo esta linha, Fuller, em 1989, destacou o fato que para ser considerado probiótico, o micro-organismo em questão devia estar presente em estado viável e introduziu a ideia de ter um efeito benéfico para o hospedeiro (NOGUEIRA; GONÇALVES; 2011). Atualmente, a definição internacionalmente aceita foi proposta pela OMS, onde probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Várias espécies de micro-organismos são utilizadas em preparações probióticas, sendo a maioria pertencentes ao filo Firmicutes, consideradas bactérias do ácido-lático, com destaque para espécies do gênero *Lactobacillus* e em menor escala para *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Embora o gênero *Bifidobacterium*, outro de grande destaque assim como o *Lactobacillus*, pertença a outro filo taxonômico, Actinobacteria, é considerado por muitos cientistas como sendo bactérias do ácido-lático (STOLAKI et al., 2012). No entanto, outras bactérias como *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Escherichia coli* cepa Nissle, leveduras do gênero *Saccharomyces* e o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, também têm sido utilizados como probióticos (COPPOLA; TURNES, 2004; GUPTA; GARG, 2009; RAIZEL et al., 2011; SHARMA et al., 2014).

Segundo Holzapfel e Schillinger (2002) para serem selecionados como probióticos, os micro-organismos devem ser resistentes a baixo pH e aos sais biliares, apresentar a capacidade de persistir no intestino, aderir no epitélio evitando a eliminação pelo peristaltismo, resistir a fagos e serem inócuos. Lauzon et al. (2014) acrescentam ainda,

como um critério essencial, que eles devem ser livres de genes de resistência presentes em plasmídeos. Quanto à área produtiva os micro-organismos utilizados devem ser resistentes às condições de processamento industrial, a forma de armazenamento e permanecer viável até a data de validade (TRIPATHI; GIRI, 2014).

De acordo com Collado et al. (2007), como cada micro-organismo apresenta característica própria, um produto preparado com uma combinação de cepas probióticas, pode aumentar os benéficos sobre o hospedeiro quando comparado a preparados com uma única cepa, isso porque ocorre um efeito sinérgico.

A quantidade ideal de micro-organismos probióticos a ser administrada não é fácil de ser determinada. Acredita-se que dependa do tipo de efeito benéfico esperado e é específica para cada cepa, portanto, efeitos diferentes podem exigir cepas probióticas e quantidades diferentes. Além disso, outros fatores podem estar envolvidos incluindo a frequência diária, o período (antes, durante ou após as refeições) e a duração da administração, e o veículo utilizado (alimento fermentado, bebida, cápsula, comprimido ou pó) (AURELI et al., 2011). Em geral, os produtos que possuem eficácia comprovada apresentam um número mínimo de micro-organismos estimado entre 10^6 e 10^8 UFC/g de produto final ou entre 10^8 e 10^{10} UFC/dia (considerando 100 g ou 100 mL de produto ingerido), esses números servem de base para recomendações de diversas legislações ao redor do mundo, como no Brasil que preconiza 10^8 a 10^9 UFC/dia (CHAMPAGNE et al., 2011).

No Brasil, os produtos probióticos destinados à alimentação animal são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em sua Instrução Normativa 13/2004, onde são incluídos na categoria de aditivos zootécnicos equilibradores da microbiota intestinal, os quais devem cumprir diversos requisitos para entrarem no mercado, dentre eles, pode-se destacar a designação taxonômica da espécie do micro-organismo utilizado, informação do local da coleção de culturas onde a cepa está registrada, indicação se a cepa é manipulada geneticamente, número de UFC/g de produto, apresentação de dados comprobatórios da eficácia, inocuidade e estabilidade para o prazo de validade proposto e recomendação das condições de utilização (BRASIL, 2004).

Vale ressaltar que para o uso da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em seres humanos, os produtos devem seguir a resolução da ANVISA, RDC nº02/02 (BRASIL, 2008).

A lista dos micro-organismos probióticos autorizados pelo MAPA para uso como aditivos na alimentação animal encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Cepas de micro-organismos probióticos usados como aditivos na alimentação animal autorizados pelo MAPA.

ESPÉCIES	CEPAS
<i>Aspergillus oryzae</i>	(ATCC 14895)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(CECT 5940)
<i>Bacillus cereus</i>	(CBMAI 988)
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	(NCIMB 40112)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(DSM 5749)
<i>Bacillus natto</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 2107, ATCC PTA-2084; ATCC PTA-6507; CBMAI 611; CBMAI 926; CCT 0089; DSM 15544; DSM 5750; KCCM 10941; NRRL B-50013; NRRL B-50104; PTA-6737)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	(DSM 16284; DSM 15954)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	(ATCC 29521; ATCC 5860; CBMAI 954; DSM 20456)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	(NIBH 15225; CCT 7502)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	(FERM P-21659)
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	(ATCC 25525; NIBH 15226)
<i>Enterococcus faecium</i>	(ATCC 19434; ATCC 27270; ATCC 5843; CBMAI 924; CCT 5084; CCT 6646; DSM 16211; DSM 16567; DSM 4789; DSM 7134; NCIMB 10415; NCIMB 11181; NIBH 15221)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	(ATCC 33199; ATCC 43121; ATCC 4356; ATCC 53672; ATCC 5864; BCRC 10695 – AY7 73947; CBMAI 923; CBMAI 987; CCT 2949; CCT 3258; DSM 13241; NIBH 15224)
<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	(CCT 3746)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(PHL/LAB-ID 18; PHL/LAB-ID 24; PHL/LAB-ID 27)
<i>Lactobacillus casei</i>	(ATCC 334; ATCC 7469; ATCC 55578; ATCC 5858; CCT 1465; CCT 393; PHL/LAB-ID 29; PHL/LAB-ID 40)
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	(PHL/LAB-ID 36; PHL/LAB-ID 52)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	(CCT 43121)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	(ATCC 11842)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	(PHL/LAB-ID 37B; PHL/LAB-ID 44; PHL/LAB-ID 46)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	(SD 6236)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	(PHL/LAB-ID 48)
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<i>Lactobacillus lactis</i>	(CCT 1344)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(ATCC 14917; ATCC 55576; ATCC 55577; CCT 2568)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	(DSM 1635; FERM BP-8052)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	(DSM 16351)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	(ATCC 5866; CCT 1622; DSM 16210)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Ruminobacter amylophilum</i>	(CBMAI 927)
<i>Ruminobacter succinogenes</i>	(CBMAI 928)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(ATCC 18824; ATCC 7752; ATCC MYA-796; CBMAI 537; CBS 493.94; CCTCC M207177; NCYC 996; NCYC SC 47; SD-6310)
<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	(ATCC 19258)
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	(CBMAI 929)

Fonte: (BRASIL, 2011).

Os probióticos têm sido constantemente avaliados considerando sua ação reguladora da microbiota intestinal e manutenção do equilíbrio entre a microbiota benéfica e micro-organismos que se tornam patogênicos no intestino (NEUMANN et al., 2008). Mecanismos de ação como competição por sítios receptores na superfície intestinal, competição por nutrientes, excreção de compostos com atividade antimicrobiana, estimulação do sistema imunológico através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos e alteração do metabolismo microbiano através do aumento ou diminuição da atividade enzimática, tem sido relatados como propriedades que devem ser apresentadas pelos micro-organismos probióticos (DUGGAN; GANNON; WALKER, 2002; SAAD, 2006; GARCIA, 2008).

Os micro-organismos probióticos ocupam os sítios de ligações (receptores) na mucosa intestinal através da adesão e colonização, formando um tipo de barreira física, que evita a aderência dos micro-organismos indesejáveis. Assim, esses micro-organismos não conseguem se ligar a esses receptores e consequentemente são excluídos pela competição (LAVERMICOCCA et al., 2005; XU et al., 2009).

Dentre os compostos antimicrobianos produzidos pelos micro-organismos probióticos encontram-se os ácidos orgânicos, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Axe e Bailey (1995) acreditam que o efeito inibidor dos ácidos é principalmente causado pela penetração dessas moléculas na forma não dissociada, que são facilmente solúveis através da membrana celular, dos micro-organismos susceptíveis, para o citosol mais alcalino. Eventualmente, este fluxo contínuo interfere na permeabilidade da membrana e impede a fosforilação oxidativa a partir do sistema de transporte de elétrons. Este fluxo gera também o aumento de ânions intracelular, levando à acidificação do conteúdo celular, inibição da produção final do metabolismo e ATP, além de promover a perda de atividade de água, causando a morte da célula.

Segundo Cadenas (1989), o peróxido de hidrogênio causa “stress” oxidativo às células bacterianas podendo levar a alterações em componentes presentes na membrana celular como proteínas e lipídios, causando a morte da célula.

Diferentes mecanismos de ação das bacteriocinas têm sido propostos, destacando-se alteração da atividade enzimática, inibição da germinação de esporos e formação de poros na membrana citoplasmática desfazendo sua permeabilidade seletiva (DEEGAN et al., 2006). A formação de poros é o principal mecanismo, e acontece inicialmente pela atração eletrostática entre os fosfolipídios aniônicos presentes na membrana da célula alvo e a carga positiva das bacteriocinas, sendo que esta interação permite que as bacteriocinas se

insiram na bicamada fosfolipídica e se agreguem lateralmente promovendo a formação dos poros.

Consequentemente, a formação de poros resulta em ação sobre a permeabilidade da membrana, causando a perda de íons (principalmente íons fosfato, potássio e magnésio) e como consequência ocorre a dissipação da força próton-motriz, que está envolvida diretamente na síntese de ATP, fosforilação de proteínas e rotação dos flagelos. Na tentativa de manter a força próton-motriz, a célula afetada perde até 98% de ATP os quais são hidrolisados resultando morte celular (BRUNO; MONTVILLE, 1994).

Segundo Coppola e Turnes (2004) inúmeras evidências demonstram que os probióticos têm efeito imunoestimulante em animais e no homem. Acredita-se que este efeito pode estar relacionado à capacidade dos micro-organismos probióticos de interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando os linfócitos B produtores de IgA e a migração dos linfócitos T no intestino, favorecendo a atividade fagocítica dos macrófagos, o aumento da atividade das células NK (natural-killer) e o aumento nos níveis de citocinas e imunoglobulinas (SAAD, 2006). Kemgang et al. (2014) afirmam que apesar deste mecanismo ainda não estar completamente elucidado, as células do epitélio intestinal, os macrófagos, as células dendríticas e os linfócitos são todos influenciados diretamente pelos micro-organismos probióticos.

2.1.1 Probióticos na saúde animal

A importância de uma microbiota gastrointestinal saudável tem levado diversos pesquisadores a avaliar o desempenho de diversas cepas de micro-organismos probióticos, como promotores da saúde. Administrados como suplementos dietéticos, seu uso tem sido associado à melhoria da saúde animal quanto à melhora da função e morfologia do trato gastrointestinal, o aumento da resistência a doenças, melhor desempenho zootécnico e reprodutivo, redução na mortalidade perinatal e melhor função do sistema imune (YEOMAN; WHITE, 2014). Estudos recentes demonstram ainda que os probióticos parecem ter eficácia quanto à melhora de distúrbios psíquicos comportamentais como ansiedade, depressão, transtorno obsessivo compulsivo e memória (WANG et al., 2016).

Analisando a morfometria da parede intestinal e a dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos de corte suplementadas com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102, Rocha, Barros e Evencio Neto (2016) verificaram por análises histoquímicas, uma maior quantidade de sialomucinas presentes no jejuno dos animais que foram suplementados com

probiótico quando comparados com os animais do grupo controle (GA), bem como o número de células caliciformes. De acordo com Furlan (2010) as células caliciformes presentes nas vilosidades e criptas possuem importante papel no epitélio intestinal, pois são secretoras de muco, cujo componente principal são as mucinas glicoproteicas. A camada de muco que recobre o epitélio, o protege contra atritos provocados pela passagem de alimentos, ação das enzimas digestivas e do suco gástrico e micro-organismos patogênicos.

Ávila et al. (2000) estudando a eficiência de um probiótico no controle de diarreia em bezerros, demonstraram que o número de casos de diarreia foi de 30% entre os animais tratados e 68,9% nos animais controle. Dentre os que receberam o probiótico e ainda assim apresentaram diarreia, foi observado um predomínio de *Escherichia coli* nas fezes e o isolamento de *Lactobacillus* e *Streptococcus* foi dificultado, entretanto, nos animais sem diarreia ocorreu o contrário, confirmando que as bactérias probióticas foram capazes de impedir a colonização intestinal pela *Escherichia coli*.

Ao estudarem a eficácia da adição de uma preparação probiótica constituída por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Enterococcus faecium*, ao leite sem resíduos antimicrobianos e ao leite de vacas em tratamento de mastite, sobre a saúde de bezerras, Batista et al. (2008) observaram que a adição ao leite sem resíduo antimicrobiano reduziu significativamente a incidência de diarreias nos animais, em comparação aos que receberam o leite sem probiótico. O mesmo não ocorreu quando se avaliou leite de vacas tratadas contra mastite, demonstrando a possível sensibilidade dos micro-organismos probióticos aos compostos antimicrobianos ativos no leite. Os mecanismos apontados como causadores do efeito de redução de diarreias foram a exclusão competitiva e a estimulação do sistema imune das bezerras, uma vez que os agentes causadores de diarreia identificados nas fezes foram todos intracelulares: *Cryptosporidium*, Rotavírus e Coronavírus, que precisam invadir as microvilosidades intestinais para causarem danos.

Rivulgo et al. (2016) ao administrarem probiótico composto de *Enterococcus faecalis* CECT7121 em potros recém-nascidos durante os 6 primeiros dias de vida, observaram que nenhum animal apresentou casos de diarreia, diferentemente do grupo controle, em que 4 dos 10 animais apresentaram este quadro.

Ao avaliar o potencial probiótico de *Lactobacillus fermentum* AD1 sobre a saúde de cães, Stropfová et al. (2006) demonstraram um aumento significativo do nível sérico de proteínas nos animais que receberam o micro-organismo quando comparados aos animais do grupo controle, provavelmente devido ao melhor aproveitamento e absorção de aminoácidos na alimentação. Scholz-Ahrens et al. (2016) ao tratarem ratas

ooforectomizadas com um simbiótico específico (oligofrutose + goma arábica + *L. acidophilus* NCC90), observaram que a perda de mineralização óssea foi prevenida, os autores associaram este efeito benéfico a um aumento da capacidade de fermentação, que reduz o pH intestinal e do aumento do peso e da área de superfície do intestino grosso, fatores que contribuem para melhoria de absorção de minerais, como cálcio e fósforo.

De acordo com Loddi et al. (2000) devido a essas propriedades, o uso dos probióticos é uma alternativa para a substituição dos antibióticos, que, a partir dos anos 50 passaram a ser utilizados como agentes terapêuticos e promotores de crescimento em animais domésticos. Entretanto, o uso dos antibióticos tem sido restringido em diversos países, em virtude da possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada e da emergente exigência dos países importadores de produtos livres de resíduos de antibióticos (UTIYAMA et al., 2006). Os prováveis substitutos dos antibióticos, como alternativa para os promotores de crescimento de animais domésticos, devem manter as ações benéficas dos antibióticos e minimizar as indesejáveis, como a resistência bacteriana.

Bernardeau, Vernoux e Gueguen (2002) utilizando *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B e *L. acidophilus* MA27/6R na dieta de camundongos jovens, relataram um aumento no ganho de peso de 28,9% e 31,7%, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle que só recebiam ração e água.

Silva et al. (2009) avaliando o efeito do simbiótico comercial BioSyn MOS® sobre o ganho de peso de cordeiros confinados, demonstraram que ao final dos 45 dias de experimento, os cordeiros do grupo controle tiveram um ganho de peso médio de 238 g/dia, enquanto que os tratados com o simbiótico apresentaram um ganho de 280 g/dia, representando um aumento significativo de 17,59%.

Administrando probiótico composto por *Lactobacillus amylovorus* e *Enterococcus faecium* em suínos, Ross et al. (2010) não observaram diferença de ganho de peso entre os grupos controle e o grupo tratado, porém, neste último os animais consumiram uma quantidade significativamente menor de alimentos, demonstrando que o uso do probiótico contribui para a melhoria da taxa de conversão alimentar.

Huaynate et al. (2013) verificaram que um preparado constituído de *Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *S. termophilus*, *Enterococcus faecalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, conferiu a leitões desmamados um maior ganho de peso e conversão alimentar.

Resultado de estudo realizado por Raval et al. (2013) sobre o efeito de um suplemento probiótico contendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus sporogen* sobre

a utilização de nutriente e conversão alimentar de vacas lactantes, revelou que a suplementação de probióticos melhorou significativamente os coeficientes de digestibilidade, de matéria seca, proteína bruta e digestibilidade total de nutrientes quando comparado ao controle. Magnabosco et al. (2010) verificaram que este efeito dos micro-organismos probióticos sobre a saúde animal juntamente com fibras prébioticas, foi responsável em melhorias na quantidade e qualidade do leite de vacas da raça Girolando.

O uso de probiótico na alevinagem de tilápia demonstrou que após 42 dias, as tilápias alimentadas com a dieta suplementada com *L. plantarum* apresentaram maior número de bactérias ácido-láticas ($3,5 \times 10^4$ UFC/g de trato intestinal), e menor de bactérias totais ($5,8 \times 10^6$ UFC/g de trato intestinal), em relação aos alimentados com dieta controle 1, cujos resultados foram 1×10^2 UFC/g e $5,2 \times 10^7$ UFC/g de trato intestinal respectivamente, além de incrementar em 3,9% o ganho em peso semanal, 15,6% a biomassa final e 15,5% a eficiência alimentar (JATOBÁ; MOURIÑO, 2015).

2.1.2 Efeito antiparasitário

A utilização de probióticos, com efeito, antiparasitário em animais, teve início na década de 70, quando Kimura et al. (1976) mostraram que *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., promoveram diminuição na contagem de oocistos de coccídeos em frangos após o quinto dia de induzida a infecção, quando surgiram esquizonte e gametócito.

Singer e Nash (2000) realizaram estudos em camundongos e verificaram que a microbiota normal exercia um papel de proteção contra a infecção por *Giardia lamblia*. Ao analisarem os componentes desta microbiota, observaram a presença de lactobacilos e sugeriram então que o uso de probióticos também poderia exercer um efeito benéfico sobre as parasitoses.

Pérez et al. (2001) analisaram o efeito de sobrenadante de culturas de diferentes cepas de lactobacilos sobre o crescimento de trofozoítos de *Giardia intestinalis*, em culturas de células humanas do epitélio intestinal linha Caco-2, e observaram que apesar de ocorrer à aderência dos trofozoítos as células, estes não conseguiam se proliferar devido à redução do pH do meio, provavelmente relacionada à produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos.

Tierney et al. (2004) estudaram os efeitos de espécies de *Lactobacillus*, isolados de diferentes partes do trato gastrointestinal de frangos, sobre a invasão de *Eimeria tenella*,

empregando como modelo experimental culturas de células MDBK. Os autores observaram que as espécies de *Lactobacillus* aderiam às células, causando efeito de inibição sobre a invasão da *E. tenella* por efeito de exclusão competitiva.

Administrando *Zymomonas mobilis* em camundongos infectados experimentalmente por *Schistosoma mansoni*, Santos et al. (2004) observaram que os animais que receberam a cultura bacteriana após a infecção, desenvolveram uma resposta imunológica mais eficiente em relação àqueles que receberam a cultura preventivamente, resultando em 61% e 24% de redução da contagem de vermes adultos, respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

Ensaio *in vivo* foram realizados por Humen et al. (2005), em roedores conhecidos como esquilos da Mongólia (*Meriones unguiculatos*) contaminados com *Giardia intestinalis* e tratados com *Lactobacillus johnsonii* La1. Após 14 dias de infecção, seis dos quatorze animais do grupo controle ainda apresentavam trofozoítos no intestino delgado enquanto os animais tratados não apresentavam infecção. Quanto à eliminação de antígenos fecais GSA65, nos animais do grupo controle os autores observaram que este antígeno nas fezes aumentou progressivamente a partir do 7º dia de infecção até o 21º. Em contrapartida, no grupo constituído de animais tratados, apenas no 14º dia foi detectada a presença deste antígeno em um animal. Além disso, nos animais tratados, a mucosa e a atividade enzimática intestinal se mantiveram íntegras, diferentemente do grupo não tratado, demonstrando que o efeito antiparasitário exercido por *Lactobacillus johnsonii* La1 foi devido à modulação do sistema imune do hospedeiro, tendo em vista a ausência de processos inflamatórios intestinais.

Em outro experimento, estudando o efeito do *Enterococcus faecium* SF68 sobre a melhora da resposta imune em camundongos infectados com *Giardia intestinalis*, Benyacoub et al. (2005) verificaram que a inclusão deste probiótico na dieta acarretou em quantidades significativamente menores de trofozoítos de *Giardia* no intestino e antígenos fecais em relação ao grupo controle. Esta redução foi atribuída ao aumento no percentual de linfócitos T-CD4⁺ e de anticorpos IgA da mucosa intestinal, provocada pelo probiótico.

Dalloul et al. (2005), trabalhando com frangos contaminados com *Eimeria acervulina* e alimentados com probiótico a base de lactobacilos, constataram que os animais tratados apresentaram redução de 14% na eliminação de oocistos nas fezes em comparação com o grupo controle. Observaram também um aumento dos níveis plasmáticos de Interferon-gama (INF- γ) e Interleucina-2 (IL-2) e aumento de INF- γ na mucosa intestinal do grupo tratado, fato que pode estar diretamente relacionado com a

redução do número de oocistos, devido à estimulação da imunidade celular, afetando o ciclo do parasito.

Utilizando ratos infectados com *Trichinella spiralis*, Randazzo e Costamagna (2005) demonstraram que a administração de *Lactobacillus casei* produziu efeito adverso sobre a penetração das larvas na mucosa intestinal, o número médio de parasitos adultos recuperados da mucosa foi de 81 no grupo controle e apenas 12 no grupo tratado.

Como modelo de estudo para alterações metabólicas provocadas por síndromes que provocam irritabilidade intestinal, Martin et al. (2006) utilizaram ratos infectados com *Trichinella spiralis* e posteriormente suplementados com *Lactobacillus paracasei* em sua dieta. Foi observado nos animais não tratados com a suplementação probiótica, um aumento nos níveis de creatina, lactato e taurina, associados à hipertrofia muscular do jejuno. Por outro lado, os animais que receberam o tratamento normalizaram sua atividade muscular, seu metabolismo energético e apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de glutamina, metionina e lisina, que podem estar relacionadas à modulação da resposta imunológica.

Avaliando o efeito de micro-organismos probióticos sobre *Eimeria* spp em *Rattus norvegicus*, Pereira (2007) demonstrou que o preparado probiótico ministrado foi eficaz no sentido de promover a interrupção da eliminação de oocistos nas fezes dos animais, ganho de peso, melhor conversão alimentar e aumento do número de neutrófilos segmentados no tecido hematopoiético dos animais.

Coutinho (2008), analisando o efeito de micro-organismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos, observou que o uso preventivo do probiótico gerou redução da eliminação de oocistos nas fezes e aumento do desempenho nutricional dos animais, devido à colonização da mucosa intestinal pelos lactobacilos que impediu a adesão das células parasitárias.

Para controle da infecção de *Haemonchus contortus* em ovinos, Gallina et al. (2009) utilizaram *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi*, sendo que apenas *S. cerevisiae* demonstrou efeito inibitório sobre parasitos no abomaso, porém, em relação a quantificação das larvas obtidas na coprocultura, não foi observado diferença significativa em relação ao grupo controle.

Em estudo sobre o uso de probiótico no combate a ancilostomíase canina, Coelho (2010) observou que os cães tratados com preparado probiótico composto de *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruekii* e *L. plantarum*, na forma de “pool”, apresentaram uma redução de 88,83% do número de ovos por grama de fezes (OPG), além da avaliação

parasitológica, o mesmo grupo de animais também obteve melhorias em relação ao número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e aumento do hematócrito, reduzindo a anemia provocada pelo nematoide.

Freitas (2011) avaliando o efeito de uma preparação probiótica constituída por quatro espécies de lactobacilos, *L. casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. acidophilus* ATCC 4536, no tratamento da eimeriose aviária causada por *Eimeria acervulina*, observou que o referido preparado contribuiu para uma redução da quantidade de oocistos excretados em 39,12%.

As referidas cepas também foram estudadas por Teixeira (2011) em ovinos naturalmente infectados por *Haemonchus contortus*. A preparação probiótica apresentou uma eficácia máxima de 66,3% na redução do número de OPG, após 30 dias de tratamento. O “pool” de espécies de *Lactobacillus* também estimulou o sistema imune dos animais, mantendo a contagem de linfócitos normais, que por sua vez, estão diretamente envolvidos na resposta imune contra os helmintos. Resultado semelhante foi obtido por Coutinho (2012) avaliando a referida preparação em bezerros, sendo observado uma redução da contagem de OPG de helmintos de aproximadamente 54% após 90 dias de tratamento, observou-se também um aumento da população leucocitária total e de neutrófilos. Pereira e Costa (2014) verificaram uma redução de 55,3% de OPG, após administrar durante 135 dias o mesmo preparado probiótico em primatas mantidos em cativeiro infectados por *Trichuris trichiura*.

A administração de *Bifidobacterium animalis* foi testada por Sequeira et al. (2014) para induzir resistência contra a infecção por *Strongyloides venezuelensis* em camundongos. Foram avaliados os efeitos sobre a carga parasitária, produção de ovos e histologia da mucosa intestinal. A administração oral de *B. animalis*, iniciando-se 14 dias antes da inoculação de larvas de nematoides, diminuiu significativamente a carga de vermes e a produção de ovos, nos animais tratados, a redução percentual de vermes adultos no intestino foi de 33% e a redução da produção de ovos foi de 21%, em comparação com os do grupo controle, quanto à altura das vilosidades do duodeno e a relação vilosidade/cripta, foram significativamente maiores em camundongos tratados com probióticos, indicando que este grupo poderia estar sofrendo menos danos intestinais.

Temsahy et al. (2015) observaram uma redução de 69,02% na contagem de vermes adultos de *Trichinella spiralis* em ratos, infectados experimentalmente, após alimentá-los com *L. plantarum* durante 17 dias pós infecção.

2.1.3 Efeito imunomodulador

O sistema imunológico é composto por um conjunto de tecidos, células e moléculas que se interagem e medeiam diversas reações para fornecer proteção do hospedeiro contra os micro-organismos infecciosos. Este mecanismo de defesa pode ser dividido em dois tipos de respostas: a imunidade inata (natural ou inespecífica) e a imunidade adaptativa (adquirida ou específica) que atuam sinergicamente. A inata representa a primeira linha de defesa, sendo fornecida pelas barreiras epiteliais, células fagocitárias, células “natural killer” (NK) e proteínas do sistema complemento. A adaptativa é fornecida pelos linfócitos (imunidade celular) e seus produtos, como os anticorpos (imunidade humoral), esta se desenvolve mais tarde que a inata e requer que o organismo tenha uma exposição prévia aos antígenos dos micro-organismos patogênicos, desta forma, gera resposta específica para cada tipo de patógeno e adquire memória imunológica que leva a uma resposta aumentada depois de repetidas exposições (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O trato gastrointestinal, além de suas funções digestivas, desempenha um importante papel imunológico. Em sua superfície, o muco secretado no topo das criptas intestinais, onde as células caliciformes têm a função de secretar a mucina, representa a primeira barreira contra a entrada de micro-organismos. De acordo com Ouwerkerk, Vos e Belzer (2013) o muco é fundamental para garantir a integridade da parede do trato e contribui efetivamente no sistema imunológico. Johansson, Larsson e Hansson (2011) verificaram que ratos com deficiência de mucina MUC2 desenvolvem processo inflamatório na mucosa intestinal.

Outras células epiteliais importantes são as células de Paneth, especializadas em secretar peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas, lisozimas, lectinas tipo-C e catelicidinas (AYABE et al., 2000).

Sob a camada epitelial encontra-se o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), sendo o maior tecido do sistema imunitário que compreende 60% dos linfócitos no corpo, constituído por placas de Peyer, lâmina própria e linfócitos intraepiteliais formando uma rede imune. As placas de Peyer contêm as células M, responsáveis pelo transporte do antígeno para o tecido linfático onde são encontradas células dendríticas, linfócitos B e T (IIJIMA et al., 2004).

Segundo Kelly, King e Aminov (2007) a interação do trato gastrointestinal com a microbiota é o principal fator que influencia o desenvolvimento do sistema imune. Estudos com animais “germ-free” vêm demonstrando que os mesmos desenvolvem graves defeitos

imunológicos (HAURY et al., 1997; MENEZES et al., 2006; AMARAL et al., 2010; BIENENSTOCK et al., 2013).

Inúmeras evidências demonstram que os micro-organismos probióticos têm efeito imunoestimulador em animais e no homem (Figura 1). Os organismos probióticos interagem com os revestimentos epiteliais do hospedeiro recrutando as células imunitárias no local da infecção e induzindo marcadores imunológicos específicos (ASHRAF; SHAH, 2014).

Figura 1 – Efeitos dos probióticos sobre o sistema imune.

Fonte: Adaptado de Kemgang et al., (2014).

Como citado anteriormente, a estrutura das vilosidades intestinais, o número de células caliciformes e de Paneth são importantes para o estado de saúde do intestino. Tobita, Yakana e Otani (2010) observaram um aumento na expressão de genes da mucina 13 e defensina alfa em camundongos tratados com *Lactobacillus crispatus* K11. Em um estudo realizado por Galdeano et al. (2011) para avaliar o impacto do leite fermentado probiótico com *L. casei* DN-114-001 (10^8 UFC/ml) em ratos desnutridos, verificaram que apesar do número de células caliciformes estarem semelhantes nos diferentes grupos, as

vilosidades intestinais do grupo controle desnutrido eram curtas e os seus números eram inferiores aos animais que receberam o probiótico.

Os componentes da imunidade inata expressam uma grande variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) para reconhecer e responder aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). A família dos receptores tipo Toll (TLR), caracterizada como o melhor PRR, inclui os TLR-1, 2, 4, 5 e 6, que reconhecem componentes bacterianos como peptidoglicano, lipopolissacarídeos, ácido teicóico e lipoteicóico, flagelina, dentre outros e TLR-3, 7, 8 e 9 que reconhecem ácidos nucleicos de bactérias e vírus (WELLS, 2011).

Lactobacillus casei CRL431 administrado em camundongos durante 2, 5 e 7 dias, induziu um aumento significativo no número de TLR-2 em células da lâmina própria do intestino delgado, com o aumento sendo maior durante 7 dias pós-administração. O efeito no número de TLR-2 nas células das placas de Peyer foi melhorado apenas após 5 e 7 dias pós-administração (MALDONADO; PERDIGON, 2006). *L. paracasei* DC412 apresentou forte imunorregulação e interagiu fortemente com tecido linfóide associado ao intestino (GALT) de linhagens de camundongos BALB e de ratos Fisher-344 através da estimulação mediada por TLR2 / TLR4, sinalizando eventos que levam à secreção de citocinas, INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 (KOURELIS et al., 2010).

A atividade das células fagocitárias é outro parâmetro que indica o estímulo do sistema imune pelos micro-organismos probióticos. Ao realizar uma co-cultura de células mononucleares do sangue periférico humano com diferentes cepas de *L. acidophilus* e *L. plantarum*, Vissers et al. (2010) verificaram que todas as cepas testadas induziram a produção de IL-1, IL-10, INF- γ e TNF- α , com *L. plantarum* apresentando maior capacidade de indução de INF- γ e TNF- α em comparação com *L. acidophilus*. Kapila et al. (2012) observaram o aumento da atividade de macrófagos no peritônio de ratos alimentados com um probiótico contendo 3 cepas de *Lactobacillus*.

Foi demonstrado por Fink et al. (2007) que células dendríticas humanas expostas a diferentes cepas de bactérias lácticas (*L. reuteri* DSM12246, *L. acidophilus* X37 e *Bifidobacterium bifidum*) sofreram maturação e foram capazes de potencializar a atividade citotóxica das células NK, polarizando a atividade subsequente das células T helper para respostas Th1 ou Th2. As respostas Th1 dependem da capacidade das células apresentadoras de antígenos de produzirem IL-12 e caracterizam-se pela produção de TNF- α , INF- γ e IL-2, que induzem a imunidade mediada pelas células. As respostas imunes Th2

envolvem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e induzem a imunidade humoral (BANCHEREAU et al., 2000).

De acordo com Rizzello et al. (2011) isso demonstra que os micro-organismos probióticos podem controlar não apenas a força e a qualidade das respostas inatas, mas também as respostas adaptativas subsequentes, tanto por interações célula a célula quanto pela liberação de citocinas.

Segundo Galdeano et al. (2007) há diferentes vias de interiorização para as bactérias probióticas presentes no lúmen do intestino delgado: através das células M (MC), de células epiteliais (CE) e de células dendríticas. Após a interação com essas células, os micro-organismos probióticos ou os seus fragmentos são internalizados. As primeiras células que interagem com eles após internalização são as células apresentadoras de antígenos (APC), os macrófagos ou as próprias células dendríticas associados com a lâmina própria do intestino que as fagocitam promovendo a produção de citocinas tais como TNF- α e IFN- γ , que aumentam a estimulação de células epiteliais que induz a liberação de IL-6, que favorece a expansão clonal dos linfócitos B produtores de IgA. Os mastócitos também seriam estimulados a produzir IL-4. Outras citocinas, tais como IL-10 também são produzidas para melhorar a rede de sinais das citocinas.

A inoculação oral de *L. casei* recombinante 525 em camundongos BALB/c isentos de patógenos, resultou níveis significativamente elevados de IgG no soro, com títulos de IgG1 proeminentes bem como títulos de IgG2a e IgG2b (LIU et al., 2009).

Avaliando o efeito imunomodulador de duas cepas de *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* em camundongos infectados por *Salmonella* Typhimurium, Martins et al. (2010) observaram um aumento nos níveis de IgA e IL-10 nos animais tratados com probióticos. De acordo com Suzuki et al. (2007) a colonização microbiana do intestino promove a produção de IgA pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT), sendo que a IgA confere proteção contra a colonização por espécies patogênicas, parasitas e virais na mucosa intestinal. A IL-10 desempenha papel central na regulação da inflamação pela supressão de citocinas pró-inflamatórias. O papel desta citocina na prevenção da doença inflamatória intestinal tem sido demonstrado em experimentos com camundongos deficientes em IL-10 (LEBLANC et al., 2011).

Duarte (2011) estudando o efeito de um preparado probiótico à base de *Lactobacillus* sobre o efeito imunológico de camundongos Swiss, também observou aumento nas concentrações de IgA e IL-10 na mucosa intestinal dos animais que receberam a preparação.

2.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Conhecido popularmente como carrapato-do-boi, antes denominado *Boophilus microplus*, e após estudos moleculares e morfofisiológicos realizados por Murrell e Barker (2003), foi realocado no gênero *Rhipicephalus*, que compreende também a espécie *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato vermelho do cão. Segundo o National Center for Biotechnology Information (2017), a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), cujo código de identificação corresponde a ID-6941, pertence ao reino Metazoa, filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, família Ixodidae, gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*.

Por pertencer à família Ixodidae, indivíduos dessa espécie são considerados carrapatos duros, devido à presença de um rígido escudo de quitina que cobre a região dorsal e devido à posição do sulco anal que localiza-se posterior ao ânus e que quando presente, fazem parte da divisão dos Metastriata (ANDERSON; AMMERMAN; NORRIS, 2004). Caracterizam-se pelo rostro curto, tendo os palpos mais curtos que as quelíceras, o gnatosomo possui base hexagonal, os olhos estão presentes e os estigmas são circulares. Quando adultos, apresentam um acentuado dimorfismo sexual, no qual os machos são menores, medindo de 1,75 a 2 mm, possuem escudo longo que se prolonga de uma extremidade a outra, enquanto que nas fêmeas, esse escudo é curto, estendendo-se apenas em uma pequena área do idiossoma (Figura 2), permitindo assim a dilatação de seu abdômen quando ingurgitadas, chegando a medir 13 mm (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

Figura 2 – Dimorfismo sexual do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Fonte: (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

2.2.1 Ciclo biológico

Rhipicephalus (Boophilus) microplus apresenta ciclo de vida classificado como monoxênico, necessitando de um único hospedeiro para completar todo o seu desenvolvimento, sendo os bovinos seu principal hospedeiro, porém, ocasionalmente a espécie pode ainda acometer equinos, caninos, ovinos, caprinos, cervídeos e até mesmo o ser humano (SOARES et al., 2007; BEZERRA et al., 2010; LAVINA et al., 2014).

O ciclo biológico se desenvolve em duas fases, com um período de desenvolvimento no ambiente, sendo a fase de vida livre e outra ocorrendo sobre o hospedeiro, denominada fase parasitária (Figura 3). A espécie apresenta quatro estágios de desenvolvimento compreendendo: ovo, larva, ninfa e adulto (machos e fêmeas).

Figura 3 – Ciclo evolutivo do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Fonte: (GONZALES; SILVA; WAGNER, 1975).

2.2.1.1 Fase de vida livre

Inicia-se quando fêmeas ingurgitadas, as chamadas teleóginas, ao completarem sua alimentação se desprendem do hospedeiro e caem no solo, começando o período de pré-oviposição, onde as fêmeas buscam abrigo do sol na vegetação e metabolizam os nutrientes adquiridos na fase parasitária para que surjam os primeiros ovos e assim começar a postura. Segundo Almeida et al. (2011), em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e elevada umidade relativa ($> 70\%$) este período pode durar cerca de 2 a 6 dias. Também nessas

condições, o período de oviposição dura aproximadamente de 12 a 21 dias, podendo cada teleógina liberar cerca de 3000 ovos. Os ovos permanecem no solo por cerca de 17 a 30 dias para o desenvolvimento da larva e sua posterior eclosão, as larvas recém eclodidas ainda precisam de um tempo, em geral de 4 a 6 dias, para fortalecimento da cutícula obtendo assim o poder infestante.

2.2.1.2 Fase parasitária

De acordo com Sonenshine (1993), atraídas pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulos visuais e químicos, as larvas infestantes localizam e se fixam no hospedeiro, dando início a fase parasitária, que dura em média de 18 a 26 dias. Do quinto ao sexto dia as larvas sofrem a primeira metamorfose transformando-se em metalarvas, essas sofrem a muda da cutícula dando origem às ninfas. Esta fase permanece até o décimo dia, até as ninfas passarem pelo segundo processo de metamorfose formando as metaninfas, que por sua vez, sofrem ecdise originando indivíduos machos (neandro) ou fêmeas (neógina). Entre o décimo quinto e décimo oitavo dia, esses passam pelo último processo de metamorfose se tornando adultos machos (gonandro) e fêmeas (partenóginas), estes se acasalam, promovem a cópula e as fêmeas se ingurgitam (teleóginas) aumentando seu peso em até 200 vezes, levando assim seu desprendimento do hospedeiro para começar uma nova fase de vida livre.

2.2.2 Epidemiologia

Vários fatores exercem influência sobre a cadeia epidemiológica do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veríssimo (2013a) enumera os fatores climáticos, a composição das pastagens, a presença de predadores e a raça bovina hospedeira como sendo os principais.

Segundo Brito et al. (2006) as condições climáticas regulam o ciclo biológico durante a fase de vida livre dos carrapatos, promovendo a sazonalidade e permitindo o sincronismo das atividades biológicas com o período em que se encontra as condições ótimas para o seu desenvolvimento, e neste contexto, a temperatura, a umidade relativa do ar e o índice pluviométrico são os mais influentes.

Temperaturas mais elevadas são responsáveis pela aceleração no metabolismo dos indivíduos, em contrapartida, baixas temperaturas promovem redução nas taxas

metabólicas. Como consequência, quanto menor a temperatura maior será o tempo entre gerações, prolongando o período das fases de vida livre. Vidotto (2002) afirma que apesar do Brasil apresentar infestações por carrapato em todo seu território, as diferenças climáticas existentes entre as regiões brasileiras possibilita uma variação de 2,5 até 5 gerações por ano.

De acordo com Pereira et al. (2008) as teleóginas sempre procuram um lugar apropriado para sua oviposição, que tenha elevada umidade relativa do ar, uma vez que os ovos são sensíveis a desidratação. Isto explica o fato de que o verão, estação de maior temperatura, umidade e precipitação pluviométrica, seja o período para o melhor desenvolvimento do carrapato.

Em estudo realizado por Santarém e Sartor (2013) sobre a flutuação sazonal das fases de vida livre do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em Botucatu-SP, observou-se que as fases de pré-postura e postura foram menores nos meses mais quentes (entre novembro a abril) e maiores nos meses mais frios (entre maio e outubro). Verificou-se ainda, que entre junho e agosto as baixas temperaturas e a umidade relativa, abaixo de 60%, levaram a dessecação dos ovos. Por outro lado, no tocante à sobrevivência das larvas no solo, os meses frios foram mais favoráveis, atrelado à baixa oferta de alimento neste período, resultante das baixas temperaturas, umidade e precipitação pluviométrica.

Quanto à composição das pastagens, Rocha et al. (2011) verificaram que plantas de crescimento ereto ou cespitoso, como as do gênero *Panicum*, desfavorecem a fase de vida livre, porque permitem maior entrada de luz solar na base da planta e no solo. Por outro lado, plantas de crescimento estolonífero, como as pertencentes aos gêneros *Braquiaria* e *Cynodon*, promovem um micro ambiente favorável à fase de vida livre de carrapatos, com umidade e sombra, por recobrirem bem o solo.

Segundo Veríssimo (2013b) na natureza existem algumas espécies que são predadoras naturais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* podendo afetar seu ciclo biológico, como a formiga *Solenopsis saevissima* (lava-pés) que consegue perfurar a cutícula das teleóginas, consumindo suas estruturas internas. Samish e Rehacek (1999); Samish e Alekseev (2001) destacam ainda as aranhas das espécies *Phoneutria nigriventer* (armadeira) e *Lycosa erythrognatha* (aranha-de-grama), o sapo da espécie *Rhinella paracnemis* (cururu) e a ave *Gallus gallus* (galinha doméstica), *Numida meleagris* (galinha d'angola) e *Crotophaga ani* (anu-preto).

No tocante a raça bovina, vários autores afirmam que as raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) são mais resistentes do que as europeias (*Bos taurus taurus*), destacando-se que,

nas raças mestiças, observa-se uma correlação positiva quanto ao número de genes zebuínos e o grau de resistência (CARDOSO et al., 2006). Segundo Carvalho et al. (2008) gados zebuínos por possuírem maior quantidade de glândulas sebáceas, produzem odores que podem afastar os carrapatos. Além disso, os zebuínos apresentam uma resposta inflamatória no local de fixação dos carrapatos mais intensa que os europeus.

Analisando biopsias de pele lesionadas por carrapatos, Moraes et al. (1992) observaram que as raças zebuínas apresentaram o dobro do número de mastócitos quando comparados às raças europeias. Os mastócitos, quando sensibilizados por IgE liberam histaminas e serotonina que agem como potentes mediadores do processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Abatepaulo (2007) verificou que bovinos da raça Nelore quando comparados a Holandeses, possuem maior expressão de citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias, que aumentam o recrutamento de linfócitos para o local de fixação do carrapato, contribuindo para a resistência do animal contra a infestação. Resultado semelhante foi obtido por Franzin (2009), que além dos linfócitos, também detectou maior quantidade de basófilos e eosinófilos no infiltrado de pele das raças zebuínas.

Piper et al. (2009) também acreditam que essa diferença de resistência entre as raças está na maior população de linfócitos-T, expressão de citocinas e níveis de imunoglobulina IgG, no sangue periférico das raças zebuínas quando infestados pelos carrapatos.

Vale ressaltar que tanto o carrapato quanto as raça zebuínas são originários da Índia, fato que permitiu o convívio de milhares de anos entre as espécies e uma possível seleção natural dos indivíduos mais resistentes e desenvolvimento de mecanismos de defesa (LEMOS, 1986).

2.2.3 Patogenia

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago cujos prejuízos econômicos causados na pecuária não se limitam apenas aos danos na saúde do animal, mas também como vetor na transmissão de diversos micro-organismos causadores de outras doenças importantes. O sintoma mais comum por sua infestação é a anemia, devido sua ação espoliativa, Jonsson (2006) estima que cada indivíduo ao longo do seu ciclo de vida possa ingerir em média cerca de 1 mL de sangue, sendo que as teleóginas

apresentam capacidade de aumentar 200 vezes seu tamanho, consumindo até 3 mL de sangue.

O carrapato também provoca lesões na pele do seu hospedeiro, estimulando os mecanismos de defesa: hemostasia, inflamação e imunidade, que segundo Nuttal et al. (2006) são inibidos pela secreção de várias moléculas com propriedades anti-hemostática, anti-inflamatórias e imunossupressoras presentes na saliva dos carrapatos. Em decorrência das lesões, os hospedeiros ficam mais susceptíveis a infecções bacterianas e miíases (RECK et al., 2014).

Através do repasto sanguíneo, o carrapato é capaz de transmitir os hematozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* causadores da babesiose bovina e da bactéria intraeritrocítica *Anaplasma marginale* causadora da anaplasmoze bovina, que juntos formam o complexo de doença chamada de tristeza parasitária bovina (TRINDADE; ALMEIDA; FREITAS, 2011). Gonçalves et al. (2011) observaram as principais alterações clínicas apresentadas por animais acometidos pela tristeza parasitária bovina, destacando-se apatia, anorexia, desidratação, emagrecimento, palidez, fraqueza, estase gastrointestinal, taquicardia, febre, icterícia, dispneia e hemoglobinúria.

Animais parasitados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem perdas no ganho de peso, produção de leite comprometida e seu couro apresenta diminuição na qualidade (PAIVA NETO, 2004).

2.2.4 Controle e tratamento

O controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se baseia na utilização de produtos químicos. Encontram-se no mercado carrapaticidas de contato, cujos grupos químicos são os organofosforados, amidínicos, piretróides, fenilpirazóis e naturalyte, e também carrapaticidas sistêmicos em que se enquadram as lactonas macrocíclicas e as benzofenilureas. Ambos costumam atuar sobre a formação da quitina, inibindo assim o desenvolvimento e ecdise, ou sobre o sistema nervoso central, sendo neurotóxicos (FURLONG; SALES, 2007).

Além desses produtos contaminarem o ecossistema e gerarem resíduos na carne e no leite, de acordo com Andreotti (2010) seu uso indiscriminado tem provocado uma pressão seletiva em algumas populações de carrapatos levando ao surgimento de mutações. Pereira et al. (2008) reportam que as mutações conferem uma alteração tridimensional da

proteína formadora do receptor, fazendo com que os princípios ativos dos carrapaticidas não se liguem ao sítio de ação, resultando na resistência.

A fim de evitar esses problemas, vários métodos alternativos não químicos e não poluentes vem sendo propostos. Kassab et al. (2011) verificam que fêmeas ingurgitadas quando suspensas em solução contendo os fungos entomopatogênicos *Beuaveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ durante 5 minutos, perderam sua eficácia reprodutiva em 51,73% e 96,76%, respectivamente. Machado (2008) avaliando a capacidade de dois nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis baujardi* e *H. indica*, sobre fêmeas ingurgitadas, alcançou uma taxa de mortalidade de 100% após o 5º e o 7º dia de experimento, respectivamente. Tanto os fungos como os nematoides são capazes de penetrar a cutícula dos carrapatos, podendo ocasionar sua morte (OJEDA et al., 2011). Conforme Hazir et al. (2003) os nematoides liberam ainda bactérias que se reproduzem no interior dos carrapatos, matando-os através da produção de toxinas.

A fitoterapia também vem demonstrando eficácia no controle desses parasitos. Em resposta a ataques de herbívoros, as plantas naturalmente evoluíram no desenvolvimento da capacidade pesticida para sua própria defesa. São fontes expressivas de compostos bioativos, provenientes do seu metabolismo especializado, onde se concentra o potencial fitoterápico através de compostos como alcaloides, terpenos, flavonoides e esteroides (GONÇALVES; HUERTA; FREITAS, 2016). Dentre os vegetais dos quais se preparam extratos e óleos para utilização como carrapaticidas, destacam-se a citronela (OLIVO et al., 2008), o fumo (OLIVO et al., 2009), o nim (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2010), a laranja (CASTRO et al., 2011) e a carqueja (LÁZARO et al., 2013).

2.2.4.1 Controle imunológico

A caracterização da resistência imunológica adquirida pelos carrapatos iniciou no ano de 1939 com Trager, que observou o desenvolvimento de resistência em cobaias submetidos a infestação com larvas de *Dermacentor variabilis*. Observou-se nos sítios onde os carrapatos haviam realizado o repasto sanguíneo, a presença de infiltrado inflamatório granulocítico constituído principalmente de basófilos e eosinófilos. Tal característica se associa à reação de hipersensibilidade tipo I, cujo mecanismo envolve produção de IgE em resposta a certos antígenos (alérgenos), tendo esta imunoglobulina elevada afinidade por seu receptor em mastócitos e basófilos. Uma exposição subsequente ao mesmo antígeno faz reação cruzada com IgE ligado a estas células e dispara a liberação

de várias substâncias farmacologicamente ativas como histamina, proteases, prostaglandinas, leucotrienos e algumas citocinas que estimulam o recrutamento de leucócitos, causando a reação de fase tardia, pela qual se atribui a inflamação local (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Conforme Wikel (1996) a resistência imunológica adquirida pelo hospedeiro resulta na redução do volume de sangue alimentado, diminuição da produção e da viabilidade dos ovos, além de dificultar a realização da muda e ingurgitamento.

Neste contexto, as vacinas surgiram como um método alternativo que vem apresentando resultados promissores e com inúmeras vantagens, dentre as quais Leal, Freitas e Vaz Junior (2003) citam melhor relação custo/benefício, ausência de contaminação ambiental, ausência de período de carência após aplicação, segurança ao aplicador e ao consumidor. Willadsen (2004) ainda afirma que diferentemente dos acaricidas, os riscos de desenvolvimento de resistência são mínimos.

Nos trabalhos iniciais sobre imunização contra carrapatos, foram utilizados extratos de carrapatos adultos e de suas glândulas salivares. Johnston, Kemp e Pearson (1986) ao imunizarem gados com extrato bruto de teleóginas do *B. microplus*, observaram que após infestações diárias com 1000 larvas durante 14 semanas, a população de carrapatos nos animais vacinados era 70% menor quando comparados aos animais do grupo controle.

Willadsen e Kemp (1988) propuseram induzir a imunidade contra carrapato através de vacinas que tenham os chamados “antígenos ocultos”, os quais, em uma infestação natural não ficam expostos ao sistema imune dos hospedeiros. Desta forma, os carrapatos não desenvolvem mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro e por conseguinte, a imunização se torna mais eficaz. A Bm86, primeiro antígeno oculto a ser isolado (WILLADSEN et al., 1989), consiste em uma glicoproteína presente na superfície de células do intestino do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ao incubar células do intestino de carrapatos com soros de bovinos imunizados com a referida proteína, os autores observaram uma forte inibição da endocitose pelas células, assim, quando o carrapato ingere o sangue durante seu repasto, este contém anticorpos que irão causar danos ao intestino, prejudicando seu desenvolvimento até a fase adulta.

No intuito de facilitar a obtenção do antígeno, uma vez que seriam necessárias cerca de 50000 teleóginas para produzir de 20 a 100 µg de Bm86, Rand et. al. (1989) e Rodríguez et al. (1994) realizaram pesquisas que possibilitaram a produção em larga escala através da clonagem e expressão do gene que codifica a Bm86 na bactéria *Escherichia coli* e na levedura *Pichia pastoris*, respectivamente, sendo a primeira utilizada na Austrália para

desenvolver a vacina comercial TickGard® e a segunda em Cuba, onde se criou a vacina GAVAC®. Ambas apresentaram efeito no sentido de reduzir o número de fêmeas ingurgitadas, bem como seu peso e sua capacidade reprodutiva. Durante a avaliação da vacina TickGard®, Jonsson et al. (2000) observaram uma redução de 56% no número de carrapatos após uma única geração, 72% de perda de eficácia reprodutiva e além disso, os animais vacinados tiveram um ganho de peso de 18 kg em média após 6 meses de experimento.

Além da Bm86, outras proteínas foram testadas, como a Bm91, presente na glândula salivar e no intestino (RIDING et al., 1994), a BMA7, distribuída em diversos tecidos (McKENNA et al., 1998) e a BYC (*Boophilus* Yolk Catepsina) isolada de ovos (LOGULLO et al., 1998).

Há um grande esforço na tentativa de se identificar e caracterizar novas moléculas candidatas a serem utilizadas em preparações de vacinas promissoras que visam prejudicar os processos fisiológicos específicos dos carrapatos (Figura 4).

Figura 4 – Visão geral dos processos fisiológicos do carrapato com destaque para as moléculas passíveis de serem avaliadas como vacina.

Fonte: (DE LA FUENTE et al., 2016).

O processo de fixação do carrapato no hospedeiro inicia-se com a introdução do hipostômio na derme, seguida pela ancoragem, que se faz por meio de um cone de cemento produzido pelas glândulas salivares, composto principalmente de proteínas ricas em glicina. Alguns antígenos de cemento têm sido identificados, a partir da saliva de *Haemaphysalis longicornis*, Mulenga et al. (1999) caracterizaram a proteína P29 semelhante ao colágeno, que causou 50% de mortalidade de larvas e ninfas de *H. longicornis* em coelhos imunizados, Tsuda et al. (2001) identificaram a proteína HL34, que reduziu a sobrevivência do carrapato em seus diversos estágios. Trimnell et al. (2005) ao imunizarem cobaias com proteína recombinante 64TRP de *Rhipicephalus appendiculatus*, observaram uma resposta contra *R. sanguineus* e *Ixodes ricinus*, demonstrando uma reação cruzada.

A regulação osmótica desempenha importante papel na fisiologia dos carrapatos, uma vez que uma fêmea pode se alimentar com um volume de sangue de 200-300 a vezes maior que seu próprio peso. Portanto, canais formados por proteínas especiais que atravessam a membrana celular e conduzem seletivamente as moléculas de água para dentro e fora da célula (aquaporinas) podem servir de alvo para o desenvolvimento da vacina. Guerrero et al. (2014) utilizando a proteína RmAQP1, uma aquaporina de *R. microplus*, observaram uma redução de 75% no número de carrapatos que completaram seu ingurgitamento.

Na inibição da fertilidade, destacam-se a BYC (*Boophilus* Yolk Catepsina), a THAP (aspártico-proteinase ligadora de heme) e a VTDCE (cisteína-endopeptidase degradadora da vitelina), que possuem atividade degradante de vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos dos carrapatos (VAZ JUNIOR; SEIXAS; MASUDA, 2012).

Quanto ao metabolismo do ferro, os carrapatos possuem duas formas de ferritinas: a FER1, responsável pelo armazenamento intracelular de ferro e a FER2, que atua no transporte deste mineral, do intestino para os tecidos periféricos. Conforme De La Fuente et al. (2016), esta última possui características de um antígeno oculto ideal, não estão presentes nos hospedeiros, é expressa por um único gene presente em células intestinais e é altamente imunogênica. Quando a FER2 recombinante de *Ixodes ricinus* (IrFER2) foi utilizada para vacinar coelhos, os animais foram protegidos de *I. ricinus*, com uma eficácia global da vacina de 98%, atribuída a uma redução no número e peso de fêmeas ingurgitadas e fertilidade dos ovos (HAJDUSEK et al., 2010).

Destaca-se ainda as Glutathione S-transferases (GSTs), as quais constituem uma família de enzimas presentes em diversos animais, inclusive nos carrapatos (VAZ JUNIOR et al., 2004) que apresentam múltiplas funções, incluindo transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas e principalmente, na desintoxicação metabólica de xenobióticos e outras toxinas endógenas e na proteção contra o estresse oxidativo (LIMA et al., 2002). Parizi et al., (2011) ao imunizar bovinos com a GST recombinante do carrapato *Hemaphysalis longicornis*, verificaram que o referido antígeno foi capaz de induzir imunogenicidade cruzada que resultou uma proteção de 57% contra uma infestação experimental por *R. microplus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas instalações da Fazenda São Francisco localizada no Município de Canas – SP, no Laboratório de Probióticos do LOT/ELL-USP e no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo Di Biase (UGB) em Volta Redonda - RJ.

3.1 ANIMAIS

No presente trabalho foram avaliadas 30 fêmeas adultas da raça Girolando, em fase de lactação em regime de duas ordenhas por dia. Os bovinos, em conformidade com a rotina da fazenda, foram suplementados, no momento das ordenhas, com volumoso e ração comercial em quantidade proporcional à produção de leite e mantidos em pastagem de braquiária nos períodos entre as ordenhas. De acordo com informações do proprietário os animais da fazenda não apresentam infestação por carrapatos, tornando assim desnecessário o uso de carrapaticidas.

3.2 MICRO-ORGANISMOS

No presente trabalho foram avaliadas duas preparações probióticas, sendo uma constituída de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4536, *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, na forma de “pool” (Probiótico EEL) e outra preparação probiótica (*ProbioTick*), na forma líquida, foi adquirida no mercado local e tem sua eficácia, como carrapaticida, comprovada em nível de campo, segundo o fabricante.

3.3 PREPARAÇÃO PROBIÓTICA EEL

O preparado Probiótico EEL foi constituído de um “pool” das referidas cepas de *Lactobacillus* que se encontravam mantidas a uma temperatura de -20 °C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), composto por glicose (20 g/L), peptona (10 g/L), extrato de

carne (8 g/L), extrato de levedura (4 g/L), acetato de sódio trihidratado (3 g/L), citrato triamoniaco (3 g/L), fosfato dipotássio (2 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) e Tween 80 (1 mL/L), contendo 20% glicerol no Laboratório de Probióticos do LOT/EEL-USP.

Para ativação das células as respectivas cepas foram descongeladas a temperatura ambiente e repicadas individualmente, por três vezes consecutivas a 37 °C por 24 h., em caldo constituído de melaço de cana de açúcar em pó a 5,0% suplementado de 0,5% de extrato de levedura (VILLAVICÊNCIO et al., 1999) esterilizado a 121 °C/15 min. A partir do último repique uma alíquota de 2 mL de cada cultura foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de caldo de melaço, seguido de incubação a 37 °C por 18 h. Por meio de plaqueamento pela técnica de “Pour Plate” em ágar MRS, cada cultura teve sua concentração de células verificada e padronizada com solução salina a 0,85% para 10^{10} UFC/mL. Em seguida volumes iguais dos respectivos cultivos foram juntados formando assim o “pool” de lactobacilos (PEREIRA, 2007; TEIXEIRA, 2011; DUARTE, 2011). Esta preparação foi formulada quinzenalmente e armazenada a 5 °C até o momento da administração aos animais, que ocorreu após contenção dos mesmos para ordenha, onde os mesmos receberam doses diárias de 10 mL por via oral.

3.4 IMUNIZAÇÃO

A imunização dos animais foi feita por meio de vacina composta de proteína recombinante glutathione S-transferase *Haemaphysalis longicornis* (rGST-HI), gentilmente preparada e cedida pelos Professores Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior e Dr. Luís Fernando Parizi da UFRGS – Porto Alegre - RS. Os animais que foram vacinados receberam 3 doses (inicial, 14 e 28 dias de tratamento) de uma emulsão composta por 1 mL de solução rGST-HI (100 µg) em PBS (Tampão fosfato salino) acrescida de 1 mL de Montanide 888/Marcol 52 como adjuvante, por via subcutânea.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento teve duração de 154 dias, sendo que os 30 animais foram distribuídos em 06 grupos, com 05 animais devidamente identificados em cada,

caracterizados da seguinte forma (Figura 5):

Grupo A – os animais não receberam tratamento específico durante o período do experimento (controle).

Grupo B – nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram vacinados com a referida vacina, por via subcutânea (efeito vacina).

Grupo C – os animais receberam, diariamente, durante 70 dias, uma dose de 10 mL, por via oral, da preparação probiótica EEL (efeito probiótico EEL).

Grupo D – nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram vacinados com a referida vacina, por via subcutânea e receberam diariamente, a partir do dia inicial, durante 70 dias, por via oral, 10 mL da preparação probiótica EEL (efeito vacina + probiótico EEL).

Grupo E – os animais receberam, diariamente, durante 70 dias, uma dose de 10 mL por via oral, da preparação probiótica *ProbioTick* (efeito probiótico PT).

Grupo F – nos dias inicial, 14 e 28 os animais foram vacinados com a referida vacina, por via subcutânea e receberam diariamente, a partir do dia inicial, durante 70 dias, por via oral, 10 mL da preparação probiótica *ProbioTick* (efeito vacina + probiótico PT).

Figura 5 – Esquema do delineamento experimental empregado.

Fonte: O autor

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

Amostras de sangue foram coletadas antes do início do experimento e a cada 14 dias até o 98º dia, após este tempo até o final do experimento o intervalo de coleta foi a cada 28 dias (Figura 5), visando a realização do hemograma, dosagem de proteínas da coagulação e avaliação imunológica em cada animal.

A coleta de sangue foi realizada com o auxílio de uma seringa descartável por meio de punção venosa na veia mamária (COUTINHO, 2012), sendo 3,5 mL transferidos para tubo de ensaio contendo citrato de sódio a 3,2% como anticoagulante e em seguida homogeneizado e centrifugado a 1500 x g por 15 min., para obtenção do plasma utilizado na determinação do Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), 4 mL foram transferidos para tubo de ensaio contendo Etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e em seguida homogeneizado para realização do hemograma, e o restante (8 mL) foi transferido para tubo de ensaio seco e após coagulação foi centrifugado a 1300 x g por 15 min. para obtenção do soro utilizado nas dosagens de anticorpos.

3.6.1 Determinação do TP e TTPa

Para determinação dos Tempos de Protrombina (TP) e de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) foram utilizados os kits da marca Biotécnica®, conforme protocolo proposto por Saraiva et al. (2012). Para obtenção do TP, foram pipetados 100 µL do plasma em tubos de ensaio plástico pré-aquecidos e incubados a 37 °C por 3 minutos. Após, foram adicionados 200 µL do extrato liofilizado de cérebro de coelho e cloreto de cálcio pré-aquecido a 37 °C e imediatamente foi acionado o cronômetro e registrado o tempo gasto para formação do coágulo. Para determinação do TTPa, foram pipetados 100 µL do plasma em tubos de ensaio plástico pré-aquecidos e incubados a 37 °C por 1 minuto. Após, foi adicionado 100 µL do extrato de cérebro de coelho cloroformizado e ácido elágico, sendo a mistura incubada a 37 °C por 3 minutos. Por último, foi adicionado o cloreto de cálcio pré-aquecido a 37 °C e imediatamente foi acionado o cronômetro e registrado o tempo gasto para formação do coágulo, sendo os resultados expressos em segundos (s).

3.6.2 Hemograma e contagem de plaquetas

O hemograma e a contagem de plaquetas foram realizados em contador automático Cell-Dyn 3500, da marca Abbott®. O hemograma consiste na quantificação do número de hemácias, dosagem de hemoglobina, percentual de hematócrito e contagem do número total de leucócitos. A contagem diferencial dos leucócitos foi confirmada analisando-se filmes sanguíneos corados pelo método de Leishman, com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 100x (Nikon), sendo que os tipos leucocitários avaliados foram os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (BAIN, 1998).

3.6.3 Detecção de IgG e IgM total

Após a obtenção do soro, as determinações dos anticorpos foram realizadas pelo método de ELISA, em conformidade com instruções sugeridas pelo fabricante dos kits (Bethyl Laboratories). As placas de ELISA para determinação de IgG e IgM bovino foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h. com 100 µL/poço de amostra diluída a 1:250000 e 1:10000, respectivamente, em tampão de diluição. Em seguida as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL/poço de tampão de lavagem à temperatura ambiente por 2 min. para cada lavagem e incubadas novamente por uma hora à temperatura ambiente com 100 µL/poço dos respectivos anticorpos anti IgG e anti IgM bovino. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas conforme procedimento descrito anteriormente. Na sequência adicionou-se 100 µL/poço de solução HRP (horseradish peroxidase) e as placas foram incubadas por 30 min. a temperatura ambiente, após o que repetiu-se o procedimento de lavagem. A reação foi revelada com 100 µL/poço de substrato TMB (tetrametilbenzidina) por 15 min. e interrompida com 100 µL/poço de solução de parada (ácido sulfúrico 12,5%). A densidade ótica foi medida a 450 nm (BUTLER, 1983).

3.6.4 Detecção de IgG anti rGST-HI

Para verificar a cinética de produção do anticorpo específico IgG anti GST-HI pelos animais, foram realizados testes de ELISA seguindo o procedimento de PARIZI (2010). Para tanto, placas de polietileno foram sensibilizadas com 100 ng/poço do antígeno GST-HI por 16 horas a 4 °C em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6. As placas sensibilizadas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão PBS-TWEEN 20 a 0,05%

(solução de lavagem PBS-T20) durante uma hora a 37 °C, após bloqueio, as placas foram incubadas a 37 °C por 2 horas com 100 µL/poço de amostra diluída a 1:200 em tampão PBS-T20. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com 200 µL/poço de solução de lavagem a temperatura ambiente por 2 min. cada lavagem e incubadas novamente por uma hora a 37°C com 100 µL/poço de conjugado peroxidase anti IgG bovino (Sigma[®]), diluído 1:50000 em tampão PBS-T20. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas conforme procedimento de lavagem anterior. A reação foi revelada com uma solução cromogênica (SIGMAFAST[™] OPD) por 15 min. e interrompida com H₂SO₄ 12,5%. A leitura foi realizada a densidade ótica de 492 nm.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste t e da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ou teste t (LSD) para avaliar a diferença entre os tratamentos em cada intervalo de tempo experimental. Para intervalos onde as variáveis não apresentavam homoscedasticidade, empregou-se o método Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Foram consideradas estatisticamente significativas diferenças que apresentaram valor descritivo (*p*) menor ou igual a 5%. Estes testes foram realizados utilizando os softwares Excel e BioEstat 5.0.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA, parecer nº 010/16, conforme anexo 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico relacionado com a fluidez do sangue e com o controle de sangramento frente a uma lesão vascular, iniciando o processo de reparo tecidual. Desse modo, quando há o rompimento em algum vaso sanguíneo, a hemostasia atua no sentido de formar um trombo no local, obstruindo a lesão e impedindo o extravasamento de sangue, sendo este mecanismo mediado por componentes e fragmentos celulares (endotélio e plaquetas) e proteicos (fatores de coagulação) (LIND; MARKS; EWENSTEIN, 2003).

Na primeira fase da hemostasia as células endoteliais promovem a vasoconstrição local, diminuindo o fluxo sanguíneo no sítio de sangramento. As plaquetas aderem ao endotélio do vaso sanguíneo danificado, tornam-se ativadas e começam a liberar o conteúdo de suas vesículas, fazendo com que outras plaquetas na área fiquem aderentes e se prendam às plaquetas originalmente ativadas. O acúmulo e a adesão de grande número de plaquetas formam a massa conhecida como tampão plaquetário (TORTORA, 2013).

A segunda fase da hemostasia, também conhecida como sistema de coagulação, envolve um sistema biológico de amplificação, no qual substâncias de iniciação ativam em sequência, por proteólise, uma cascata de proteínas precursoras circulantes, conhecida como fatores enzimáticos da coagulação, culminando na conversão de protrombina em trombina. Esta, por sua vez, converte o fibrinogênio solúvel do plasma em fibrina. A fibrina infiltra nos agregados de plaquetas, nos locais de lesão vascular, e converte os tampões primários e instáveis de plaquetas em tampões hemostáticos firmes e estáveis, tendo como consequência a formação do coágulo (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

Assim, no presente trabalho a hemostasia dos animais foi verificada por meio da contagem de plaquetas (Tabela 2) e da determinação dos tempos de protrombina (TP – Tabela 3) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa – Tabela 4).

No tocante à contagem de plaquetas (Tabela 2), nota-se que os animais do grupo E (ProbioTick), apresentaram a maior variação, sendo o valor mínimo de $292 \times 10^3/\mu\text{L}$, observada no 56º dia e o máximo de $473 \times 10^3/\mu\text{L}$, após 154 dias, porém, sem representar uma diferença significativa ($p>0,05$). Observa-se ainda que nos animais dos demais grupos os valores praticamente permaneceram constantes durante todo o período

experimental. Apesar de maior oscilação na contagem de plaquetas, verificada no grupo E, nenhum animal apresentou valores fora da normalidade, que de acordo com Latimer (2011) variam entre 100 e 800 x 10³/μL (Apêndice A). Neste contexto, vale destacar que no presente experimento, os animais não se encontravam infestados por carrapatos. Desta forma, os bovinos não foram inoculados com substâncias que inibem a atividade plaquetária, como as encontradas na saliva de parasitos hematófagos.

Tabela 2 – Valores médios ± desvio padrão da contagem de plaquetas (x 10³/μL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	359 ± 68	367 ± 47	377 ± 52	381 ± 40	319 ± 57	351 ± 66	383 ± 43	367 ± 93	388 ± 80	397 ± 105
B	381 ± 87	414 ± 99	358 ± 58	378 ± 60	304 ± 42	371 ± 78	359 ± 42	432 ± 63	394 ± 75	387 ± 76
C	431 ± 71	446 ± 59	406 ± 75	413 ± 92	369 ± 62	415 ± 69	420 ± 81	403 ± 60	403 ± 152	419 ± 88
D	409 ± 88	384 ± 88	359 ± 61	374 ± 73	295 ± 50	349 ± 62	370 ± 68	425 ± 77	380 ± 47	385 ± 88
E	402 ± 39	395 ± 77	405 ± 58	389 ± 32	292 ± 17	360 ± 48	381 ± 64	417 ± 68	398 ± 100	473 ± 177
F	335 ± 70	366 ± 118	332 ± 75	330 ± 81	311 ± 65	342 ± 92	330 ± 81	370 ± 66	371 ± 87	381 ± 106

Por outro lado, ao avaliar as alterações na hemostasia em bovinos infestados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Reck Junior et al. (2009), depois de realizarem o teste de indução da agregação plaquetária utilizando colágeno, verificaram que ao término de um período de 21 dias de infestação, que corresponde ao ciclo de vida do carrapato, as plaquetas apresentaram uma perda de 65% da capacidade de agregação quando comparadas àquelas coletadas de animais não infestados. Curiosamente, apesar dessa interferência, a contagem de plaquetas aumentou em 40%. Os autores consideraram que este quadro provavelmente foi induzido em decorrência da ação de anti-hemostáticos da saliva do carrapato que foi inoculado no hospedeiro, gerando a hipoagregação plaquetária, bem como pela reposta do hospedeiro, elevando assim, a produção de plaquetas, como um mecanismo de defesa de efeito compensatório.

De acordo com Ribeiro e Francischetti (2003), ao se fixarem na pele do hospedeiro, os carrapatos necessitam conter o processo de hemostasia enquanto se alimentam. Para

tanto, sua saliva contém substâncias antiplaquetária e vasodilatadora que afetam diretamente a hemostasia primária, cujos eventos levam a formação do tampão plaquetário.

Em relação aos fatores (componentes proteicos) de coagulação, nota-se, quanto ao tempo de protrombina TP (Tabela 3) que coincidentemente, assim como observado com a formação de plaquetas, os animais do grupo E (ProbioTick) apresentaram o menor (23,34 s) e o maior (30,25 s) valor de TP observados, entretanto, esta variação não representou diferença estatisticamente significativa, assim como os valores de TP obtidos nos demais grupos em relação ao controle.

Tabela 3 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do tempo de protrombina (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	26,14 $\pm 2,80$	26,30 $\pm 1,72$	24,98 $\pm 3,18$	27,94 $\pm 3,93$	25,81 $\pm 3,20$	28,36 $\pm 2,89$	28,21 $\pm 4,10$	27,50 $\pm 3,26$	29,73 $\pm 0,97$	27,48 $\pm 2,89$
B	26,59 $\pm 1,96$	26,83 $\pm 1,86$	26,80 $\pm 2,44$	26,37 $\pm 2,48$	26,43 $\pm 1,28$	26,82 $\pm 1,72$	26,92 $\pm 1,68$	28,22 $\pm 1,80$	28,35 $\pm 1,99$	29,11 $\pm 4,44$
C	25,56 $\pm 1,49$	25,60 $\pm 1,83$	25,98 $\pm 3,02$	26,66 $\pm 1,87$	27,12 $\pm 0,95$	27,00 $\pm 3,25$	27,90 $\pm 1,68$	26,28 $\pm 1,63$	28,40 $\pm 0,59$	29,31 $\pm 0,99$
D	24,02 $\pm 1,64$	24,17 $\pm 2,97$	26,47 $\pm 2,74$	27,24 $\pm 1,83$	27,65 $\pm 1,52$	28,65 $\pm 1,84$	29,99 $\pm 1,64$	23,52 $\pm 1,50$	28,55 $\pm 1,48$	29,71 $\pm 2,76$
E	25,79 $\pm 3,38$	23,54 $\pm 1,53$	23,34 $\pm 2,95$	27,30 $\pm 0,91$	26,43 $\pm 2,18$	28,10 $\pm 2,11$	26,83 $\pm 2,07$	28,44 $\pm 3,58$	29,89 $\pm 1,98$	30,25 $\pm 0,53$
F	26,17 $\pm 1,60$	26,29 $\pm 2,14$	27,33 $\pm 2,14$	27,67 $\pm 1,64$	27,61 $\pm 1,43$	28,58 $\pm 1,02$	25,14 $\pm 1,23$	26,75 $\pm 1,77$	29,16 $\pm 2,39$	29,66 $\pm 2,49$

A Tabela 4 apresenta os valores para os tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPa) obtidos nos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Observa-se que os valores oscilaram entre 42 s (grupo C - probiótico EEL) aos 56 dias de experimento e 70 s (grupo F - vacina+Probiotick) no 126º dia. Entretanto, a análise estatística destes resultados (Tabela 4) não mostrou diferença significativa entre os valores de TTPa ($p > 0,05$) nos animais submetidos aos respectivos tratamentos. Os valores observados para TP e TTPa demonstram que o sistema de coagulação dos animais dos diferentes grupos se mantiveram nas mesmas condições.

Os testes de monitoramento da coagulação envolvem a ativação *in vitro* de partes do sistema (cascata) de coagulação e representam o tempo necessário para a formação do

coágulo (TSENG et al., 2001). Segundo Kagawa e Fukutake (2002), o TP é usado para avaliar a vias extrínsecas (fator VII) e comum (fatores X, V, II e I), enquanto o TTPa é usado para monitorar as vias intrínsecas (fatores XII, XI, IX e VIII) e comum. Estes fatores incluem íons cálcio, diversas enzimas sintetizadas pelos hepatócitos e liberadas na corrente sanguínea, moléculas associadas às plaquetas e outras liberadas pelos tecidos danificados.

Tabela 4 – Valores médios $\pm$ desvio padrão do tempo de tromboplastina parcial ativada (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	57	59	61	55	49	47	58	61	60	62
	± 3	± 9	± 4	± 3	± 6	± 8	± 10	± 7	± 6	± 9
B	59	68	60	53	44	57	64	52	63	68
	± 4	± 9	± 5	± 6	± 12	± 16	± 7	± 6	± 11	± 6
C	59	55	63	54	42	52	65	62	57	69
	± 5	± 2	± 10	± 3	± 5	± 11	± 11	± 4	± 8	± 4
D	63	67	63	62	59	57	61	60	61	68
	± 8	± 6	± 4	± 5	± 14	± 8	± 6	± 5	± 9	± 6
E	60	65	64	54	62	47	68	53	65	61
	± 3	± 8	± 6	± 6	± 6	± 8	± 5	± 5	± 7	± 11
F	65	65	62	61	59	54	62	61	70	62
	± 5	± 6	± 8	± 8	± 11	± 12	± 12	± 4	± 6	± 4

A via extrínseca está associada a danos nos vasos sanguíneos, por outro lado, a via intrínseca, é assim denominada, por ser ativada por fatores presentes no próprio sangue. Ambas as vias se convergem numa via comum a partir do fator X ativado que desencadeia a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (FRANCO, 2001).

Apesar da inexistência, na literatura, de valores de referência do TP e TTPa para bovinos, resultados semelhantes foram observados por Mendonça (2007) ao estudar a hemostasia em bezerros provenientes de embriões produzidos *in vitro* (proveta) com bezerros de cria natural. No tocante aos valores de TP os tempos médios encontrados foram de 22,78 s nos animais de proveta e de 24,33 s nos animais gerados naturalmente. Em relação aos valores de TTPa, os tempos médios variaram entre 51,65 s e 53,11 s, respectivamente, demonstrando que o método de reprodução não influencia na hemostasia.

Oliveira et al. (2010), verificando o perfil hemostático de bovinos inoculados com veneno de *Bothrops alternatus* (cobra Urutu), observaram que os bovinos no estágio basal (tempo zero – antes do envenenamento), apresentaram valores médios de 25,2 s para TP e 56,53 s para TTPa. Esses resultados apresentaram valores correspondentes aos fatores de coagulação obtidos no presente trabalho, indicando que os animais apresentaram durante o

período experimental, valores dentro dos limites fisiológicos normais (Apêndices B e C), indicando que os tratamentos utilizados não influenciaram no sistema de coagulação dos bovinos.

Reck Junior et al. (2009) ao avaliarem os efeitos da infestação de *R. microplus* sobre a hemostasia de bovinos, verificaram que os valores de TP e TTP foram aumentando progressivamente após a infestação, demonstrando que a atividade anti-hemostática dos carrapatos pode gerar alterações tanto na via intrínseca como na via extrínseca do sistema de coagulação.

Segundo Parizi, Masuda e Vaz Junior (2007) animais hematófagos desenvolveram, ao longo da evolução de suas espécies, um vasto repertório de substâncias anti-hemostáticas, tendo como principal alvo a trombina, cuja função é converter fibrinogênio em fibrina, que se deposita sobre o agregado de plaquetas, formando um tampão estável (CASTRO et al., 2006).

Na busca por novos anticoagulantes para fins terapêuticos, Horn, Santos e Termignoni (2000) isolaram a partir da saliva do *R. microplus* duas proteínas BmAP e BmAC2, que atuam inibindo a agregação plaquetária induzida por trombina. Ciprandi et al. (2006) identificaram também a microfilina, que também atua como inibidor de trombin, presente na saliva do carrapato.

Micro-organismos probióticos podem apresentar um efeito benéfico sobre a hemostasia, conforme estudo desenvolvido por Agüero et al. (2006), em que se avaliou a atividade de *Lactobacillus casei* CRL431 sobre a hemostasia de camundongos malnutridos. Os pesquisadores ofertaram a um grupo de animais uma dieta isenta de proteínas durante 21 dias, sendo que ao término deste período, verificou-se que o número de plaquetas dos animais mal nutridos (896×10^3 céls/ μ L) estava significativamente diminuído em relação ao grupo controle (1071×10^3 céls/ μ L). Os animais mal nutridos foram então subdivididos em 2 grupos, sendo que durante 7 dias, uma parte passou a receber dieta convencional e a outra dieta convencional acrescida da cepa probiótica (10^9 UFC/animal/d). Os autores observaram que apesar de ambas as dietas terem estimulado um aumento significativo do número de plaquetas, somente os animais suplementados com *L. casei* tiveram este parâmetro normalizado no final do tratamento (1114×10^3 céls/ μ L). Assim, os camundongos do grupo controle foram subdivididos da mesma forma e desafiados com *Streptococcus pneumoniae* levando-os a um quadro de pneumonia. Após 5 dias de infecção, os autores observaram que a atividade de protrombina diminuiu significativamente nos animais que receberam dieta convencional e, por outro lado, os

animais alimentados com probióticos apresentaram atividade de protrombina normal. Desta forma, os autores concluíram que a preparação probiótica avaliada promoveu melhoria da resposta imune dos animais, bem como atuou na regulação do processo inflamatório, limitando os prejuízos causados pela infecção.

Segundo Oliveira et al. (2013), as plaquetas são formadas a partir da fragmentação de megacariócitos na medula óssea e também na circulação periférica, principalmente nos pulmões onde há uma reserva de megacariócitos. O'Sullivan e Michelson (2006) afirmam que processos inflamatórios podem influenciar negativamente a produção das plaquetas. Desta forma, a modulação da resposta inflamatória pelos micro-organismos probióticos, pode ter levado a uma menor lesão tecidual favorecendo uma maior trombopoiese.

A falta de significância estatística dos resultados referentes aos tratamentos avaliados sobre o processo de hemostasia, se deve, provavelmente, à ausência de infestação por carrapatos nos animais. Tendo em vista que a saliva dos carrapatos possui substâncias anti-hemostáticas, caso os animais tivessem sido desafiados por meio da infestação por carrapatos, os resultados poderiam se apresentar alterados. Assim, as preparações probióticas e a vacina poderiam contribuir na redução da carga parasitária e consequentemente na diminuição de substâncias anti-hemostáticas presentes no organismo dos bovinos, favorecendo assim o processo de coagulação sanguínea.

4.2 AVALIAÇÃO DO TECIDO HEMATOPOÉTICO

4.2.1 Eritrograma

Segundo Jonsson (2006), a principal consequência da infestação por carrapatos é a anemia, provocada pelo processo de hematofagia desenvolvido pelo parasito. Assim, anemia é uma doença caracterizada fisiologicamente pela insuficiência de hemoglobina (HGB), podendo ser provocada por diminuição ou ausência da sua produção ou perda excessiva de hemácias, levando a condição de hipóxia, uma vez que a hemoglobina é a responsável pelo transporte de oxigênio até os tecidos (AIELLO, 2001).

Tendo em vista a avaliação do efeito das preparações probióticas sobre o estado anêmico dos animais realizou-se o eritrograma, que consiste na determinação da contagem global de hemácias, concentração de hemoglobina, percentual de hematócrito, além dos

índices hematimétricos (LEE et al., 1998), cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 5 e representados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

No que se refere ao número total de hemácias (Tabela 5), observa-se que os valores encontrados nos animais dos diferentes grupos permaneceram dentro de uma faixa estreita que variou entre $5,11 \times 10^6/\mu\text{L}$, obtida no 98º dia de tratamento nos animais do grupo C (Probiótico EEL) e $6,49 \times 10^6/\mu\text{L}$, obtida no 84º dia nos animais do grupo D (Vacina+Probiótico EEL).

Latimer (2011) reportou como valores normais para bovinos, contagens entre 5 a $10 \times 10^6/\mu\text{L}$. Desta forma, os valores obtidos (Tabela 5 -Apêndice D) estão dentro dos limites de referência e revelam que os tratamentos avaliados não influenciaram significativamente ($p>0,05$) a contagem de hemácias nos animais.

Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	5,95	5,53	5,52	5,27	5,47	5,45	5,62	5,28	5,29	5,49
	$\pm 0,39$	$\pm 0,32$	$\pm 0,22$	$\pm 0,33$	$\pm 0,30$	$\pm 0,36$	$\pm 0,40$	$\pm 0,44$	$\pm 0,48$	$\pm 0,14$
B	6,13	6,04	6,01	5,95	5,85	5,95	6,06	5,36	5,22	5,68
	$\pm 0,37$	$\pm 0,49$	$\pm 0,55$	$\pm 0,56$	$\pm 0,60$	$\pm 0,58$	$\pm 0,63$	$\pm 0,47$	$\pm 0,62$	$\pm 0,51$
C	5,74	5,37	5,52	5,17	5,16	5,36	5,52	5,11	5,17	5,23
	$\pm 0,75$	$\pm 0,69$	$\pm 0,41$	$\pm 0,14$	$\pm 0,43$	$\pm 0,85$	$\pm 0,74$	$\pm 0,34$	$\pm 0,36$	$\pm 0,19$
D	6,31	6,28	6,26	6,15	6,06	6,29	6,49	5,66	5,54	5,75
	$\pm 0,64$	$\pm 0,69$	$\pm 0,62$	$\pm 0,23$	$\pm 0,42$	$\pm 0,47$	$\pm 0,38$	$\pm 0,34$	$\pm 0,21$	$\pm 0,32$
E	6,12	5,84	6,20	5,75	5,57	5,80	6,17	5,45	5,19	5,85
	$\pm 0,42$	$\pm 0,32$	$\pm 0,48$	$\pm 0,64$	$\pm 0,64$	$\pm 0,51$	$\pm 0,68$	$\pm 0,39$	$\pm 0,14$	$\pm 0,16$
F	6,06	5,70	5,90	5,70	5,57	5,96	6,12	5,61	5,54	5,70
	$\pm 0,53$	$\pm 0,41$	$\pm 0,57$	$\pm 0,62$	$\pm 0,55$	$\pm 0,64$	$\pm 0,49$	$\pm 0,56$	$\pm 0,70$	$\pm 0,45$

Latimer (2011) reportou ainda que os valores fisiológicos normais de concentração de hemoglobina para bovinos, encontram-se entre 8 a 15 g/dL, enquanto que o percentual de hematócrito varia entre 24 a 46% e afirmou ainda que valores inferiores podem indicar um certo grau de anemia.

Os resultados representados nas Figuras 6 (Apêndice E) e 7 (Apêndice F) mostram a variação da concentração de hemoglobina e percentual de hematócritos, respectivamente, nos animais dos diferentes grupos. Observa-se que os valores médios da concentração de hemoglobina e percentual de hematócrito se mantiveram dentro dos valores de referência e não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,05$).

Embora a presença de endoparasitas não tenha sido investigada neste estudo, estes resultados indicam que os animais se mantiveram ao longo do experimento, em um bom estado de sanidade, no que diz respeito a possíveis infecções ou doenças que possam levar a um quadro de anemia.

Figura 6 – Concentração de hemoglobina no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Fonte: O autor

Figura 7 – Percentual de hematócrito no sangue dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Fonte: O autor

Diversas espécies de parasitas podem se alimentar do sangue de seus hospedeiros e/ou provocar lesões que induzem a perda de sangue e o surgimento de um quadro de anemia, como observado durante a hemoncose, oesofagostomose, eimeriose e infestações por carrapatos (AZEVEDO; ALVES; SALES, 2008). É importante frisar, ainda, que alguns ectoparasitas, além de causarem anemia por ação direta, podem ainda transmitir outras enfermidades como, por exemplo, a tristeza parasitária que compreende duas enfermidades, a babesiose e a anaplasmosse, transmitida por *R. microplus*.

De acordo com Trindade, Almeida e Freitas (2011) na babesiose a anemia está relacionada à destruição hemolítica, com baixa nos valores eritrocitários bem como da concentração de hemoglobina, ou seja, causando uma hemoglobinemia que pode resultar em icterícia e hemoglobinúria. Essa lise de hemácias tem início quando os parasitos passam pelo processo de multiplicação assexuada, ocorrendo uma diminuição do número de hemácias circulantes. No caso da anaplasmosse, a bactéria *Anaplasma marginale* infecta de 10 a 90% das hemácias dos bovinos. Após a infecção eritrocítica é detectado um aumento no número de hemácias parasitadas, podendo chegar a 10^9 hemácias infectados por mililitro de sangue, sendo que essas hemácias são posteriormente fagocitadas por células do sistema reticuloendotelial, resultando em desenvolvimento de anemia e icterícia, sem que apresente hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN et al., 2010).

As cepas de *Lactobacillus* utilizadas no preparado do Probiótico EEL do presente estudo foram avaliadas por Teixeira (2011) em ovinos naturalmente infectados por *Haemonchus contortus*. Os animais que receberam a preparação probiótica em estudo apresentaram melhores condições fisiológicas no que se refere ao estado anêmico tendo em vista o aumento na concentração de hemoglobina, número de hematócrito e concentração sérica de ferro, quando comparado ao grupo controle.

Conforme reportado por Saad (2006) a presença de micro-organismos probiótico no trato gastrointestinal, influencia favoravelmente a biodisponibilidade, a digestibilidade e a absorção de alguns nutrientes da dieta do hospedeiro. De acordo com Ybarra et al. (2003) os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácteas levam à diminuição do pH intestinal, ocasionando a solubilização de minerais e de seus complexos previamente formados. Estes elementos são melhor absorvidos pelos enterócitos na forma ionizada, atravessando com maior facilidade a membrana celular, sendo o ferro essencial na síntese de hemoglobina.

Nas condições do presente trabalho, em que os animais não foram desafiados com infecções parasitárias, deficiência nutritiva ou qualquer outro fator que pudesse causar um quadro de anemia, os tratamentos avaliados não foram suficientes para demonstrar alterações nos parâmetros que constam do eritrograma.

4.2.2 Leucograma

Segundo Lee et al. (1998) o leucograma consiste de um exame que permite a identificação e verificação da evolução de diversos processos patológicos, onde se avalia tanto a contagem global (Leucometria), como também a contagem diferencial dos leucócitos. De acordo com Brossard e Wikel (2004) a fixação do carrapato na pele do hospedeiro desencadeia uma resposta imune do hospedeiro onde se observa o envolvimento de células apresentadoras de antígenos, linfócitos e granulócitos. Além disso, durante o processo de imunização, linfócitos T auxiliares são ativados e por sua vez, induzem os linfócitos B a produzir anticorpos específicos, bem como células citotóxicas potentes (KALIL; CUNHA NETO; GUILERME, 2008).

Assim, no tocante à leucometria, cujos resultados são mostrados na Tabela 6 (Apêndice G), observa-se que os animais dos grupos avaliados apresentaram valores médios dentro dos limites preconizados para a espécie, que variam entre 4 a $12 \times 10^3/\mu\text{L}$ (LATIMER, 2011). No entanto, nos grupos onde os animais foram vacinados (B, D e F), verifica-se um aumento na leucometria 14 dias após a 1ª dose da vacina, correspondendo a 34,26% para o grupo B (vacina), 14,47% para o grupo D (Pro EEL+vacina) e 11,25% para o grupo F (Pro PT+vacina), os quais apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), em relação aos valores obtidos no tempo inicial, demonstrando que o antígeno utilizado induziu a proliferação das células do sistema imune.

Tabela 6 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem global de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	9,37 $\pm 1,80$	10,06 $\pm 3,16$	8,32 $\pm 2,44$	8,26 $\pm 1,98$	8,05 $\pm 1,34$	8,99 $\pm 1,53$	9,10 $\pm 2,33$	11,15 $\pm 5,91$	10,14 $\pm 3,04$	10,24 $\pm 3,12$
B	7,12* $\pm 3,26$	9,56* $\pm 2,47$	9,11 $\pm 2,73$	7,10 $\pm 2,25$	6,68 $\pm 1,59$	8,71 $\pm 3,83$	7,13 $\pm 3,98$	9,60 $\pm 3,39$	8,07 $\pm 3,74$	8,64 $\pm 3,45$
C	9,03 $\pm 2,22$	9,18 $\pm 2,54$	8,11 $\pm 2,31$	8,17 $\pm 3,75$	7,36 $\pm 2,00$	7,63 $\pm 3,32$	7,91 $\pm 2,91$	11,43 $\pm 6,21$	7,40 $\pm 2,38$	9,14 $\pm 2,66$
D	8,91* $\pm 2,39$	10,20* $\pm 2,99$	9,18 $\pm 2,00$	8,26 $\pm 2,80$	8,43 $\pm 2,20$	8,82 $\pm 3,20$	7,69 $\pm 1,59$	9,45 $\pm 2,85$	8,59 $\pm 2,32$	9,08 $\pm 2,33$
E	9,52 $\pm 2,14$	8,84 $\pm 3,10$	9,60 $\pm 2,49$	7,86 $\pm 2,27$	8,67 $\pm 4,25$	8,40 $\pm 1,93$	8,56 $\pm 2,78$	10,14 $\pm 3,14$	8,86 $\pm 1,03$	9,66 $\pm 0,48$
F	8,35* $\pm 2,59$	9,29* $\pm 2,39$	8,10 $\pm 1,26$	6,39 $\pm 1,17$	8,15 $\pm 1,29$	7,46 $\pm 1,08$	6,78 $\pm 0,76$	8,78 $\pm 1,79$	7,31 $\pm 1,06$	7,07 $\pm 0,54$

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – teste t

Giunchetti (2007) também observou maior contagem de leucócitos após imunizar cães com diferentes protocolos vacinais. Após a 1ª dose da vacina de *Leishmania braziliensis* associada à saliva de *Lutzomyia longipalpis* com adjuvante saponina, o autor verificou um aumento de 61,08% na contagem de leucócitos quando comparado ao grupo vacinado apenas com a saliva de *Lutzomyia longipalpis*, 33,38% em relação ao controle e 22,47% quando comparado ao grupo vacinado com *Leishmania braziliensis* associada à saliva de *Lutzomyia longipalpis* sem adjuvante. Por meio da imunofenotipagem, o autor verificou que este aumento foi devido à expansão clonal de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico.

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos, mostrados na Tabela 7, destacam-se os valores obtidos para os linfócitos. Nota-se que a ingestão dos preparados probióticos utilizados no presente trabalho promoveu um aumento gradativo do percentual de linfócitos atingindo valores máximos de 55,8% nos animais do grupo C (Probiótico EEL), 63,5% para os animais do grupo D (Probiótico EEL+vacina), 60,8% no grupo E (ProbioTick) e 59,4% no grupo F (ProbioTick+vacina). Esses valores foram encontrados no 70º dia de experimento, quando o fornecimento das referidas preparações foi interrompido, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$) em relação aos valores obtidos antes do início do experimento. Nos animais que receberam somente a vacina (Grupo B), também se observou um aumento de 47,2% no tempo inicial para 53,4% no 56º dia, porém, não significativo.

Tabela 7 – Valores médios da frequência relativa de linfócitos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupos	Tempos Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	54,4	50,2	49,0	50,4	54,6	51,4	49,6	52,8	47,0	48,8
B	47,2	49,0	52,4	51,6	53,4	52,2	46,6	44,2	39,4	40,6
C	45,2*	45,4	50,6	49,0	51,4	55,8*	43,4	46,4	41,4	39,2
D	45,0*	54,2	59,8	54,3	56,3	63,5*	51,8	52,3	48,3	49,5
E	51,4*	54,6	53,0	59,8	57,6	60,8*	53,2	53,6	45,8	43,0
F	46,2*	51,8	50,4	58,4	54,6	59,4*	50,0	49,6	45,2	43,0

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – teste t

O aumento do percentual de linfócitos nos animais dos grupos tratados com as preparações probióticas demonstra a capacidade imunomoduladora das cepas estudadas, uma vez que os linfócitos são células essenciais na resposta imune adaptativa, e podem conferir proteção mais eficaz contra patógenos por meio da capacidade de reconhecer e

memorizar um número expressivo de antígenos (DELCENSERIE et al., 2008). Os linfócitos T são responsáveis ainda pelo direcionamento da resposta imune (Th1 ou Th2), que é atribuído aos linfócitos T auxiliares (CD4+), pela destruição direta do agente invasivo (linfócitos T citotóxico - CD8+), bem como pela produção de anticorpos, que é exercida pelos linfócitos B (MACHADO et al. 2004).

Segundo Kumari et al. (2014), apesar da imunidade mediada por linfócitos T assumir importante papel durante a resposta imunológica, o mecanismo observado nas vacinações ainda não está esclarecido. Entretanto, é sabido que a presença de adjuvantes a base de óleo mineral, formam partículas que liberam o antígeno lentamente, aumentando o tempo de exposição às células do sistema imune (SINGH; O'HAGAN, 2003). Desta forma, o adjuvante Montanide 888/Marcol 52, utilizado no presente trabalho, também pode ter contribuído para a proliferação de linfócitos nos animais vacinados.

Diversos estudos tem demonstrado o aumento do número de linfócitos em animais tratados com micro-organismos probióticos. Shu, Qu e Gill (2001) relataram que leitões tratados com *Bifidobacterium lactis* HN019 apresentaram diminuição na incidência de diarreia associada com Rotavírus e *Escherichia coli*, concomitante ao aumento dos títulos de anticorpos e da resposta proliferativa dos linfócitos T.

Benyacoub et al. (2005) atribuíram à inclusão de probiótico *Enterococcus faecium* SF68 na dieta dos animais, o aumento no percentual de linfócitos T-CD4⁺ e de anticorpos IgA na mucosa intestinal e redução do número de trofozoítos de *Giardia* no intestino de camundongos.

Gonçalves et al. (2007) avaliaram a capacidade imunoestimuladora de uma preparação probiótica composta por *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Bacillus subtilis* ATCC 3131, em cães vacinados contra leptospirose. Por meio da contagem diferencial de leucócitos, os autores observaram desenvolvimento de linfocitose nos animais vacinados e que foram tratados com a preparação probiótica, sendo estes valores significativamente maiores em relação aos observados no grupo que foi apenas vacinado. Ademais, a melhora na resposta imune foi também evidenciada pelo aumento nos títulos de anticorpos produzidos no grupo tratado com a preparação probiótica.

Ao estudar o efeito de uma preparação probiótica no combate a ancilostomíase canina, Coelho (2010) observou que cães tratados com o preparado probiótico composto de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4536, *L. delbruekii* UFV H2B20 e *L. plantarum* ATCC 8014 na forma de “pool” durante 28 dias, apresentaram aumento significativo no número de linfócitos nas duas últimas semanas do experimento em relação ao tempo inicial. Os

animais tratados também apresentaram maiores títulos de anticorpos IgE em relação ao grupo controle.

Dong et al. (2011) ao avaliarem o efeito “*in vitro*” do *Lactobacillus casei* Shirota sobre células do sistema imune, utilizando uma cultura de células mononucleares do sangue periférico humano (PMBC), observaram que esta cepa foi capaz de ativar células T evidenciada pelo aumento da expressão de CD25 e CD69.

Ao estudar o efeito das cepas que compõem a preparação EEL, avaliada no presente trabalho, sobre o sistema imunológico de camundongos Swiss, Duarte (2011) também verificou o aumento do número de linfócitos nos animais tratados tanto com o preparado na forma de “pool” como nas formulações individuais constituídas pelas respectivas cepas. O autor destacou ainda o aumento na concentração de IgA e de IL-10 na mucosa intestinal dos animais.

Para avaliar o efeito de micro-organismos probiótico sobre a resposta imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Minnesota, Lourenço et al. (2013) estudaram uma preparação probiótica na forma de “pool” composta por *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarium*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*. Aves suplementadas com os respectivos probióticos, aos 7 dias de idade apresentaram aumento significativo de células caliciformes e CD4⁺ no íleo e de células CD8⁺ no ceco quando comparadas ao grupo controle. No 14º dia os animais foram desafiados com *Salmonella* e uma nova avaliação foi realizada aos 35 dias, sendo observado um aumento significativo das células CD8⁺.

Os resultados obtidos no presente trabalho e pelos autores citados acima demonstram o efeito imunomodulador dos micro-organismos probióticos combinado à vacinação contra carrapato, reforçando a hipótese de que estes apresentam potencial ação carrapaticida, uma vez que seus efeitos sobre a imunidade são opostos aos da modulação realizada pelos carrapatos para se defender da resposta imune do hospedeiro. De acordo com Wikel (1996), os carrapatos podem modular as respostas imunes inata e adaptativa dos hospedeiros, por meio de moléculas presentes em sua saliva. Além de conter inibidores da via alternativa de ativação do complemento, de anafilatoxinas e de células “natural killer”, que participam da imunidade inata, a saliva também reduz a produção de citocinas pelos macrófagos, o que prejudica os primeiros passos no desenvolvimento da imunidade adaptativa, alterando os sinais para os linfócitos T e B, tornando a capacidade proliferativa dos linfócitos deficitária.

No tocante ao percentual dos eosinófilos (Tabela 8), que são leucócitos envolvidos na resposta contra a infestação por helmintos e em reações alérgicas, verifica-se, nos animais do grupo B, que foram apenas vacinados, um aumento significativo ($p<0,05$) a partir do 84º dia, passando de 9,6% no 70º dia para 16,8% e atingindo o maior valor (19,8%) no 98º dia, próximo do valor de referência para a espécie que é de 20%, conforme preconizado por Latimer (2011).

Tabela 8 – Valores médios da frequência relativa de eosinófilos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos

Grupos	Tempos Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
A	8,2	6,8	9,2	8,2	12,8	11,6	11,2	13,6	13,6	12,8
B	8,4 ^a	9,4 ^a	8,0 ^a	7,8 ^a	9,6 ^a	9,6 ^a	16,8 ^b	19,8 ^b	15,2 ^{a,b}	14,2 ^{a,b}
C	7,0	7,0	6,6	9,4	7,6	7,0	10,0	9,2	9,6	10,6
D	11,0	8,6	5,8	9,5	11,8	10,5	11,5	12,8	11,3	10,0
E	13,2	10,4	10,0	7,0	7,8	9,4	11,6	11,2	8,0	9,3
F	13,2	10,6	8,2	10,6	7,2	7,0	11,6	12,4	11,4	10,0

Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) pela ANOVA

Tendo em vista o aumento no percentual de eosinófilos detectado a partir do 84º dia, nos animais do grupo B (vacina), é possível inferir que os animais possam ter sido acometidos por alguma verminose, cuja patogenia não leva a um quadro de anemia, conforme observado nas avaliações dos eritrogramas, onde não se verificou alterações eritrocíticas. Segundo Abbas, Lichtman e Pillai, (2015), os eosinófilos estão diretamente envolvidos na resposta imune contra organismos como os helmintos, por meio da ação de seus grânulos citoplasmáticos contendo proteínas catiônicas, uma vez que essas proteínas são capazes de causar lesão tecidual e apresentam toxicidade a estes parasitos.

Em relação aos animais dos grupos que receberam as preparações probióticas, nota-se que os valores de eosinófilos encontram-se bem abaixo do limítrofe, em todo o período experimental, mesmo após a interrupção do tratamento. Apesar de não representar uma diferença significativa ($p>0,05$), quando comparados aos grupos A (controle) e B (vacina), estes resultados sugerem que os micro-organismos probióticos das referidas preparações podem ter contribuído na prevenção de uma possível infecção helmíntica.

No que diz respeito à contagem diferencial dos neutrófilos, monócitos e basófilos, os valores encontrados permaneceram constantes durante os tratamentos não permitindo inferências dignas de nota (Apêndice H).

4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Moléculas de anticorpos, denominadas de imunoglobulinas (Ig), estão presentes no sangue e nas secreções das mucosas sendo responsáveis pela resposta imunológica humoral desenvolvida contra agentes patogênicos e toxinas, agindo no sentido de neutralizar ou eliminar estes agentes. Sabe-se que os anticorpos produzidos pelo hospedeiro, durante infestações com carrapatos ou após imunizações com antígenos, são ingeridos pelos carrapatos e permanecem ativos na hemolinfa durante, pelo menos, 48 horas após sua ingestão podendo, portanto, exercer efeitos deletérios importantes sobre os tecidos desses parasitos, sendo observado em *Dermacentor variabilis* (ACKERMAN et al., 1981), *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG; NUTTALL, 1994), *R. (B.) microplus* (VAZ JUNIOR et al., 1996) e *Amblyomma americanum* (JASINKAS et al., 2000).

Neste contexto, para se avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a imunidade humoral dos animais, estudou-se a cinética de produção de anticorpos IgG e IgM totais séricos, bem como a produção de IgG específica anti rGST-HI, por meio do teste de ELISA.

No que tange à produção de anticorpos totais da classe IgG, mostrados na Figura 8 (Apêndice I), observa-se um aumento dos níveis deste anticorpo em relação ao tempo inicial nos grupos estudados, com exceção do grupo A (controle). Verifica-se que, no grupo C, onde os animais receberam o probiótico EEL, a concentração de IgG sérica do tempo inicial foi de 47,989 mg/mL e o nível máximo atingido foi de 63,794 mg/mL no 56º dia de tratamento. Nos animais do grupo E tratados com ProbioTick, a concentração inicial foi de 58,724 mg/mL, sendo que o pico de produção (71,213 mg/mL) foi detectado no 70º dia, quando se encerrou o tratamento. Apesar deste aumento, os valores apresentados não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) em relação aos demais grupos, entretanto, estes resultados não revelam uma ineficácia dos probióticos, uma vez que a modulação direta do sistema imunológico se dá pela colonização da mucosa intestinal,

estimulando o tecido linfoide associado ao intestino (GALT) a produzir IgA, sendo detectada no lavado intestinal, enquanto que a IgG é a imunoglobulina com maior concentração no plasma, compreendendo de 65 a 80% do total de imunoglobulinas (SOUZA et al., 2010).

Figura 8 – Cinética de produção de IgG sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Fonte: O autor

De acordo com Roitt et al. (2013) a função da IgG é participar da opsonização, ativar o sistema de complemento e induzir a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo. Por outro lado, o principal papel da IgA é de proteger o organismo da invasão de patógenos através das mucosas, uma vez que IgA é a classe de anticorpo predominante das mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário, além de estar presente nas secreções como saliva, lágrima, leite, suor e líquido nasal.

Em relação aos animais que foram vacinados, observa-se que os níveis máximos de IgG corresponderam a 72,769 mg/mL (grupo B) e 93,735 mg/mL (grupo D) após 56 dias de tratamento e 98,825 mg/mL no 42º dia nos animais do grupo F. Ressalta-se que os valores máximos de IgG obtidos nos animais dos grupos D e F (vacinados e tratados com probióticos), diferem estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, indicando que a vacinação contribui para a resposta imune secundária dos bovinos. Segundo Murphy (2014), após o primeiro contato do organismo com um antígeno, são produzidas células de memória oriundas da diferenciação de linfócitos B e T, e em caso de um novo contato,

como induzido pelas 3 doses, observado no esquema de imunização do presente trabalho, desencadeia a resposta imunitária secundária, sendo mais intensa que a primária e caracterizada pela produção predominante de IgG.

A cinética de produção dos anticorpos da classe IgM, representada na Figura 9 (Apêndice J), demonstra que os tratamentos avaliados não interferiram significativamente nos níveis de IgM total. Apesar da IgM ser a principal imunoglobulina da resposta primária, ou seja, resultante do contato inicial com um antígeno, Abbas, Lichtman e Pillai (2015) relatam que a quantidade de anticorpos produzidos nesta fase da imunização é menor e a concentração sérica diminui rapidamente em comparação com a resposta secundária, que ocorre após repetidos contatos com o mesmo antígeno. Desta forma, os tratamentos avaliados não induziram a produção de IgM suficiente para que pudesse ser detectada pelo teste de ELISA para anticorpos totais IgM.

Figura 9 – Cinética de produção de IgM sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Fonte: O autor

No tocante a produção de anticorpos anti rGST-HI nos animais imunizados, cujos resultados encontram-se representados na Figura 10 (Apêndice K), nota-se que os animais do grupo F (Probiotick+vacina) apresentaram nível máximo (2,133 de D.O. 492 nm) com 42 dias de tratamento, sendo que nos animais dos grupos B (vacina) e D (Probiótico EEL+vacina) estes níveis corresponderam a 1,595 e 2,109 de D.O. 492 nm, respectivamente, no 56º dia de tratamento. Esses resultados, associados à cinética do IgG total (Figura 8), comprovam a eficácia da vacinação na resposta imune secundária, bem

como demonstram que as preparações probióticas avaliadas contribuíram com a eficácia desta resposta. Assim, nos tempos experimentais avaliados, onde se observou maior produção de anticorpos anti rGST-HI, os valores das D.O nos grupos D e F diferiram estatisticamente ($p<0,05$) quando comparados aos valores obtidos no mesmo período, nos animais do grupo B.

Figura 10 – Cinética de produção de IgG específica anti rGST-HI sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Letras diferentes sobre colunas referente ao mesmo tempo experimental significam que ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) pela ANOVA entre os grupos.

Fonte: O autor

Em relação à fase de declínio de produção de anticorpos da resposta secundária, observada após o 70º dia, os animais dos grupos tratados com probiótico apresentaram níveis superiores de IgG anti rGST-HI em relação aos animais do grupo B (imunizados), sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) até o dia 98, 10 semanas após a aplicação da terceira dose. Estes resultados demonstram que, além de contribuírem com produção de anticorpos, os micro-organismos probióticos permitiram o prolongamento da resposta imune, conferindo uma imunidade mais duradoura. Vale ressaltar que o tratamento com as preparações probióticas foi interrompido no 70º dia, justamente com o objetivo de se verificar a durabilidade da resposta imune em comparação com os animais que foram apenas imunizados. Estes resultados demonstram a importância do uso frequente de preparações probióticas na dieta dos animais.

Ao imunizar bovinos com rGST-HI, utilizando 6 doses com intervalos de 15 dias Parizi et al. (2011) verificaram um nível máximo de anticorpos IgG com 42 dias após a última dose. Assim, ao final deste período, os animais foram infestados com larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Constatou-se que depois de 20 dias de infestação, o número e o peso dos carrapatos ingurgitados nos bovinos vacinados, eram respectivamente 53,08% e 52,34% menores em relação ao grupo controle. Observou-se ainda que a oviposição foi reduzida em 0,6% e a fertilidade dos ovos em 7,99%. Os autores consideraram que apesar da GST recombinante do *Haemaphysalis longicornis* apresentar potencial para induzir imunidade cruzada contra outras espécies de carrapatos, o nível de proteção conferido por esta vacina foi parcial, tendo em vista que apenas o desenvolvimento dos adultos foi afetado. Contudo, o uso dessa proteína conjuntamente com outros antígenos que interferem na capacidade reprodutiva, como a BYC (*Boophilus* Yolk Catepsina) pode potencializar a vacina, de acordo com Leal et al. (2006).

No que diz respeito ao potencial dos micro-organismos probióticos como imunomoduladores, Rizzardini et al. (2012) investigaram a capacidade de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (BB-12) e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (*L. casei* 431) para modular o sistema imunológico usando como modelo de vacinação indivíduos humanos saudáveis. Para tanto, 211 indivíduos consumiram uma vez por dia durante 6 semanas 10^9 UFC das referidas cepas ou um placebo correspondente. Após 2 semanas, foi administrada uma vacina contra a gripe sazonal. Alterações na produção de IgG plasmática específica da vacina, foram significativamente maiores em ambos os grupos probióticos comparado ao grupo placebo, sendo que o mesmo foi observado para os níveis de IgA presente na saliva. Quanto a concentração de IgM plasmática, não foi observada diferença entre os grupos. Os autores concluíram que os micro-organismos probióticos contribuíram efetivamente para a resposta secundária, tendo em vista o aumento dos anticorpos da classe IgG, assim como verificado do presente trabalho.

Kandasamy et al. (2014) avaliaram o efeito da colonização de *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium animalis lactis* Bb12 em suínos gnotobióticos sobre a resposta contra a vacina para o rotavírus humano. Após desafio, os animais colonizados com os probióticos apresentaram redução da incidência da diarreia correlacionada com títulos de anticorpos de IgA anti-rotavírus intestinal mais elevados, quando comparados com os animais não colonizados e vacinados.

Hu et al. (2016) reportaram em trabalho realizado com frangos imunizados com a vacina contra a doença de Newcastle (La Sota), maior conteúdo de IgG, IgM e IgA, além

de maior expressão de IL-7 na mucosa associada ao tecido linfoide. Estes conteúdos foram obtidos após tratamento com probiótico composto por cepas dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, demonstrando que a maior produção de anticorpos e maior contagem de linfócitos, encontrada nos animais dos grupos tratados com probióticos, podem ser em decorrência da interação entre os micro-organismos probióticos com células produtoras de citocinas. Segundo Varela e Forte (2001) a interleucina-7 (IL-7) apresenta receptores expressos na membrana das células progenitoras dos linfócitos B, tendo portanto, a função principal de estimular a proliferação dessas células.

Apesar das evidências apresentadas no presente trabalho, associadas à literatura pertinente, sobre o efeito benéfico dos micro-organismos probióticos, como imunomodulador durante a imunização dos bovinos com a rGST-HI, onde os probióticos se mostraram eficazes frente a outros antígenos, ainda se fazem necessários novos estudos para elucidar este mecanismo.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A preparação probiótica constituída por 4 cepas de *Lactobacillus*, na forma de “pool”, bem como o probiótico ProbioTick, não exerceram efeito significativo sobre a hemostasia e os parâmetros eritrocitários dos bovinos, nas condições do presente trabalho.
- Tanto a preparação EEL quanto a Probiotick estimularam o sistema imune dos animais, aumentando o número de linfócitos, que por sua vez, estão diretamente envolvidos com a resposta imune.
- A vacina composta de proteína recombinante glutathione S-transferase *Haemaphysalis longicornis* (rGST-HI) induziu a resposta imune adquirida dos bovinos, promovendo o aumento das concentrações de anticorpos totais IgG e anticorpos IgG anti rGST-HI durante resposta secundária.
- Animais que foram vacinados e tratados com os probióticos apresentaram níveis superiores de anticorpos específicos e de forma mais duradoura. Assim, a inclusão de micro-organismos probióticos na dieta dos animais pode ser uma alternativa viável no controle de infestações por carrapatos atrelados a imunização.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando um melhor entendimento sobre a ação dos micro-organismos probióticos sobre a infestação em bovinos por carrapatos, bem como seu efeito imunomodulador frente ao esquema de vacinação utilizado, os resultados do presente trabalho permitem sugerir a realização de novos experimentos, tais como:

- Testar as preparações probióticas, juntamente com a vacina, em animais infestados por carrapatos, permitindo assim uma avaliação direta do efeito carrapaticida por meio das análises dos parâmetros biológicos como a determinação do número de fêmeas ingurgitadas, bem como seu peso e sua capacidade reprodutiva.

- Avaliar animais, tratados por meio da administração frequente da preparação probiótica e vacinados, os quais seriam infectados experimentalmente com larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, visando avaliar o efeito do tratamento na prevenção da infestação.

- Estudar a resposta imune por meio da dosagem de citocinas e da contagem da subpopulação de linfócitos, com vistas a elucidar o efeito imunomodulador apresentado pelos micro-organismos probióticos.

REFERÊNCIAS

ABATEPAULO, A. R. R. **Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Boophilus microplus*: estudo dos correlatos histológicos e moleculares de resistência e de susceptibilidade**. 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Departamento de Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2007.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 564 p.

ACKERMAN, S. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). **The Journal of Parasitology**, v. 67, n. 5, p. 737-740, 1981.

AGÜERO, G. et al. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* in malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation. **Nutrition**, v. 22, p. 810-819, 2006.

AIELLO, S. E. **Manual Merck de veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. 1861 p.

ALMEIDA, A. T. S. et al. Parâmetros biológicos das fases não-parasitárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) infestados em bovinos sob condição controlada. **PUBVET**, v. 5, n. 39, p. 186-206, 2011.

AMARAL, J. F. et al. Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. **Immunology**, v. 29, n. 3, p. 455-464, 2010.

ANDERSON, J. M.; AMMERMAN, N. C.; NORRIS, D. E. Molecular differentiation of metastriate tick immatures. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 4, n. 4, p. 334-342, 2004.

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36 p.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 938-956, 2014.

AURELI, P. et al. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366-376, 2011.

ÁVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.

AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 1, p. 8-19, 1995.

AYABE, T. et al. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature Immunology**, v. 1, p. 113-118, 2000.

AZEVÊDO, D. M. M. R.; ALVES, A. A.; SALES, R. O. Principais ecto e endoparasitos que acometem bovinos leiteiros no Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 2, n. 4, p. 43-55, 2008.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas**. Porto Alegre: Artmed, 1998. 118 p.

BANCHEREAU J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review Immunology**, v. 56, p. 767-811, 2000.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical**. São Paulo: Butantan, 2006, 223 p.

BATISTA, C. G. et al. Desempenho e saúde de bezerras alimentadas com leite sem resíduo de drogas antimicrobianas ou leite de vacas tratadas contra mastite adicionado ou não de probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 185-191, 2008.

BENYACOUN, J. et al. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 153, p. 1171-1176, 2005.

BERNARDEAU, M.; VERNOUN, J. P.; GUEGUEN, M. Safety and efficacy of probiótico lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 19-27, 2002.

BEZERRA, A. S. et al. Ectoparasitos em caprinos e ovinos no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, p.114-120, 2010.

BIENENSTOCK, J., et al. New insights into probiotic mechanisms a harvest from functional and metagenomic studies. **Gut Microbes**, v. 4, p. 1–7, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 1 de dezembro de 2004. Dispõe sobre os procedimentos a serem adotados para avaliação de segurança de uso, registro e comercialização dos aditivos utilizados nos produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 dez. 2004. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>. Acesso em: 10 dez. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 21 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. 2011. **Lista de aditivos autorizados para uso em produtos destinados à alimentação animal – geral com exceção dos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal/LISTAGEM%20ADITIVOS%20AUTORIZADOS%20_29_07_2011%20REV.doc. Acesso em 10 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. **Projeções do agronegócio: Brasil 2015/2016 a 2025/2026**. Brasília: MAPA, 2016, 136 p.

BRITO, L. G. et al. **Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006, 21 p.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. et al. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal**, v. 19, n. 1, p. 44-48, 2010.

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

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1994.

BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: an augmented review. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 4, p. 43-152, 1983.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review Biochemistry**, v. 58, p. 79-110, 1989.

CARDOSO, V. et al. Estimates of heritability for resistance to *Boophilus microplus* tick evaluated by an alternative method in a commercial Polled Hereford x Nelore population in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION 8., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte. p. 12-16

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

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CASTRO, K. N. C. et al. Ação de óleos e extratos vegetais no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2011.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011.

CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Exp. Parasitol.**, v. 114, p. 40-46, 2006.

COELHO, M. D. G. **Avaliação do uso de probióticos no controle da infecção causada por Ancylostomidae em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados.** 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2010.

COLLADO, M. C. et al. Indigenous lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. **J. Food Sci.**, v. 72, p. 89-93, 2007.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 54-59, 2004.

COUTINHO, T. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2008.

COUTINHO, T. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre a sanidade de bezerros desmamados e bezerras em fase de aleitamento**. 2012. 138 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

DALLOUL, R. A. et al. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by *Lactobacillus*-based probiotic. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 28, p. 351-361, 2005.

DE LA FUENTE, J. et al. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 754-769, 2016.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 8, p.1058-1071, 2006.

DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 10, p. 37-54, 2008.

DONG, H. et al. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 161, n. 2, p. 378–388, 2011.

DUARTE, P. F. **Avaliação de cepas de microrganismos probióticos a base de *Lactobacillus* sobre o sistema imunológico de camundongos Swiss**. 2011. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, EEL-USP, Lorena, SP, 2011.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 75, p. 789–808, 2002.

FINK, L.N. et al. Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. **Int. Immunol.**, v. 19, p. 1319–1327, 2007.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2016.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, v. 34, p. 229-237, 2001.

FRANZIN, A. M. **Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estudo de correlatos imunes de resistência e de susceptibilidade.** 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2009.

FREITAS, W. L. C. **Estudo do efeito de microrganismos probióticos sobre *Eimeria acervulina* (Tyzzer, 1929) em frangos de corte.** 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2011.

FURLAN, R. L. Probióticos e prebióticos no desenvolvimento morfo-fisiológico do trato gastro-intestinal. In: CONFERÊNCIA FACTA 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Santos, **Anais...** Santos: FACTA, p. 229-237, 2010.

FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções.** Juiz de Fora-MG. EMBRAPA Gado de leite, 2005, 65 p.

FURLONG, J.; SALES, R. O. Controle estratégico de carrapatos no bovino de leite: uma revisão. **Rev. Bras. Hig. San. Anim.**, v. 1, n. 2, p. 44-72, 2007.

GALDEANO, C. M. et al. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. **Clin. Vacc. Immun.**, v. 14, n. 5, p. 485–92, 2007.

GALDEANO, C. M. et al. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 64, p. 1-14, 2011.

GALLINA, T. et al. **Utilização de probióticos no controle da infecção de *Haemonchus contortus* em ovinos**. Pelotas, 2009. 4 p. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA00710.pdf>> Acesso em 05 jun. 2016.

GARCIA, G. R. **Caracterização microbiológica de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerros da raça holandesa**. 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Jaboticabal, SP, 2008.

GIUNCHETTI, R. C. **Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina**. 2007. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2007.

GONÇALVES, M. et al. Avaliação da capacidade imunoestimulante e da estabilidade de um probiótico empregado em rações de cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 25-30, 2007.

GONÇALVES, R. C. et al. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. **Semina Ciências Agrárias.**, v. 32, n. 1, p. 307-312, 2011.

GONÇALVES, V. M.; HUERTA, M.; FREITAS, R. A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Ciên. Vet. Saú. Púb.**, v. 3, n. 1, p. 14-22, 2016.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R.; WAGNER, E. M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (CAN. 1887) em bovinos estabulados. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v. 2, p. 25-34, 1975.

GRISI, L. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUERRERO, F. D. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasit. Vectors**, v. 7, p. 475-480, 2014.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 202-209, 2009.

HAJDUSEK, O. et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v. 28, p. 2993-2998, 2010.

HAURY, M. et al. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, p. 1557-1563, 1997.

HAZIR, S. et al. Diversity in Distribution of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Biodiv. Conserv.**, v. 12, p. 375-386, 2003.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 464 p.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Institute of Hygiene and Toxicology**, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

HORN, F.; SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 68-73, 2000.

HU, L. et al. Effects of probiotic on the expression of IL-7 gene and immune response to Newcastle disease. **Int. J. Vet. Health Sci. Res.**, v. 4, n. 6, p. 140-148, 2016.

HUAYNATE, R. R. A. et al. Efeito da adição de probiótico em dietas de leitões desmamados sobre as características do sistema digestório e de desempenho. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 14, p. 248-258, 2013.

HUMEN, M. A. et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1265-1269, 2005.

IJIMA, H. et al. T. Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 4, p. 471-482, 2004.

JASINSKAS, A. et al. *Ambylomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Experimental Parasitology**, v. 96, p. 213-211, 2015.

JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 16, p. 45-53, 2015.

JOHANSSON, M. E. V.; LARSSON, J. M. H.; HANSSON, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. **PANS**, v. 108, p. 4659-4665, 2011.

JOHNSTON, L. A. Y.; KEMP, D. H.; PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. **Intern. Journal of Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 27-34, 1986.

JONSSON, N. N. et al. Evaluation of TickGARD^{PLUS}, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 275-285, 2000.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

KAGAWA, K.; FUKUTAKE, K. Prothrombin time and its standardization: a potentiality to introduce INR method in criteria for disseminated intravascular coagulation. **Rinsho Byori**, v. 50, n. 3, p. 277-282, 2002.

KALIL, J.; CUNHA NETO, E.; GUILHERME, L. Novas estratégias de vacinas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 65-71, 2008.

KANDASAMY, S. et al. Lactobacilli and Bifidobacteria enhance mucosal B cell responses and differentially modulate systemic antibody responses to an oral human rotavirus vaccine in a neonatal gnotobiotic pig disease model. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 639-651, 2014.

KAPILA, R. et al. Comparative evaluation of oral administration of probiotic Lactobacilli-fermented milks on macrophage function. **Probiotics Antimicrob. Proteins**, v. 4, p. 173–179, 2012.

KASSAB, S. O et al. Isolados de fungos entomopatogênicos no controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 222-225, 2011.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, v. 622, p. 58-69, 2007.

KEMGANG, T. S. et al. Cross-talk between probiotic Lactobacilli and host immune system. **Journal Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 303-319, 2014.

KIMURA, N. et al. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chicken. **Poult Sci.**, v. 55, n. 4, p. 1375-1383, 1976.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, v. 167, p. 95-107, 2010.

KOURELIS, A. et al. Validation of the dorsal air pouch model to predict and examine immunostimulatory responses in the gut. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 274–284, 2010.

KUMARI, J. et al. Cell-mediated immunity and vaccines. **J. Immunol. Res.**, v. 2014, p. 1-2, 2014.

LATIMER, K. S. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. 5th ed. Oxford: WileyBlackwell, 2011. 524 p.

LAUZON, H. L. et al. Probiotics and prebiotics: concepts, definitions and history. In: MERRIFIELD, D.; RINGO, E. **Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2014. p. 169-184.

LAVERMICOCCA, P. et al. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4233–4240, 2005.

LAVINA, M. S. et al. Ixodídeos coletados de equinos e caninos no Estado de Santa Catarina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 36, p 79-84, 2014.

LÁZARO, S. F. et al. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 194, p. 79-82, 2013.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

LEAL, A. T. et al. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 341-345, 2006.

LEBLANC, A. M. et al. Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases. **International Scholarly Research Network Gastroenterology**, v. 20, p. 1-11, 2011.

LEE, G. R. et al. **Wintrobe**: hematologia clínica. 9. ed. São Paulo: Manole, 1998. v. 1, 1424 p.

LE MOS, A. M. **A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1986. 42 p.

LIMA, M. F. R.; et al. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 7, p. 747-754, 2002.

LIND, S. E.; MARKS, P. W.; EWENSTEIN, B. M. Hemostatic system. In: **Blood: principles and practice of hematology**. 2nd ed. Filadelfia: Lippincot Williams & Wilkins, 2003. 981 p.

LIU, J. K. et al. Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 4491–4497, 2009.

LODDI, M. M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

LOGULLO, C. et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, p. 525-532, 1998.

LOURENÇO, M. C. et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, p. 11-14, 2000.

MACHADO, I. R. **Potencial dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Federal do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAGNABOSCO, C. U. et al. Probióticos melhoram a qualidade do leite de vacas Girolando. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador. **Anais ...**, Salvador: SBZ, 2010.

MALDONADO, G. C.; PERDIGON, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, p. 219–226, 2006.

MARTIN, F. P. J. et al. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 2185-2193, 2006.

MARTINS, A. K. S. et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 12, p. 995-1003, 2010.

McKENNA, R. V. et al. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasit. Immunol.**, v. 20, p. 325- 336, 1998.

MENDONÇA, A. J. **Avaliação hematológica, bioquímica e hemostática de bezerros Brahman provenientes de produção *in vitro* (PIV) e bezerros Brahman de produção *in vivo***. 2007. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

MENEZES, J. S. et al. Immunological activities are modulated by enteral administration of an elemental diet in mice. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 643-652, 2006.

MULENGA, A. et al. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 4, p. 1652–1658. 1999.

MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169–172. 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHONOLGY INFORMATION. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6941>>. Acesso em 05 jan. 2017.

NEUMANN, M. et al. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) visando à produção de cordeiros Ile de France super precoces em sistema de *creep-feeding*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2285-2292, 2008

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos: revisão de literatura. **Revista Bras. Ciência Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

NUTTAL, P. A. et al. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne disease. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 4, p. 155-163, 2006.

OJEDA, M. M. et al. C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatígeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). **Revista Mexicana de Ciencias Pecuárias**, v. 2, n. 2, p. 177-192, 2011.

OLIVEIRA, I. et al. Plaquetas: papéis tradicionais e não tradicionais na hemostasia, na inflamação e no câncer. **Arq. Bras. Ciência da Saúde**, v. 38, n. 3, p. 153-161, 2013.

OLIVEIRA, N. J. F. et al. Perfil hematológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno de *Bothrops alternatus*. **Rev. Bras. Ciência Veterinária**, v. 17, p. 38-45, 2010.

OLIVO, C. J. et al. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 406-410, 2008.

OLIVO, C. J. et al. Extrato aquoso de fumo em corda no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1131-1135, 2009.

O'SULLIVAN, B. P.; MICHELSON, A. D. The inflammatory role of platelets in cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 173, n. 5, p. 483-490, 2006.

OUWERKERK, J. P.; VOS, W. M.; BELZER, C. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, p. 25-38, 2013.

PAIVA NETO, J. **Estudo de incidência e localização de carrapatos em bovinos Nelore, Holandes e Curraleiro no distrito Federal.** 2004. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/ct034.pdf>> Acesso em 20 out 2016

PARIZI, L. F. et al. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Exp. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 113-118, 2011.

PARIZI, L. F. **Proteção cruzada contra a infestação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos vacinados com a glutathione-S-transferase recombinante de *Haemaphysalis longicornis*.** 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. S. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 285-294, 2007.

PEREIRA, C. A. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Eimeria* spp. em *Rattus norvegicus*.** 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2007.

PEREIRA, C. A. S.; COSTA, M. S. Avaliação do efeito antiparasitário de probióticos em primatas do velho mundo, mantidos em cativeiro, no Zoológico Municipal de Volta Redonda - RJ. **Cadernos UniFOA**, n. 26, p. 123-129, 2014.

PEREIRA, M. C. et al. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência.** São Paulo: MedVet, 2008. 169 p.

PÉREZ, P. F. et al. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5037–5042, 2001.

PIPER, E. K. et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 1074-1086, 2009.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RAND, K. N. et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 9657-9661, 1989.

RANDAZZO, V.; COSTAMAGNA, S. R. Effect of oral administration of probiotic agents *Trichinella spiralis*-infected mice. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 55-59, 2005.

RAVAL, A. P. et al. Effect of probiotics supplementation on nutrient utilization, production performance and economics of feeding in lactating kankrej cows. **Indian J. Anim. Nutr.**, v. 30, n. 2, p. 113-118, 2013.

RECK JUNIOR, J. **Farmacologia da saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: papel da modulação da hemostasia na relação parasito-hospedeiro**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

RECK, J. J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, p. 128-136, 2014.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood-feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 48, p. 73-88, 2003.

RIDING, G. A. et al. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **J. Immunol.**, v. 153, p. 5158-5166, 1994.

RIVULGO, V. M. et al. Efficacy of the probiotic strain *Enterococcus faecalis* CECT7121 in diarrhoea prevention in newborn foals. **Revista Veterinária**, v. 27, p. 3-6, 2016.

RIZZARDINI, G. et al. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12® and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. casei* 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Br. J. Nutr.**, v. 107, n. 6, p. 876-884, 2012.

RIZZELLO, V. et al. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 1, p. 1-10, 2011.

ROCHA, C. M. B. M. et al. Perceptions about the biology of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* among milk producers in Divinópolis, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 289-294, 2011.

ROCHA, P. M. C.; BARROS, M. E. G.; EVENCIO NETO, J. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n. 4, p. 312-316, 2016.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.

RODRIGUEZ, M. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 135-146, 1994.

ROITT, I. M. et al. **Fundamentos de Imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 568 p.

ROSS, G. R. et al. Effects of probiotic administration in swine. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 545-549, 2010.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

SAMISH, M.; ALEKSEEV, E. Arthropods as predators of ticks (Ixodoidea). **J. Med. Ent.**, v. 38, n. 1, p. 1- 11, 2001.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 159-182, 1999.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANTARÉM, V. A.; SARTOR, I. F. The free-living phase and seasonal variation of *Boophilus microplus* in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 11-19, 2003.

SANTOS, J. F. et al. O efeito da cultura de *Zymomonas mobilis* na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 502-504, 2004.

SARAIWA, A. S. L. et al. **Manual de diagnostico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012, 132 p.

SCHOLZ-AHRENS, K. E. et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats — impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. **NFS Journal**, v. 3, p. 41-50, 2016.

SEQUEIRA, T. S. G. O. et al. Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 2, p. 105-109, 2014.

SHARMA, P. et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176–195, 2014.

SHU, Q.; QU, F.; GILL, H. S. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal Pediatric Gastroenterological Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2001.

SILVA, K. C. F. et al. Efeito de um simbiótico sobre o ganho de peso e número de ovos por grama de fezes de cordeiros confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 953–962, 2009.

SINGER, S. M.; NASH, T. E. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. **Journal Infectious Diseases**, v. 181, p. 1510–1512, 2000.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 469–478, 2003.

SOARES, J. F. et al. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1495-1497, 2007.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University, 1993, 447 p.

SOUZA, F. S. et al. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, p. 86-97, 2010.

STOLAKI, M. et al. Lactic acid bacteria in the gut. In: LAHTINEN, S. et al. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Boca Raton: CRC, 2012. p. 385-401.

STROMPFOVÁ, V. et al. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. **Anaerobe**, v. 12, p. 75-79, 2006.

SUZUKI, K. et al. Intestinal IgA synthesis: a primitive form adaptative immunity that regulates microbial communities in the gut. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 127-135, 2007.

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Biotecnologia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2011.

TEMSAHY, M. M. E. et al. Evaluation of newly isolated probiotics in the protection against experimental intestinal trichinellosis. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 303-314, 2015.

TIERNEY, J. et al. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion by indigenous chicken *Lactobacillus* species. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 171-182, 2004.

TOBITA, K.; YAKANA, H.; OTANI, H. Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergy symptoms in mice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 5586–5590, 2010.

TORTORA, G. J. **Princípios de anatomia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 110 p.

TRIMNELL A. R. et al. A crossreactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, p. 4329–4341, 2005.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C. Tristeza parasitária: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1-21, 2011.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Function Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

TSENG, L. W. et al. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.9, p.1455-1460, 2001.

TSUDA, A. et al. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. **Vaccine**, v. 19, p. 4287-4296, 2001.

UTIYAMA, C. E. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, 2006.

VARELLA, P. P.; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VAZ JUNIOR, I. S. et al. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 3, p. 329-335, 2004.

VAZ JUNIOR, I. S. et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 155-160, 1996.

VAZ JUNIOR, I. S.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. **Pesquisa para uma vacina contra o carrapato**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. 27 p.

VERÍSSIMO, C. J. **Controle de carrapato nas pastagens**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2013a, 99 p.

VERÍSSIMO, C. J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Rev. Edu. Conti. Med. Vet. Zoot. do CRMV-SP**, v. 11, n. 1, p. 14-23, 2013b.

VIDOTTO, O. **Principais parasitas que afetam os bovinos e estratégias de controle** 2002. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1112>> Acesso em 05 jan. 2015.

VILLAVICÊNCIO, A. R. N. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana de açúcar. **Braz. arch. biol. Technol.**, v. 42, n. 2, p. 1-5, 1999.

VISSERS, Y. M. et al. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 60-70, 2010.

WANG, H. et al. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: a systematic review. **J. Neurogastroenterol. Motil.**, v. 22, n. 4, p. 589–605, 2016.

WANG, H.; NUTTAL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology**, v. 109, p. 525–530, 2016.

WELLS, J. M. et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 108, p. 4607–4614, 2011.

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

WILLADSEN, P. Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J. Immunol.** v. 143, p. 1346–1351, 1989.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367–387, 2004.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitol. Today**, v. 4, n. 7, p. 196–198, 1988.

XU, H. et al. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 434–442, 2009.

YBARRA, L. M. et al. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. p. 79–102.

YEOMAN, C. J.; WHITE, B. A. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 2, p. 469–486, 2014.

ANEXO I

Comitê de Ética no Uso de Animais
(CEUA - UniFOA)

PARECER Nº 010/16

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR E CARRAPATICIDA DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA”, registrada com o número de **Protocolo 010/16**, sob a responsabilidade de **Renato da Silva Teixeira** – que envolve a produção, manutenção, ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo **COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UniFOA)**, DO CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA / RJ - UniFOA, em reunião de **31/08/16**.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 15/09/2016	Término: 15/12/2016
Espécie / linhagem / raça	Bovinos / Holandesa.	
Nº de animais	30	
Peso / idade	Adultas	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Fazenda particular.	
Observação	Não há.	

Volta Redonda, 02 de Setembro de 2016.

Dimitri Ramos Alves
 Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais
 (CEUA-UniFOA)
 Prof. Dr. Dimitri Ramos Alves
 Coordenador do Comitê de Ética no
 Uso de Animais
 FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA
 CEUA - UniFOA

APÊNDICE A – Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	345	349	320	381	341	321	354	273	304	289
2	385	331	352	413	283	369	403	371	355	355
3	250	335	386	320	249	251	322	274	347	334
4	384	445	459	420	323	404	421	440	430	458
5	432	377	368	372	399	408	415	477	506	548
Grupo B										
1	354	325	342	354	295	324	306	463	413	371
2	400	440	382	393	278	461	373	406	361	321
3	518	572	290	436	348	451	418	516	517	518
4	352	383	444	422	345	311	366	427	356	371
5	283	348	334	286	252	306	334	348	325	353
Grupo C										
1	557	448	463	467	473	479	469	442	487	567
2	393	417	498	525	315	496	370	454	361	414
3	394	525	398	430	346	391	538	385	417	346
4	401	473	317	293	373	339	370	426	172	358
5	408	369	353	351	339	369	352	307	577	410
Grupo D										
1	410	433	391	477	287	380	446	395	399	385
2	339	316	307	306	238	303	313	367	318	316
3	430	399	403	364	360	421	410	398	429	509
4	321	276	281	348	295	291	312	538	372	331
5	543	495	414	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	468	514	460	404	315	422	469	429	485	684
2	397	352	466	333	299	372	326	445	-	-
3	392	431	396	411	296	378	418	424	483	545
4	381	333	334	406	281	295	316	304	320	287
5	370	344	368	392	270	335	376	484	304	376
Grupo F										
1	387	341	365	394	278	390	351	307	407	401
2	276	274	253	252	258	245	246	340	286	284
3	243	252	252	242	275	240	248	323	269	265
4	377	539	417	343	417	433	428	456	456	514
5	393	426	373	421	327	402	376	425	437	441

APÊNDICE B – Tempo de protrombina (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	27.16	24.25	23.18	25.53	26.59	27.72	27.31	29.63	30.47	25.93
2	27.65	26.07	21.34	26.68	24.91	28.65	29.91	27.12	29.88	30.66
3	29.44	27.44	29.25	34.88	30.47	33.12	33.78	31.69	30.37	30.15
4	23.41	28.54	27.16	26.97	25.50	26.68	27.51	25.65	29.85	26.85
5	23.03	25.19	23.97	25.66	21.59	25.63	22.56	23.41	28.06	23.81
Grupo B										
1	26.58	25.90	28.56	29.19	25.00	25.22	27.91	27.16	30.56	34.94
2	23.75	24.62	22.75	23.59	27.32	26.35	27.87	30.13	28.09	22.84
3	27.56	27.57	26.53	28.78	27.03	29.38	27.93	28.82	28.34	27.38
4	29.05	29.56	28.75	24.97	27.69	27.66	24.03	29.32	29.50	30.35
5	26.00	26.50	27.41	25.34	25.10	25.47	26.87	25.65	25.25	30.03
Grupo C										
1	24.65	25.94	22.34	23.66	27.81	21.91	28.00	26.96	28.04	30.00
2	26.68	24.97	27.81	26.62	25.97	29.35	27.91	24.31	29.34	30.69
3	27.35	24.79	28.57	28.00	28.25	30.01	30.38	24.78	28.46	28.34
4	23.66	23.75	23.06	26.59	26.40	27.79	27.57	27.94	27.78	28.72
5	25.48	28.56	28.12	28.44	27.19	25.94	25.66	27.40	28.38	28.81
Grupo D										
1	25.34	24.60	25.59	27.47	27.40	28.72	31.34	25.53	29.19	32.04
2	25.68	26.21	26.4	25.10	25.62	26.10	27.66	23.81	26.41	25.75
3	23.59	27.50	30.12	29.53	29.03	29.38	30.10	22.50	28.82	30.06
4	23.91	22.50	27.59	26.87	28.56	30.41	30.87	22.25	29.79	30.97
5	21.56	20.03	22.65	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	20.40	25.22	21.03	28.22	24.43	30.07	28.75	30.06	29.16	30.78
2	27.22	25.00	22.5	27.06	23.75	24.88	25.56	26.00	-	-
3	26.55	21.91	21.59	26.88	27.88	27.12	24.00	25.65	28.41	29.66
4	25.30	22.22	23.19	28.22	27.50	28.94	28.75	26.47	29.16	29.97
5	29.50	23.35	28.41	26.12	28.59	29.50	27.10	34.00	32.81	30.60
Grupo F										
1	26.50	26.44	26.15	24.93	25.54	28.78	24.47	27.12	31.25	29.43
2	24.84	23.34	25.66	28.69	28.16	27.10	25.81	28.53	30.88	32.72
3	26.50	25.21	25.54	27.34	26.87	28.87	26.94	26.34	25.25	28.34
4	28.50	27.56	29.97	28.59	29.25	28.25	24.66	27.81	29.56	31.41
5	24.50	28.89	29.31	28.81	28.22	29.91	23.84	23.94	28.85	26.41

APÊNDICE C – Tempo de tromboplastina paricial ativada (s) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	55	50	59	53	41	38	54	53	49	55
2	56	62	67	56	50	50	57	67	63	60
3	55	51	57	51	50	39	44	55	63	60
4	58	72	64	56	56	56	66	66	64	78
5	61	60	58	57	46	50	68	65	61	58
Grupo B										
1	61	71	63	54	42	44	70	52	56	64
2	62	82	66	60	46	80	69	56	62	64
3	59	60	62	55	38	65	67	56	73	65
4	52	65	56	53	63	56	61	54	73	79
5	59	61	55	43	31	40	52	41	49	68
Grupo C										
1	60	57	54	52	49	35	47	57	55	68
2	64	56	77	51	42	63	68	60	71	70
3	55	53	59	56	45	49	71	67	57	64
4	52	56	56	59	41	54	66	63	56	68
5	62	55	71	52	35	58	74	63	48	74
Grupo D										
1	65	73	65	69	72	69	63	62	72	63
2	51	60	61	61	56	49	52	59	64	63
3	64	66	67	63	40	55	64	66	53	75
4	74	65	65	56	68	56	66	54	53	70
5	62	73	56	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	60	65	71	52	54	51	66	56	56	50
2	59	57	57	51	60	44	70	54	-	-
3	64	77	70	50	69	34	60	56	64	53
4	55	67	59	65	66	54	73	43	70	65
5	60	57	61	52	59	52	69	54	71	74
Grupo F										
1	70	69	63	70	78	69	75	65	77	66
2	69	63	59	56	58	62	71	63	74	55
3	60	55	50	51	47	47	60	58	61	62
4	61	70	71	65	56	40	43	56	66	63
5	67	67	69	64	56	53	62	62	70	63

APÊNDICE D – contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	5.75	5.59	5.46	5.33	5.56	5.50	5.75	5.05	4.90	5.50
2	6.51	5.91	5.67	5.73	5.53	5.56	5.94	5.11	5.10	5.36
3	5.60	5.12	5.40	5.30	5.86	5.94	5.11	5.91	5.90	5.72
4	5.69	5.30	5.25	4.80	5.03	4.96	5.28	4.78	4.86	5.43
5	6.22	5.73	5.81	5.19	5.35	5.30	6.00	5.53	5.69	5.45
Grupo B										
1	6.63	6.72	6.57	6.60	6.70	6.39	6.71	5.73	6.24	6.57
2	5.73	5.82	5.87	5.86	5.53	5.92	5.89	5.08	5.36	5.55
3	5.83	5.39	5.18	5.13	5.16	4.97	5.07	4.68	4.89	5.27
4	6.32	6.11	5.99	5.85	5.66	6.10	6.24	5.51	4.80	5.54
5	6.14	6.16	6.43	6.32	6.19	6.35	6.39	5.79	4.80	5.49
Grupo C										
1	5.25	4.96	5.15	5.04	4.62	4.84	5.08	5.15	4.78	5.28
2	4.77	4.68	5.07	5.05	4.85	4.18	4.54	4.85	4.91	5.02
3	6.06	5.24	5.79	5.14	5.26	5.95	5.93	4.79	5.14	5.13
4	6.72	6.47	6.04	5.34	5.71	6.30	6.46	5.65	5.70	5.52
5	5.88	5.52	5.53	5.29	5.37	5.52	5.58	5.12	5.30	5.20
Grupo D										
1	6.37	6.31	6.11	5.99	6.12	6.24	6.67	5.99	5.65	5.32
2	6.47	6.44	6.46	6.14	5.91	6.72	6.50	5.91	5.70	6.10
3	6.39	6.44	6.18	5.99	5.59	5.65	5.96	5.33	5.24	5.74
4	7.03	7.06	7.12	6.47	6.60	6.54	6.82	5.39	5.58	5.83
5	5.28	5.16	5.41	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	5.93	5.61	6.12	4.98	4.96	5.18	5.14	5.05	5.06	5.93
2	6.53	6.26	6.73	6.52	6.54	6.46	6.91	6.05	-	-
3	5.64	5.47	5.56	5.25	5.06	5.73	5.92	5.44	5.25	6.01
4	6.60	5.86	5.98	5.80	5.80	5.48	6.27	5.19	5.09	5.63
5	5.92	6.02	6.60	6.19	5.47	6.14	6.60	5.53	5.35	5.84
Grupo F										
1	5.20	4.97	4.96	4.86	4.66	4.99	5.32	4.73	5.07	5.10
2	6.46	5.98	6.45	6.57	5.98	6.54	6.55	5.80	6.58	5.92
3	5.89	5.89	6.01	5.74	5.48	5.74	5.98	5.40	4.89	5.74
4	6.26	5.84	6.19	5.50	5.97	6.49	6.33	6.10	5.26	6.29
5	6.48	5.80	5.91	5.82	5.74	6.05	6.40	6.00	5.91	5.46

APÊNDICE E – Concentração de hemoglobina (g/dL) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	9.58	9.27	8.94	8.88	9.31	8.90	9.01	9.06	8.61	9.20
2	9.85	8.82	9.20	8.72	8.46	8.29	8.53	8.61	8.84	8.31
3	9.01	9.77	8.68	8.43	8.40	8.07	8.15	8.21	8.09	8.43
4	9.42	8.71	9.46	8.10	8.69	8.21	8.59	8.26	9.20	9.40
5	9.34	8.72	8.57	9.03	8.21	8.09	8.74	8.60	8.19	8.57
Grupo B										
1	10.20	10.40	9.73	10.20	10.50	9.36	10.00	9.31	9.11	10.10
2	9.47	9.54	9.15	9.20	9.01	9.23	8.97	8.53	7.65	9.06
3	9.49	9.10	8.46	8.69	8.50	7.92	7.89	8.02	8.40	7.98
4	9.80	9.56	9.25	9.43	9.08	9.52	9.41	8.92	8.47	9.09
5	10.10	10.20	10.20	10.50	9.78	9.84	9.87	9.91	8.75	8.67
Grupo C										
1	9.06	8.19	8.29	8.16	7.85	7.76	7.98	8.44	7.84	8.33
2	8.06	8.62	8.39	8.26	6.51	6.72	7.36	7.39	7.68	8.23
3	10.00	8.60	9.32	8.66	8.77	9.68	9.63	8.72	9.44	8.25
4	10.40	9.93	8.86	8.70	9.19	9.43	9.45	9.20	9.44	8.14
5	10.70	9.94	9.50	9.13	9.39	8.98	9.04	9.25	8.53	8.50
Grupo D										
1	9.70	9.64	8.71	8.81	9.26	9.31	10.00	8.67	9.65	8.72
2	10.50	10.50	9.87	10.20	9.40	10.20	9.51	9.81	9.68	9.50
3	10.30	10.30	9.31	9.35	8.50	8.20	8.67	8.76	8.87	9.35
4	9.58	9.76	9.44	8.60	9.23	8.83	9.06	8.32	8.97	8.35
5	8.94	8.77	9.55	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	9.44	9.09	9.40	8.02	8.09	8.30	7.91	8.87	8.71	8.99
2	9.35	9.11	9.42	9.42	9.57	8.91	9.40	9.26	-	-
3	9.44	9.11	9.09	9.07	8.89	9.71	9.89	9.89	10.50	10.70
4	10.60	9.63	9.67	9.77	9.78	8.99	9.98	9.23	9.19	9.27
5	8.32	8.71	9.26	8.97	8.07	8.70	9.11	8.59	8.33	7.96
Grupo F										
1	8.19	8.71	8.35	8.56	8.22	8.59	8.81	8.55	9.41	8.64
2	9.28	8.84	8.64	9.30	8.53	8.94	8.75	8.86	10.00	8.13
3	8.67	8.94	8.63	8.71	8.50	8.49	8.63	8.83	8.22	8.49
4	9.65	9.06	9.32	8.80	8.75	9.86	9.41	8.64	8.97	9.20
5	10.10	9.03	8.63	9.16	8.94	9.21	9.31	8.56	8.74	8.77

APÊNDICE F – Percentual de hematócrito dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	29.3	28.0	27.2	27.1	27.6	27.1	28.4	27.7	24.6	28.2
2	30.3	27.2	27.1	27.0	25.5	25.6	27.5	24.9	25.6	25.8
3	27.4	26.9	26.0	25.7	24.2	23.9	23.9	24.9	22.6	25.3
4	28.5	26.2	28.3	24.5	25.1	24.7	26.2	27.1	26.2	28.3
5	29.7	27.1	27.5	27.8	25.2	24.9	28.2	25.4	23.7	26.6
Grupo B										
1	31.8	31.5	30.8	30.3	32.1	29.6	31.1	27.3	26.4	31.4
2	28.5	28.4	28.2	27.7	27.1	28.0	27.7	24.0	21.9	27.6
3	30.3	27.6	26.2	25.5	26.3	24.5	24.8	24.1	24.8	24.8
4	30.9	29.4	28.7	27.5	26.6	28.6	29.2	27.2	24.3	27.4
5	31.0	30.5	31.4	30.4	29.8	30.5	30.5	27.9	24.6	26.5
Grupo C										
1	27.9	25.7	25.3	25.5	23.9	23.6	24.5	24.2	23.2	25.9
2	24.2	25.5	25.4	26.2	19.8	20.2	22.0	22.1	20.5	25.5
3	30.1	25.9	28.6	25.9	27.4	29.6	29.4	24.7	27.2	25.5
4	31.7	30.0	28.0	25.5	28.5	29.7	30.1	28.0	27.2	25.1
5	32.2	29.5	29.1	26.6	28.6	28.0	28.0	27.9	24.2	27.1
Grupo D										
1	30.2	29.7	28.5	27.9	30.2	29.4	31.5	24.6	28.4	27.2
2	31.6	31.0	30.5	28.6	28.7	31.1	29.9	30.0	28.1	28.8
3	31.5	31.0	29.3	27.9	27.2	26.1	27.5	24.4	25.9	29.3
4	30.5	30.3	30.4	27.5	29.5	28.2	29.5	24.6	26.4	26.3
5	26.8	25.6	30.3	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	29.6	27.4	29.8	23.9	24.4	25.4	25.0	24.3	25.7	28.4
2	29.9	28.3	30.2	29.0	29.1	28.6	30.5	27.1	-	-
3	27.7	26.9	27.5	25.7	25.4	28.6	29.7	30.4	29.4	32.1
4	33.8	30.6	30.0	28.7	28.9	27.2	31.0	24.6	26.5	28.4
5	27.1	27.4	30.1	27.8	24.7	27.8	29.7	24.2	25.0	25.9
Grupo F										
1	26.6	26.5	25.4	24.5	23.8	25.3	26.8	25.1	27.3	26.1
2	29.4	27.1	28.8	28.8	26.3	28.5	28.4	27.4	30.6	26.5
3	27.4	27.3	27.8	26.3	25.4	26.6	27.6	25.0	23.8	26.6
4	30.1	27.5	29.2	25.9	28.5	30.6	29.5	26.4	25.7	29.4
5	30.6	27.0	27.6	26.8	26.8	28.3	30.0	26.8	25.0	26.9

APÊNDICE G – Leucometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	7.95	9.77	7.51	8.57	7.68	9.54	8.96	20.40	13.90	11.20
2	11.90	14.20	12.00	11.10	10.20	11.20	12.00	12.70	11.80	13.50
3	8.88	6.93	7.40	5.87	7.02	8.00	7.93	7.50	7.87	8.84
4	10.50	12.20	9.19	8.78	8.40	9.04	10.60	10.10	10.80	12.10
5	7.61	7.18	5.48	6.99	6.93	7.19	6.00	5.06	6.34	5.54
Grupo B										
1	4.32	6.03	5.35	4.36	6.51	4.63	3.79	4.48	5.56	4.52
2	9.03	10.90	10.90	7.69	6.67	10.30	9.78	9.85	8.78	13.90
3	3.68	8.15	7.46	6.70	5.57	5.36	2.70	10.20	4.04	7.75
4	7.09	10.40	9.63	6.26	5.31	9.25	7.16	9.46	8.17	9.56
5	11.50	12.30	12.20	10.50	9.32	14.00	12.20	14.00	13.80	7.47
Grupo C										
1	6.98	5.44	6.77	4.83	7.56	4.55	6.70	8.01	5.36	8.75
2	12.60	12.50	11.40	14.50	9.89	12.90	10.70	22.20	10.90	13.30
3	9.05	9.93	9.69	7.62	5.94	8.60	10.90	10.90	8.33	8.99
4	9.17	8.78	6.25	5.98	4.88	5.41	4.02	6.74	5.10	5.85
5	7.37	9.27	6.45	7.93	8.52	6.67	7.21	9.32	7.30	8.83
Grupo D										
1	5.17	5.91	6.09	4.80	5.55	4.89	5.65	5.29	5.98	6.66
2	10.50	10.91	11.50	11.20	10.92	12.70	9.29	11.60	11.50	11.90
3	10.80	14.10	10.20	9.70	8.70	9.10	8.55	10.90	7.78	9.98
4	7.86	9.16	9.07	7.32	8.53	8.60	7.28	9.99	9.10	7.79
5	10.20	10.91	9.02	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	8.84	5.69	7.20	5.36	5.27	7.03	6.66	7.74	7.86	9.21
2	6.32	6.25	7.12	5.80	6.16	5.98	6.02	7.28	-	-
3	12.10	13.30	13.00	10.80	15.90	10.90	13.10	15.10	10.30	10.20
4	10.40	8.78	9.99	8.34	7.23	8.94	8.25	10.90	8.71	9.30
5	9.92	10.20	10.70	9.00	8.78	9.16	8.77	9.68	8.58	9.91
Grupo F										
1	8.67	9.58	7.49	7.21	9.68	9.04	6.90	9.96	8.65	7.18
2	12.00	12.60	10.10	6.20	6.99	7.10	8.05	10.70	7.97	7.93
3	6.06	6.66	6.74	5.41	8.80	6.38	6.22	9.09	6.17	6.57
4	5.68	7.30	8.33	5.20	6.63	6.73	6.33	6.12	6.35	6.65
5	9.35	10.30	7.82	7.94	8.67	8.03	6.40	8.03	7.40	7.01

APÊNDICE H – Contagem diferencial dos leucócitos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupo	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
A	28	56	7	9	26	61	7	6	23	55	8	4	27	55	10	8	24	54	8	14
	31	55	8	6	30	55	6	9	30	59	6	5	20	71	4	5	24	70	2	4
	21	62	7	10	39	43	13	5	35	41	8	16	43	43	4	10	30	45	5	20
	30	55	7	8	34	53	6	7	27	55	10	8	32	48	10	10	19	64	2	15
	39	44	9	8	47	39	7	7	42	35	10	13	52	35	5	8	43	40	6	11
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	31	57	6	6	28	54	7	11	16	58	7	19	21	67	8	4	14	71	8	7
	25	60	5	10	24	61	6	9	36	46	10	8	23	58	7	12	28	57	6	9
	29	55	8	8	47	35	9	9	19	52	7	22	42	31	10	17	34	31	13	22
	17	55	6	22	25	53	6	16	33	57	0	10	27	45	8	20	33	48	5	14
	50	30	8	12	32	45	12	11	30	51	10	9	39	34	12	15	41	37	10	12
B	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	26	62	6	6	29	54	11	6	28	59	10	3	32	51	9	8	28	61	7	4
	57	28	7	8	36	48	5	11	43	44	3	10	42	44	6	8	35	41	6	18
	35	49	10	6	39	43	13	5	33	51	12	4	31	44	14	11	37	46	8	9
	38	39	9	14	31	43	5	21	36	46	5	13	31	56	4	9	28	54	6	12
	24	58	10	8	32	57	7	4	21	62	7	10	24	63	10	3	26	65	4	5
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	24	57	13	6	31	50	9	10	19	51	13	17	32	41	16	11	29	41	14	16
	48	38	3	11	49	31	5	15	43	45	0	12	48	33	7	12	17	68	5	10
	28	44	14	14	14	51	10	25	48	23	9	20	33	33	17	17	50	23	10	17
	28	58	2	12	30	38	6	26	24	42	0	34	34	33	7	26	43	32	9	16
	27	64	4	5	23	63	6	8	18	60	6	16	25	57	8	10	39	39	10	12
C	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	42	42	8	8	37	49	10	4	39	48	11	1	27	57	10	6	25	68	5	2
	28	60	5	7	17	67	9	7	33	60	5	2	38	46	14	2	37	51	10	2
	35	50	8	7	35	49	7	9	27	58	4	11	22	49	10	19	24	54	6	16
	60	32	4	3	60	25	9	6	48	35	7	10	32	49	7	11	42	41	6	11
	38	42	10	10	43	37	11	9	30	52	9	9	44	44	2	9	45	43	5	7
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	33	56	10	1	38	48	9	5	42	40	9	9	46	32	11	11	39	41	13	7
	33	60	4	3	25	64	5	6	11	81	4	4	25	63	4	8	30	55	7	8
	23	58	8	11	41	41	5	13	34	46	6	14	36	49	5	10	33	40	8	19
	38	46	8	8	53	25	12	10	55	28	9	8	51	26	13	8	51	29	12	8
	27	59	2	12	35	39	10	16	42	37	10	11	41	37	11	11	49	31	9	11

APÊNDICE H – Contagem diferencial dos leucócitos (%) dos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Grupo	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
D	37	42	11	10	24	58	12	6	35	56	5	4	24	60	5	37	51	9	3	37
	37	55	5	3	26	63	6	5	30	60	9	1	30	53	7	34	53	2	11	34
	37	44	10	9	40	40	6	14	22	60	11	7	38	47	5	19	58	3	20	19
	30	54	6	10	24	61	6	9	20	64	8	8	33	57	3	20	63	4	13	20
	41	30	6	23	33	49	9	9	28	59	4	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	18	63	3	16	34	51	7	8	23	49	13	15	30	54	6	10	31	50	10	9
	27	65	4	4	26	60	6	8	25	59	7	9	36	50	6	8	40	49	5	6
	22	57	7	14	29	45	9	17	27	54	0	19	31	48	7	14	31	45	11	13
	20	69	3	8	31	51	5	13	36	47	9	8	37	41	9	13	27	54	7	12
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grupo	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
E	40	41	7	12	33	41	16	10	32	52	7	9	41	39	10	10	28	49	7	16
	30	50	7	13	21	51	9	19	50	28	5	18	34	54	3	9	26	61	7	6
	15	71	6	8	12	75	5	8	13	72	6	6	10	82	3	5	26	59	7	8
	32	35	4	29	39	45	8	8	32	46	7	7	31	59	3	7	34	50	8	8
	29	60	7	4	26	61	6	7	18	67	10	10	21	65	9	4	25	69	5	1
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	38	49	4	9	38	42	8	12	38	38	11	13	56	25	9	10	53	24	12	11
	37	42	6	15	24	48	11	17	28	46	7	19	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	77	9	5	13	74	4	9	8	81	3	8	22	67	6	5	24	67	6	3
	22	61	7	10	41	38	7	14	43	42	5	10	46	36	9	9	49	25	7	19
	14	75	3	8	24	64	6	6	27	61	6	6	29	55	8	8	33	56	7	4

Grupo	Tempo Experimental (Dias)																			
	0				14				28				42				56			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
F	40	39	10	11	35	46	9	10	40	46	6	7	28	57	5	9	17	66	7	10
	24	56	7	13	25	57	6	12	19	68	6	7	13	77	5	5	30	62	5	3
	37	35	10	18	34	40	10	16	35	41	11	13	28	47	9	16	37	44	8	11
	22	49	12	17	14	73	4	9	33	49	11	7	22	55	9	14	39	50	4	7
	34	52	7	7	45	43	6	6	36	48	9	7	26	56	9	9	37	51	7	5
	70				84				98				126				154			
	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos	seg	lin	mon	eos
	31	57	5	7	37	47	4	12	49	35	9	7	53	31	6	10	48	35	10	7
	7	80	7	6	28	58	5	9	32	42	12	14	11	72	8	9	26	57	7	10
	40	41	7	12	29	37	15	19	27	44	9	20	27	42	14	17	35	40	12	13
	33	58	4	5	37	59	4	0	28	49	7	16	37	40	12	11	37	40	13	10
	28	61	6	5	28	49	5	18	13	78	4	5	38	41	11	10	39	43	8	10

APÊNDICE I – IgG sérico (mg/mL) nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	47.05	48.10	53.59	73.94	48.84	43.06	69.97	55.33	44.63	51.71
2	55.06	65.59	47.55	51.99	47.08	40.59	57.43	63.79	47.95	54.56
3	55.00	21.97	23.40	23.69	27.49	27.26	24.24	46.05	60.65	35.15
4	57.92	42.46	31.40	34.38	46.93	36.45	28.26	36.26	58.47	51.53
5	52.34	47.00	44.79	44.69	41.23	37.48	53.61	41.28	40.56	27.69
Grupo B										
1	30.59	38.04	56.00	48.77	44.88	29.65	20.73	27.65	41.13	47.58
2	47.49	86.51	47.49	70.97	87.63	85.45	98.51	88.50	78.42	63.61
3	66.23	51.56	66.23	75.33	91.30	81.61	53.15	55.00	49.72	58.45
4	55.20	41.19	55.20	81.02	71.51	66.74	62.77	67.13	63.17	72.74
5	52.08	43.09	52.08	51.62	68.52	61.42	62.88	53.61	53.42	54.16
Grupo C										
1	63.00	63.78	62.72	75.49	85.03	94.86	90.91	93.62	98.09	75.27
2	33.42	51.92	49.66	40.12	48.20	59.80	41.72	44.25	41.02	45.05
3	57.35	56.37	77.17	33.59	46.91	58.83	55.57	72.42	59.44	68.88
4	25.96	28.94	30.14	27.08	39.23	36.75	23.37	32.83	41.28	37.88
5	60.21	61.88	68.41	137.68	99.60	63.46	78.76	73.86	75.11	75.00
Grupo D										
1	50.79	82.84	79.30	82.82	96.16	75.81	61.67	67.90	74.30	77.92
2	72.52	53.79	60.11	74.24	139.72	77.23	63.57	53.65	63.84	55.53
3	42.61	59.40	45.39	68.94	74.50	58.20	31.13	30.01	27.11	32.83
4	50.93	40.86	54.05	59.42	64.56	89.58	68.93	73.36	77.50	67.31
5	79.02	64.41	80.50	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	60.27	47.44	50.86	66.22	65.02	44.36	38.48	86.34	80.96	95.40
2	74.43	60.48	61.76	70.05	75.47	90.55	55.25	89.06	-	-
3	57.83	52.30	56.17	62.73	78.38	95.25	55.65	83.31	81.14	30.74
4	58.54	50.08	53.55	43.62	69.89	62.66	58.15	51.83	50.23	74.95
5	42.55	62.70	77.95	71.31	57.72	63.25	65.00	38.07	42.81	73.62
Grupo F										
1	77.76	63.91	56.01	104.11	96.70	76.10	97.62	91.52	90.56	86.62
2	48.77	65.17	69.45	84.62	47.42	67.41	81.06	66.45	81.27	43.67
3	67.75	65.54	70.68	112.82	81.71	67.93	72.50	70.93	64.45	44.86
4	35.46	39.40	48.35	79.72	55.87	51.20	28.85	30.01	45.17	34.55
5	64.64	70.06	67.59	112.86	121.42	101.36	52.69	83.05	71.24	134.45

APÊNDICE J – IgM sérico (mg/mL) nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo A										
1	2.849	3.522	3.494	2.515	2.147	2.432	5.938	5.938	9.193	12.616
2	2.811	2.735	1.428	1.953	2.028	1.839	2.491	2.491	2.214	2.798
3	4.651	1.016	0.391	0.303	0.482	1.419	0.611	0.611	0.039	0.044
4	5.223	10.774	6.031	5.975	7.404	6.918	6.779	6.779	4.425	4.190
5	0.986	0.497	0.635	0.167	0.195	0.299	0.676	0.676	0.851	0.116
Grupo B										
1	1.500	2.103	3.004	1.799	1.464	1.819	1.455	0.606	0.114	0.220
2	3.258	3.382	3.313	3.070	5.206	4.538	6.124	6.275	6.428	0.151
3	2.926	2.710	2.491	2.468	3.030	2.515	3.637	2.480	2.673	6.332
4	4.700	3.753	2.887	3.244	2.305	2.661	3.056	1.829	1.661	1.357
5	3.812	2.926	4.346	3.608	3.424	4.473	3.724	0.251	0.159	5.223
Grupo C										
1	0.629	0.701	0.314	0.640	1.670	0.726	1.912	1.819	1.446	0.136
2	5.102	5.521	5.920	6.237	6.544	4.750	7.675	6.661	7.675	7.951
3	10.040	9.147	7.993	7.759	5.828	8.296	6.256	10.185	7.466	8.694
4	1.419	1.565	1.180	1.348	2.271	0.906	2.456	0.745	0.237	2.978
5	0.844	1.172	1.116	3.313	3.123	2.661	3.203	2.169	3.608	0.057
Grupo D										
1	5.504	2.773	1.860	3.753	3.452	2.527	3.424	2.503	4.252	5.828
2	6.390	5.611	10.306	4.346	5.240	5.792	5.737	7.038	6.622	6.237
3	1.839	1.188	0.935	1.031	3.354	3.313	4.268	3.961	1.279	0.921
4	5.938	7.508	4.899	6.181	6.602	5.792	4.849	5.920	6.978	5.883
5	1.116	0.701	1.464	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E										
1	4.750	2.563	8.739	5.310	5.575	3.150	3.709	3.522	2.588	2.397
2	0.356	0.088	0.240	0.108	0.230	0.606	0.572	0.949	-	-
3	4.799	3.203	1.719	1.943	2.563	4.236	4.899	2.248	2.432	2.480
4	8.101	7.425	4.299	3.946	4.866	6.525	6.143	4.521	4.457	5.000
5	5.051	4.950	7.529	8.538	7.179	8.450	8.874	6.525	3.782	4.570
Grupo F										
1	5.593	7.550	7.633	6.563	6.486	7.261	8.942	7.038	6.031	6.602
2	6.219	5.701	5.240	5.557	5.920	8.717	9.010	7.038	6.505	11.457
3	6.031	5.719	4.832	4.409	5.000	4.394	3.991	3.030	3.782	1.500
4	0.098	0.265	0.539	0.583	0.482	0.318	0.314	0.141	0.051	0.151
5	2.237	1.769	0.913	2.093	3.551	1.953	1.374	1.719	1.116	1.953

APÊNDICE K – IgG específica anti rGST-HI (D.O. 492 nm) sérico nos animais submetidos a diferentes tratamentos.

Animais	Tempo Experimental (Dias)									
	0	14	28	42	56	70	84	98	126	154
Grupo B										
1	0.323	0.506	0.816	1.275	1.633	1.263	0.666	0.648	0.573	0.513
2	0.224	0.262	0.758	0.967	1.498	1.170	0.619	0.586	0.555	0.534
3	0.303	0.673	0.948	1.526	1.672	1.196	0.749	0.705	0.607	0.601
4	0.283	0.494	0.765	1.228	1.507	1.010	0.553	0.473	0.571	0.596
5	0.294	0.534	0.936	1.292	1.665	1.106	0.577	0.605	0.687	0.607
Grupo D										
1	0.256	0.394	0.785	1.401	2.079	1.514	1.209	0.849	0.630	0.607
2	0.294	0.509	0.810	1.508	2.132	1.502	1.256	0.714	0.577	0.647
3	0.267	0.299	0.803	1.405	2.015	1.655	1.297	0.972	0.690	0.627
4	0.315	0.599	1.044	1.528	2.211	1.562	1.254	0.936	0.754	0.667
5	0.310	0.331	0.723	-	-	-	-	-	-	-
Grupo F										
1	0.142	0.532	0.959	2.207	1.532	1.555	1.258	0.958	0.544	0.494
2	0.239	0.592	0.979	2.115	1.600	1.424	1.155	1.055	0.798	0.649
3	0.382	0.523	0.988	2.181	1.574	1.601	1.128	0.828	0.828	0.657
4	0.230	0.598	0.833	2.031	1.654	1.502	1.020	0.812	0.700	0.602
5	0.299	0.521	0.918	2.132	1.661	1.538	1.240	0.923	0.770	0.655