

**CAROLINA CRUZ MURTA DE CASTRO**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE  
BOVINOS VACINADOS COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO SBbo23290  
NO CONTROLE DA BABESIOSE POR *Babesia bovis* (Babes,  
1888)**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para a obtenção do  
título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**CAROLINA CRUZ MURTA DE CASTRO**

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE  
BOVINOS VACINADOS COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO SBbo23290  
NO CONTROLE DA BABESIOSE POR *Babesia bovis* (Babes,  
1888)**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para a obtenção do  
título de “*Magister Scientiae*”.

**APROVADA:**

---

Prof<sup>a</sup> Marlene I. Vargas Vilória  
(Conselheira)

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof<sup>a</sup> Lygia M<sup>a</sup> Friche Passos

---

Prof. Carlos Luiz Massard

---

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo  
(Orientador)

À Deus, pela vida, por tudo que consegui até hoje, por todas as oportunidades e pela família maravilhosa que tenho.

Aos meus pais Antônio Eustáquio e Maria Helena - as razões da minha vida - pelo amor, carinho e incansável esforço e dedicação. Venci mais este obstáculo graças a vocês.

Aos meus irmãos Carla e Breno, pelo amor, apoio e amizade. Obrigada por existirem e por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

Ao Fabrício, pelo amor, carinho, atenção e ajuda nos momentos em que mais precisei. Obrigada por tudo!

Ào Prof. Dr. Alair Assis, cujo incentivo e ajuda foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me ajudar a ultrapassar mais esse obstáculo, por me iluminar e estar sempre presente em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo que tenho.

Aos meus pais e irmãos, cuja convivência foi essencial para minha formação como pessoa. Obrigada pelo amor, esforço, dedicação e suporte financeiro, sem os quais não seria possível realizar este sonho. Dedico essa vitória a vocês.

Ao Fabrício, pelo amor, incentivo, ajuda, e pelo ombro amigo sempre que precisei. Obrigada por ser tão presente em minha vida! Te amo!

À Cida, Osvaldo, Fabiana e Flávia, por serem minha família aqui em Viçosa. Obrigada por todo o carinho e ajuda durante este tempo. Adoro vocês!

Ao Prof. Dr. Alair Assis, meu ‘padrinho de mestrado’, por ter acreditado em mim e por ter me ajudado a chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e à Prof<sup>a</sup> Marlene Isabel Vargas Viloria, pela orientação, pela confiança e valiosa colaboração; pelo carinho e amizade durante todo esse tempo de convívio.

Ao Márcio Mendes, pela ajuda, indispensável acessoria técnica, e principalmente pela amizade. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, pelo acolhimento e suporte estrutural essenciais para a realização do meu mestrado.

À Universidade Metropolitana de Santos, pela minha formação acadêmica.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Universidade Federal de Ouro Preto pelo suporte estrutural essencial para a realização deste trabalho.

Aos Professores Luis Carlos Crocco Afonso e Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela colaboração e valiosas sugestões.

A todos que me ajudaram em BH e Ouro Preto: Simone, Daniella, Camila, Lívio; Eduardo, Roberta, Leonardo, Djalma, Tiago, Jamile, Elisângela, Wagner e Miriam. Muito obrigada!

Ao José Carlos e ao Cauzinho, pela colaboração e pelos cuidados com os animais utilizados neste experimento.

Às amigas Ana Paula, Fabiana, Carla e Bruna, pelo carinho e amizade, pelo ombro amigo, pela convivência agradável e pela ajuda indispensável durante todo esse período de alegrias e dificuldades. Muito obrigada!

Ao Carlos, por me ‘socorrer’ sempre que eu precisei. Obrigada pelos ‘quitutes’, pela convivência e pelo sorriso sempre amigo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários – LBCH: Larissa, Sidimar, Policarpo, Irma, Mariáurea, Ana Paula Adry, Liza, Ana Carolina, Flávia, Breno, Ferdinan, Priscilla, Rômulo, Javier, Diogo e Luana. Obrigada pelos momentos de alegria e amizade.

À minha amiga Claudinha pela orientação nos momentos de dificuldades e pelo convívio sempre agradável.

À Rose, pelo sorriso sempre amigo, e pela incansável ajuda e disposição no decorrer desses anos. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária da UFV que colaboraram de alguma forma para a conclusão deste projeto de tese.

A todos da Clínica de Grandes Animais, pela ajuda indispensável neste experimento. Obrigada!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho direta ou indiretamente, meu muito obrigada.

## **BIOGRAFIA**

CAROLINA CRUZ MURTA DE CASTRO, filha de Antônio Eustáquio Murta de Castro e Maria Helena da Cruz Murta de Castro, nascida em 07 de setembro de 1979, na cidade de Cataguases – Minas Gerais – Brasil.

Cursou o primeiro grau na Escola Municipal de Primeiro Grau “Barão do Rio Branco”, em Santos – SP, até o ano de 1993. Em 1994, iniciou o segundo grau no Colégio Santista. Deu continuidade aos seus estudos no Colégio Jean Piaget de 1995 a 1996, na cidade de Santos – SP.

Ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos em 1997, concluindo sua graduação no ano de 2001.

Foi estudante especial de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa de fevereiro a junho de 2003.

Iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2003.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Babesiose bovina	5
3.2 Biologia da <i>Babesia bovis</i>	7
3.3 Patofisiologia da <i>Babesia bovis</i>	9
3.4 Mecanismo de imunidade à <i>Babesia bovis</i>	11
3.4.1 Células natural killer e macrófagos	12
3.4.2 Células T	13
3.4.3 Células B	18
3.4.4 Resposta dos tecidos linfóides	19
3.4.5 Recirculação de linfócitos	22
3.5 Métodos de controle da babesiose	24
3.5.1 Premunicação	25
3.5.2 Vacinação	26
3.5.3 Controle com Exoantígenos	27
3.5.4 Proteínas Associadas às Roptrias	28
3.5.5 Peptídeos Sintéticos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Local de realização do experimento	31
4.2 Animais	31
4.3 Peptídeo Sintético	32
4.4 Esquema de inoculação	32
4.5 Infecção (Desafio)	33
4.6 Imunofenotipagem de Linfócitos Periféricos Bovinos (PBL)	33
4.7 Histologia de linfonodos bovinos	36
4.8 Hematoxilina & Eosina	37
4.9 Verde Metil Pironina	37
4.10 Pesquisa de antígenos de <i>B. bovis</i> em linfonodos bovinos através da técnica de Peroxidase anti-peroxidase (PAP)	38
4.11 Análise estatística	39



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Avaliação histopatológica de linfonodos bovinos	40
5.2 Avaliação imunohistoquímica de linfonodos bovinos	46
5.3 Imunofenotipagem de linfócitos T CD4, CD8 e WC1 e B CD21	49
5.3.1 Linfócitos periféricos T CD4 <sup>+</sup>	49
5.3.2 Linfócitos periféricos T CD8 <sup>+</sup>	52
5.3.3 Linfócitos periféricos B CD21 <sup>+</sup>	56
5.3.4 Linfócitos periféricos T WC1 <sup>+</sup>	59
5.3.5 Linfócitos T totais	62
5.3.6 Células não T não B (NTNB)	63
5.3.7 Relação entre linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>	65
5.3.8 Relação entre linfócitos T e B	67
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células Apresentadoras de Antígeno
<b>BIOAGRO</b>	<b><i>Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária</i></b>
<b>CD</b>	<b><i>Grupo de diferenciação antigênico</i></b>
CF	Citometria de Fluxo
CGs	Centros Germinais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DVT	Departamento de Veterinária
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
<i>g</i>	gravidade
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon Gamma
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida
<b>LBCHV</b>	<b><i>Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores</i></b>
MAP	Peptídeo Múltiplo Antigênico
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NK	Células exterminadoras naturais
mL	Microlitros
NO	Óxido Nítrico
NTNB	Não T não B
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PBL	Leucócito Periférico Bovino
PBMC	Células Mononucleares Periféricas Bovinas
PBS	Phosphate Buffer Solution
q.s.p.	quantidade suficiente para
RAP	Proteínas Associadas às Roptrias
RNA	Ácido ribonucléico
SBbo23290	<i>Sinthetic Babesia bovis</i> 23290
SFB	Soro Fetal Bovino
T <sub>c</sub> CD4 <sup>+</sup>	Células T CD4 <sup>+</sup> citotóxicas
T $\gamma\delta$	Linfócito T gamma delta
Th 1	Resposta imune tipo 1

Th2	Resposta imune tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI	Unidades Internacionais
WC1	'Workshop Cluster 1'

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Linfonodos bovinos dos grupos controle, saponina e imunizados com o peptídeo sintético SBbo23290. <b>A:</b> Animal controle aos cinco dias após a primeira inoculação, coloração H&E, 20X. <b>B:</b> Animal controle aos cinco dias após primeira inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 20X. <b>C:</b> Animal do grupo saponina aos cinco dias após a primeira imunização com formação de CG, coloração H&E, 20X. <b>D:</b> Animal do grupo peptídeo aos cinco dias após a primeira imunização com maior formação de CGs em relação aos demais grupos, coloração H&E, 10X.	43
<b>Figura 2:</b>	Linfonodos bovinos dos grupos controle, saponina e imunizados com o peptídeo sintético SBbo23290. <b>A:</b> Animal do grupo saponina aos quatro dias após a segunda inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 10X. <b>B:</b> Animal do grupo peptídeo aos cinco dias após a primeira inoculação Verde Metil Pironina, 10X. <b>C:</b> Animal do grupo peptídeo aos quatro dias após a segunda inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 10X. <b>D:</b> Animal do grupo peptídeo aos cinco dias após a primeira inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 40X.	44
<b>Figura 3:</b>	Resultado do teste Peroxidase anti-peroxidase para detecção de antígenos. Linfonodo pré-escapular. Observa-se célula dendrítica folicular (seta) contendo peptídeo sintético SBbo23290 e apresentando a linfócitos aos três dias após a terceira inoculação, PAP, 100X.	48
<b>Figura 4:</b>	Representação gráfica da Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , WC1 <sup>+</sup> , e B CD21 <sup>+</sup>	50
<b>Figura 5:</b>	Porcentagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	51
<b>Figura 6:</b>	Porcentagem de linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	53

<b>Figura 7:</b>	Porcentagem de linfócitos B CD21 <sup>+</sup>	57
<b>Figura 8:</b>	Porcentagem de linfócitos T WC1 <sup>+</sup>	60
<b>Figura 9:</b>	Porcentagem de linfócitos T totais	62
<b>Figura 10:</b>	Porcentagem de células NTNB	64
<b>Figura 11:</b>	Relação entre os linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>	66
<b>Figura 12:</b>	Relação entre os linfócitos T e B	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Esquema de inoculação	33
<b>Tabela 2:</b>	Dias referentes às coletas de PBL	34
<b>Tabela 3:</b>	Anticorpos monoclonais utilizados	35
<b>Tabela 4:</b>	Dias referentes às coletas de linfonodos	37
<b>Tabela 5:</b>	Médias das porcentagens de linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	52
<b>Tabela 6:</b>	Médias das porcentagens de linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	56
<b>Tabela 7:</b>	Médias das porcentagens de linfócitos B CD21 <sup>+</sup>	58
<b>Tabela 8:</b>	Médias das porcentagens de linfócitos T WC1 <sup>+</sup>	61
<b>Tabela 9:</b>	Médias das porcentagens dos linfócitos T totais	63
<b>Tabela 10:</b>	Médias das porcentagens de células NTNB	65
<b>Tabela 11:</b>	Relação entre as médias das porcentagens de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup>	67
<b>Tabela 12:</b>	Relação entre as médias das porcentagens de linfócitos T e B	69
<b>Tabela 13:</b>	Impacto diferencial entre as coletas de PBL	70

## RESUMO

CASTRO, Carolina Cruz Murta de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2005. **Estudo experimental da resposta imune celular de bovinos vacinados com o peptídeo sintético sbbo23290 no controle da babesiose por *Babesia bovis* (Babes, 1888).** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo.

Bovinos da raça holandesa entre 3-4 meses de idade receberam quatro imunizações subcutâneas com o peptídeo sintético SBbo23290 anti-*Babesia bovis* mais saponina, e foram desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*, sendo avaliados quanto ao desenvolvimento da resposta imune celular. Para isso, foi determinado o perfil de linfócitos circulantes (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup>) por citometria de fluxo e seguimento dos eventos microscópicos ocorridos em linfonodos através de técnicas diferenciais (Hematoxilina & Eosina e Verde Metil Pironina) e de imunohistoquímica (Peroxidase anti-peroxidase). Os estudos histológicos mostraram reatividade evidente de centros germinativos a partir do quinto dia após a primeira imunização. A hiperplasia dos cordões medulares foi mais evidente aos três dias após a terceira imunização. O antígeno SBbo23290 foi detectado em células SBbo23290 positivas durante todo o experimento, concomitantemente às alterações histológicas em órgãos linfóides. Quando foi determinada a composição fenotípica dos linfócitos de sangue periférico circulantes, observou-se no grupo peptídeo um aumento progressivo de linfócitos WC1<sup>+</sup> até os sete dias após a segunda coleta, que decaiu ligeiramente após a

terceira inoculação, aumentando novamente após o desafio com a amostra virulenta de *B. bovis*, o que não aconteceu com os demais grupos experimentais, havendo diferença estatística entre os grupos. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD21<sup>+</sup> decresceram após a primeira inoculação, aumentando após a segunda inoculação, e decaindo nas demais coletas, havendo diferença estatística entre os grupos. A porcentagem de linfócitos T totais no grupo peptídeo foi superior aos demais grupos durante quase todo o experimento, sendo que a maior porcentagem foi obtida após a segunda coleta, não havendo diferença estatística entre os grupos nas diferentes coletas. Sendo assim, pode-se concluir que o peptídeo sintético induz de maneira eficaz uma resposta imunológica antígeno-específica, na qual encontram-se envolvidos mecanismos celulares e humorais.

## ABSTRACT

CASTRO, Carolina Cruz Murta de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, November, 2005. **Experimental study of cellular immune response of bovines immunized with synthetic peptide sbbo23290 to the control of *Babesia bovis*'s (babes, 1888) babesiosis.** Advisor: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

Tree-four month old bovines of the Holstein Freesan breed received four under-skin immunization of the synthetic peptide 23290 anti-*Babesia bovis* plus saponina. They were challenged with an virulent sample of *B. bovis* and they were evaluated considering the development of the cellular immune answer through identification of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, and WC1<sup>+</sup> T lymphocytes by flow citometry and microscopic evaluation of lymph nodes using the techniques H&E and Pironin Methil Green, such as PAP. The lymphonodes analysis demonstrated germinal centers reactivity at the 5<sup>th</sup> day after the first immunization. Medullars cords hyperplasia was more evident three days after the third immunization. SBbo32290 antigen was detected in SBbo23290 positive cells during whole experiment, and simultaneous to the histology alterations in lymphonodes. Evaluating phenotypic composition of the peripheral blood lymphocytes, a progressive increase of WC1<sup>+</sup> lymphocytes was detected, which decreased after third immunization, and an increment was observed again after the challenge. It was not observed in the another experimental groups. The CD4<sup>+</sup> and CD21<sup>+</sup> lymphocytes decreased after



first immunization, increased after the second immunization, and decreased again in the following immunizations; the variation was statistically significant between the groups. The variation in total number of lymphocytes wasn't statistically significant, although an increment of this cells was observed in the peptide group almost whole experiment, comparing with the another groups. We can conclude that the syntetic peptideo induct an effective immunological specific-antigen answer, in with cellular and humoral mechanisms were involved.

## 1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, existem aproximadamente 160 milhões de bovinos, dos quais 80% estão expostos ao parasitismo pelo carrapato comum dos bovinos, o *Boophilus microplus*, e às doenças por ele transmitidas.

A *Babesia bovis*, transmitida pelo carrapato *Boophilus microplus*, é um parasita apicomplexo dos bovinos transmitido por carrapatos, e junto com a *Babesia divergens* e a *Babesia bigemina*, é responsável pelas maiores perdas na indústria dos bovinos em todo o mundo (FASILA, 2004), pois uma vez com babesiose, os bovinos sofrem uma grave anemia hemolítica, gerando perdas na produtividade e morte dos animais (BOMFIM *et.al.*, 2004).

A babesiose é uma doença causada pela infecção intra-eritrocitária de protozoários do gênero *Babesia* (CARLTON E MCGAVIN, 1998), sendo considerada uma das doenças mais importantes que afeta o gado em regiões tropicais e subtropicais do mundo (LEVY *et. al.*, 1982), além disso, vem ganhando crescente interesse como uma zoonose emergente em humanos (HOMER *et. al.*, 2000). No Brasil, a babesiose foi relatada em bovinos pela primeira vez por Fajardo em 1901 (SILVA, 1981).

Aproximadamente 300 milhões de cabeças de gado nas regiões tropical e subtropical do mundo estão sob o risco de infecção com *Babesia bovis* e *B. bigemina*, (WRIGHT, 1991).

A babesiose bovina, especialmente a que é causada pela *B. bovis*, continua sendo a de maior importância patológica e econômica no mercado agropecuário do Brasil.

Na América Latina, a babesiose causa prejuízos de mais de US\$ 1.365 milhões por ano (MONTENEGRO-JAMES, 1992).

Casos clínicos de babesiose ocorrem quando, por diversas razões, a barreira da estabilidade enzoótica é quebrada (ZINTL *et. al.*, 2005).

Existe uma grande variedade de sinais clínicos da babesiose, que se deve a variações na patogenicidade dos microorganismos e na susceptibilidade dos animais (CARLTON E MCGAVIN, 1998).

De acordo com BROWN E PALMER (1999), os bovinos acometidos por *Babesia bovis* podem desenvolver uma babesiose severa, que ocorre quando eritrócitos parasitados são seqüestrados dos capilares do cérebro e pulmões, resultando numa baixa parasitemia periférica, babesiose cerebral e Síndrome Respiratória associada a uma infiltração massiva de neutrófilos dentro dos capilares dos pulmões, permeabilidade e edema vascular.

O controle da babesiose bovina pode ser realizado tanto pelo combate direto ou imunidade protetora contra seu vetor, o carrapato *Boophilus microplus*, como através da estimulação imunológica contra o hematozoário.

No entanto, as limitações da quimioterapia têm levado ao estudo vacinal e melhorado o entendimento da resposta imune a *Babesia* spp (ZINTL *et. al.*, 2005).

A vacinação constitui um método de imunização ativa com o intuito de estimular os mecanismos de defesa de um hospedeiro, de forma a proteger o animal de futuras infecções ou de manifestações clínicas, além de ativar células de memórias.

A imunidade contra a *Babesia* spp requer não apenas a resposta imune inata, mas também a adaptativa. Esta tem sido induzida após a inoculação com antígenos, atenuados, ou sintéticos, assim como por sobrenadantes de cultura do parasito que contem antígenos solúveis.

Devido às limitações das vacinas que empregam parasitos vivos, novas fontes de imunógenos têm sido pesquisadas e as vacinas constituídas por parasitos mortos, as

confeccionadas a partir de extratos de parasitos ou sobrenadante de cultura, e as vacinas sintéticas e recombinantes têm sido consideradas as mais promissoras (BITTAR, 2002).

As proteínas produzidas em organelas do complexo apical têm grande importância no processo de invasão do parasita na célula hospedeira (BROWN *et al.*, 1996). Sabendo disso, foram realizados diversos estudos que puderam comprovar que a família multigênica que codifica proteínas de 58-60kDa, denominadas RAP, que estão associadas tanto à superfície dos merozoítos quanto às roptrias do complexo apical de *B. bovis* e *B. bigemina*, têm capacidade de estimular a resposta imune adaptativa dos tipos humoral e celular.

Tendo em vista a importância da proteína RAP-1, o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (LBCH) da Universidade Federal de Viçosa, associado ao FIDIC – “Fundación Instituto de Immunologia de Colombia” desenharam e sintetizaram peptídeos sintéticos baseados na estrutura íntegra dessa proteína (PATARROYO *et al.*, 1999).

A utilização de vacinas se destaca como uma tecnologia promissora alternativa ao método de controle tradicional, premunicação, devido ao fato de apresentar memória imunológica, eficiência e segurança.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar e mensurar a resposta imune celular e a proteção conferida "ex vivo" a bovinos (*Bos taurus taurus*) pela "vacinação" com o imunógeno sintético SBbo23290 e desafio com cepa virulenta de *B. bovis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a dinâmica das alterações microscópicas dos folículos linfóides e centros germinais de linfonodos periféricos dos animais imunizados e desafiados;
- Analisar a resposta ao SBbo23290 em PBL do sangue de animais submetidos à imunização e ao desafio;
- Identificar cronologicamente o desenvolvimento da resposta imune em linfonodos de bovinos imunizados com o peptídeo SBbo23290 e desafiados com cepa patogênica;
- Identificar a presença de antígeno em linfonodos de animais imunizados e desafiados.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 – Babesiose bovina

As infecções por parasitas do gênero *Babesia* provavelmente têm complicado a vida dos humanos desde a antiguidade, primeiramente através das infecções dos animais domésticos, mas só recentemente, na metade deste século, essas infecções se tornaram uma ameaça documentada à saúde humana, adquirindo o título de uma zoonose emergente (HOMER *et. al.*, 2000).

De acordo com o referido autor, a praga do gado egípcio é descrita como ‘Grievous Murrain’, pode ter sido a ‘Febre da Água Vermelha dos Bovinos’ (causada pela *Babesia bovis*) e pode ter incluído a hematúria como sinal prevalente.

A babesiose bovina é causada por várias espécies de *Babesia*, entretanto, no Brasil os bovinos são acometidos por duas espécies: *B. bovis* (BABES, 1888), que causa maiores prejuízos no Brasil devido à severidade da doença (FREITAS, 2001), e *B. bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893), sendo que ambas, em condições naturais, são transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887).

A distribuição de todas as espécies diferentes de *Babesia* se dá de acordo com a distribuição geográfica dos carrapatos, que são os vetores que a transmitem (GAFFAR, 2004).

Segundo BUSHELL *et al.* (1991), a babesiose tem ampla distribuição geográfica, que corresponde à área de existência do seu vetor biológico – carrapato, *Boophilus microplus*, a qual se estende entre as latitudes 32° Sul e 40° Norte da linha do Equador, constituindo um problema para os países tropicais e subtropicais como o Brasil.

No Brasil, a babesiose foi descrita primeira vez por Fajardo em 1901 (SILVA, 1981). Das duas espécies *B. bovis* e *B. bigemina*, a *B. bovis* é considerada a mais virulenta (ZAUGG, 1993).

A dinâmica da infecção por *Babesia spp* é dependente de fatores como população de carrapatos infestantes, capacidade de transmissão do carrapato, susceptibilidade dos bovinos, a qual varia com a raça, idade, sexo, estado fisiológico e imunitário (SOARES *et. al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000).

A babesiose é considerada um dos maiores impedimentos de uma produção eficiente em criações nos países menos desenvolvidos, que estão localizados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (RAMÍREZ-CRUZ *et.al.*, 1997; ALARCÓN *et.al.*, 2003), visto que nessas regiões o programa de controle do carrapato é aparentemente impossível de ser mantido devido a alguns fatores climáticos e geográficos.

A *Babesia bovis*, de acordo com McCOSKER (1981), causa perdas econômicas devido aos efeitos diretos da doença, como mortalidade dos animais, queda da produção dos animais doentes, e gastos com medicamentos para tratamentos, e aos efeitos indiretos, como elevados custos de medidas profiláticas e de controle da doença, e dificuldade de expansão de bacias leiteiras de alta produtividade devido à restrição ao fluxo de animais provenientes de áreas instáveis. A patogenicidade é variável de acordo com a cepa de *Babesia bovis*, mais na maioria dos casos, apresenta uma alta mortalidade nos animais não tratados (GAFFAR, 2004).

Em trabalho realizado por BOMFIM *et.al.* (2004), foi observado que bezerros gerados por fêmeas que passaram pela doença clínica durante a gestação, nasceram mais leves, confirmando a influência da infecção por *Babesia sp.* em vacas prenhes sobre o peso dos bezerros ao nascer.

No Brasil, os prejuízos totais na produtividade da bovinocultura, causados direta e indiretamente pelo *Boophilus microplus*, foram calculados na cifra de dois bilhões de

dólares anuais sendo quinhentos milhões devido às doenças transmitidas por estes (MADRUGA, 2003).

### **3.2 – Biologia da *Babesia bovis***

A *Babesia bovis* é classificada taxonomicamente no Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae e Gênero Babesia (LEVINE, 1973).

Embora sejam capazes de infectar uma ampla variedade de vertebrados, os parasitas do gênero *Babesia* requerem um vertebrado competente e um hospedeiro invertebrado para manter o ciclo transmissor (HOMER *et. al.*, 2000). A babesiose acomete mamíferos domésticos e silvestres; sabe-se que atualmente existem aproximadamente 73 espécies animais como possíveis hospedeiros (BARREIRA *et.al.*, 2004). Em 2000, HOMER afirmou existir mais de 100 espécies de *Babesia* identificadas.

Segundo GAFFAR (2004), após testes de invasão *in vitro*, foi observado que merozoítos da *Babesia bovis* são capazes de invadir e se desenvolver em células vermelhas de múltiplas espécies, em contraste com a especificidade de hospedeiros observada na natureza.

No hospedeiro vertebrado, após serem inoculados pelo vetor no momento da alimentação, os esporozoítos entram na corrente sanguínea e penetram nas hemácias, desenvolvendo-se rapidamente, originando os trofozoítos que evoluem para merozoítos. A saída do merozoíto rompe a célula infectada, embora possa permanecer intacta.

Um ciclo de divisão de *B. bovis* é de aproximadamente 8 horas; esse é um processo contínuo que depende fundamentalmente das condições imunológicas do hospedeiro (MAHONEY, 1975; RISTIC, 1988; MEHLHORN & SCHEIN, 1984). A invasão das hemácias pelo parasita é um processo ativo que envolve organelas do complexo apical como roptrias, grânulos densos e micronemas, além de corpos esféricos, conóide e anel polar (SAM-YELLOWE, 1996).



A fase sexuada do ciclo se dá quando o carrapato ao se alimentar, ingere os eritrócitos infectados com merozoítos, os quais irão se desenvolver no intestino do vetor. A partir do intestino do carrapato, via hemolinfa, estas formas sexuadas – gametas podem invadir os ovários, Tubos de Malpighi, e células musculares, onde irão evoluir para zigoto. No ovário, os oócitos infectados são responsáveis pela transmissão vertical da *Babesia*. Depois da postura, o zigoto infectado dá origem a um cineto móvel (uninucleado) que irá se multiplicar assexuadamente no núcleo do ovo e as células-filhas invadem o epitélio intestinal em desenvolvimento da larva, produzindo esporocinetos, que irão invadir as glândulas salivares, transformando-se em esporozóitos (RISTIC, 1988).

A transmissão da forma infectante (esporozoíto) ocorre até três dias após a fixação do carrapato no hospedeiro. No caso da *B. bovis*, a transmissão ocorre apenas na fase larval (MAHONEY, 1975). Tais larvas se tornam negativas para *B. bovis* após a transmissão, e a maior fonte de reinfecção pode ocorrer no final do período de ingurgitamento da fêmea adulta (KESSLER *et al.*, 2000). A transmissão em bovinos pode ser adquirida via transplacentária (raramente) (NEW *et al.*, 1997) ou iatrogenicamente, através de fômites contaminados (ZAUGG, 1993).

Em estudo realizado por OLIVEIRA-SEQUEIRA *et.al.* (2005), com o intuito de avaliar a frequência da infecção de fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* com *Babesia bovis* e *B. bigemina*, foi observado que a maioria das fêmeas ingurgitadas 60,8% não mostraram estar infectadas com *Babesia* spp., sendo que a frequência de infecção com *B. bovis* foi de 15,9%, e de *B. bigemina* foi de 17,6%. Em relação à porcentagem de ovos infectados, os autores supracitados observaram que as fêmeas ingurgitadas infectadas com *B. bovis* produziram 47,3% de ovos infectados, enquanto as fêmeas infectadas com *B. bigemina* produziram 76,6% de ovos infectados. Segundo KJEMTRUP & CONRAD (2000), a co-infecção da babesiose com outros agentes transmitidos por carrapatos têm confundido o entendimento dessas doenças. YOSHINARI *et.al.* (2003) demonstraram a existência de co-infecção entre o agente etiológico da denominada Doença de Lyme “like” e a *Babesia bovis* na população brasileira.

### 3.3 - Patofisiologia da Babesiose

A patogenia da babesiose, caracterizada por um envolvimento cerebral, tem sido comparada com a do *Plasmodium falciparum* em humanos. Essa descoberta permitiu inúmeros avanços no estudo da imunidade contra *Babesia bovis*, bem como dos mecanismos de proteção à mesma (NEVILS *et. al.*, 2000).

Clinicamente, na babesiose causada pela *B. bovis* os hospedeiros apresentam febre (40°-42°C), depressão, icterícia, anorexia, taquicardia, taquipnéia, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria – menos frequente (WRIGHT, 1981; ZINTL *et. al.*, 2005), sialorréia, depressão, distúrbios neurológicos e tremores mimetizando, muitas vezes, os sintomas de outras enfermidades, como a raiva dos bovinos, e intoxicações por plantas causadoras de doenças neurológicas (SOARES *et. al.*, 2000). Também foram reportados sinais como caquexia, e Síndrome do choque hipotensivo, acarretando um alto índice de mortalidade entre animais susceptíveis (FREITAS, 2001).

A anemia é causada pela destruição intravascular de eritrócitos, pela liberação de merozoítos após a reprodução intra-eritrocitária das babesias. Ademais, a fragilidade osmótica de toda a população eritrocitária aumenta terminalmente de tal modo que ocorre maciça lise, ainda que a parasitemia possa ser inferior a 1% (WRIGHT, 1981).

FRANSSEN *et.al.* (2003), avaliando a caracterização da invasão eritrocitária pela *Babesia bovis*, notaram que a invasão ocorre rapidamente (0,91% de parasitemia aos 15 minutos pós infecção), atingindo um pico de 2,20% após 60 minutos.

A morte pode ser causada por uma síndrome similar ao choque, associado à liberação de substâncias vasoativas e anóxia anêmica. Entretanto, a mortalidade é extremamente variável, dependendo da espécie de *Babesia* envolvida, da susceptibilidade do hospedeiro, dos fatores de manejo e de tensão ambiental (ZAUGG, 1993).

Lesões macro e microscópicas, causada por *B. bovis*, foram reportadas por PATARROYO *et.al.* (1982), tais como membranas mucosas pálidas e ictéricas, tecidos subcutâneos levemente amarelados, órgãos abdominais como os rins, congestos e com hemorragia subcapsular; vesícula urinária com urina vermelho escura e petéquias na

mucosa. Os pulmões também se mostraram congestos, levemente edemaciados com algumas áreas hemorrágicas. O endocárdio se mostrou com petéquias e hemorragias. No cérebro, foi observada uma distensão de moderada a marcada dos capilares por eritrócitos, bem como uma dilatação dos espaços perivasculares. O fígado mostrou uma evidente degeneração das células parenquimatosas, e os canalículos biliares distendidos com bile. No baço, foi verificada congestão e uma hiperplasia marcada das fibras reticulares; os centros germinais contendo poucas células; um grande número de macrófagos continha hemossiderina e congestão de capilares principalmente do cérebro, rins e coração.

Em outros países também se evidenciou congestão do baço, encéfalo, pulmões e músculos esqueléticos, demonstrando também a presença de icterícia, hemoglobinúria, hemorragias sub-epicárdicas e sub-endocárdicas; os rins se mostraram tumefeitos; a vesícula biliar estava distendida e com bile espessa; no cérebro havia congestão da substância cinzenta de todo o encéfalo CARLTON & MCGAVIN (1998).

Uma característica clínica da babesiose é a chamada ‘babesiose cerebral’, caracterizada por entupimento da microvasculatura cerebral com eritrócitos infectados e reações inflamatórias associadas (GAFFAR, 2004). Segundo ZAUGG (1993), a babesiose cerebral é caracterizada por hiperexcitabilidade, convulsões, opistótono, coma e morte, sendo os sintomas neurológicos, causados pela anóxia cerebral resultante da anemia grave e/ou bloqueio dos capilares cerebrais pelos eritrócitos. O dano causado pelo bloqueio dos capilares pode levar a uma condição conhecida como babesiose cerebral (VALEIRÓN, 1998).

Trabalhos realizados por CAETANO (2001), mostram que a adesão resulta da interação entre antígenos de *B. bovis* na superfície dos eritrócitos e receptores endoteliais complementares. Variações na composição de aminoácidos e estrutura dos antígenos podem alterar a afinidade de ligações com receptores expressos nas células endoteliais. Assim, mesmo que amostras diferentes de *B. bovis* sejam capazes de produzir a sensibilização de hemácias com antígenos, apenas haverá adesão se estes antígenos apresentarem afinidade pelos receptores endoteliais. HERNÁNDEZ (2002) demonstrou que o aumento da adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com uma

amostra patogênica de *B. bovis* (BbovUFV – 7ª passagem) é devido à maior expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais.

É importante relatar que NEVILS *et.al.* (2000), ao observarem que clones que cresceram vagarosamente *in vitro* se mostraram menos virulentos, puderam comprovar que existem subpopulações de *Babesia bovis* que apresentam graus variáveis de virulência.

### **3.4 – Mecanismos de Imunidade dos bovinos contra a *Babesia bovis***

A imunidade contra *Babesia spp* envolve os dois tipos de resposta imune, a inata e a adaptativa (BROWN & PALMER, 1999). As células do sistema imune inato são responsáveis por controlar a taxa de crescimento do parasita e em parte da parasitemia (HOMER *et. al.*, 2000). A imunidade inata, de acordo com GOFF *et. al.* (2001), pode ser suficiente na prevenção da doença severa em bezerros, em contraste com os animais adultos que foram sucumbidos ao mesmo desafio com *B. bovis*.

Segundo BROWN (2001), os eventos que ocorrem a partir do momento em que o parasito invade o hospedeiro vertebrado e entra em contato com a imunidade inata é que determinarão a magnitude da resposta imune específica. Os hospedeiros mamíferos a desenvolvem após um episódio de infecção natural, ou posterior a uma imunização profilática (HOMER *et al.*, 2000).

Ambos fatores, humoral e celular estão envolvidos na imunidade contra babesiose; o componente humoral do sistema imune é atualmente considerado de importância limitada na proteção contra infecções por parasitas do gênero *Babesia*, visto que estes podem subverter a resposta imune humoral e manipulá-la para sua vantagem (HOMER *et. al.*, 2000).

#### **3.4.1 – Células NK e Macrófagos**

AHMED (2002), afirma que existe uma crescente evidência de que a imunidade protetora aos carrapatos e às doenças transmitidas por eles depende da mobilização de ambas, imunidade inata e adaptativa.

Monócitos e macrófagos exercem um papel central nas respostas imunes como células apresentadoras de antígeno, células imuno-regulatórias e efectoras (GOFF *et. al.*, 2002).

Alguns linfócitos sangüíneos não demonstram propriedades nem de células T nem de células B (NTNB), constituindo uma terceira população distinta de linfócitos, encontrada em pequeno número no sangue e se distribuem largamente por todos os órgãos linfóides, são as chamadas células *natural killer* (NK), ou exterminadoras naturais, que originam a partir das mesmas células precursoras que as células T, mas não sofrem o processamento tímico (TYZARD, 1998).

Uma característica definida dos macrófagos e células NK é que eles são capazes de produzir mediadores solúveis em resposta a uma variedade de estímulos infecciosos inespecíficos (HOMER *et. al.*, 2000).

De acordo com JAMES (1988), especificamente células NK e macrófagos, estão envolvidas na atividade anti-babesias, pois na ausência destas, observa-se um aumento da parasitemia em curto período de tempo, sugerindo que os fatores imunes inatos podem estar envolvidos na destruição dos parasitas antecipadamente à produção de anticorpos. Na ausência de macrófagos e células NK, uma alta parasitemia se desenvolve em um curto período de tempo (HOMER *et. al.*, 2000).

De acordo com BITTAR (2002) os macrófagos e outras células como as NK e neutrófilos, produzem óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, que auxiliam no controle da parasitemia e na recuperação do animal na fase aguda da doença.

A produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de bovinos, estimulados *in vitro* com antígenos de membrana de *Babesia bovis* e com sobrenadante de cultura de células Th antígeno-específicas contendo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  endógenos, parecem sugerir que o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) em macrófagos pode ser indicativo do potencial babesicida do NO (STICH *et al.*, 1998). De acordo com GOFF

*et.al.* (2001), o óxido nítrico tem sido conhecido por seu poder babesicida *in vitro*, porém sua efetividade *in vivo* tem sido questionada devido à sua habilidade de diminuir a regulação da resposta imune do tipo I.

Todavia, a superprodução de NO, também, pode estar associada a mecanismos patogênicos da infecção, incluindo a babesiose cerebral, já que várias disfunções orgânicas, observadas durante a evolução da malária e da babesiose, podem ser mediadas pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (GRAU *et al.*, 1989).

No entanto, GOFF *et. al.* (2001) obtiveram resultados consistentes com a hipótese de que o óxido nítrico exerce um papel no controle da infecção por *B. bovis* em bezerros jovens no primeiro contato com o parasita, durante uma resposta imune inata no baço.

### 3.4.2 – Células T

As células T são os linfócitos predominantes no sangue (até 80% dos linfócitos do sangue periférico), que deixam o sangue por duas vias; as células T que não se encontraram com o antígeno anteriormente (células virgens) se conjugam com vênulas especializadas localizadas no paracórtex dos linfonodos (vênulas endoteliais altas), e as células T de memória deixam a corrente sangüínea através dos vasos sangüíneos convencionais nos tecidos e são depois transportadas para os linfonodos através da linfa aferente (TYZARD, 1998).

As células T exercem um papel crucial orquestrando as defesas do hospedeiro contra patógenos intra e extra-celulares (FLYNN *et. al.*, 1998).

De acordo com HOMER *et. al.* (2000), as células T são críticas na resistência à babesiose, e os mecanismos mediados por células T ocorrem no estágio de resolução, sendo que as células T também têm sido implicadas na proteção contra espécies letais de *Babesia*.

As células T CD4<sup>+</sup> desempenham uma variedade de funções auxiliares, necessárias para montar uma eficiente resposta imune adaptativa (APPAY, 2004). Visto que a *Babesia bovis* é um parasita intra-eritrocitário obrigatório, as células T CD4<sup>+</sup> representam a ligação entre os dois tipos de resposta, inata e adaptativa, uma vez que o

eritrócito não possui Complexo Maior de Histocompatibilidade - MHC (BROWN & PALMER, 1999).

As células bovinas positivas para CD4 usualmente representam entre 15 e 35% das células mononucleares do sangue periférico, dependendo da idade dos animais, enquanto no timo, CD4 é expresso em 60-80% dos timócitos, sendo que uma grande população dessas células (75-88% delas) também expressam CD8 (BENSAID & HADAM, 1991).

A morte intra-eritrocitária nos estágios de resolução requerem linfócitos T, especificamente a subpopulação de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (HOMER *et. al.*, 2000). No entanto, é importante salientar que apesar das células T CD4 serem consideradas unicamente auxiliares, novos subtipos e novas funções têm sido relacionadas às células T CD4<sup>+</sup>.

Foi reportado por APPAY (2004) a existência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos, que são células T<sub>c</sub> CD4<sup>+</sup> (células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>) altamente diferenciadas que já tiveram contato com antígeno, levadas a esse estágio através de uma ativação, no entanto, ainda não existe evidência que sugira que essas células T<sub>c</sub> CD4<sup>+</sup> são derivadas das células T CD8<sup>+</sup> ou pertencem a alguma família de células semelhantes a NK ou células T regulatórias.

Muitos estudos têm reportado a presença de células T<sub>c</sub>CD4<sup>+</sup> detectadas diretamente do sangue periférico, *in vivo*, em diversas patologias humanas. Indivíduos saudáveis mostraram possuir poucas dessas células (não mais de 2% de toda a população de células T CD4<sup>+</sup>), no entanto, essas células corresponderam a mais de 50% das células T CD4<sup>+</sup> em alguns portadores do vírus HIV, podendo claramente exibir potencial citotóxico.

Pode-se dizer que a resposta imune resultante da infecção por *Babesia* é consequência de um somatório de fatores e que o controle do padrão de resposta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> representa um ponto central no desenvolvimento de uma imunidade protetora (BITTAR, 2002).

As células T CD4<sup>+</sup> produzem IL-2, que também é essencial para a expansão clonal das células T CD8<sup>+</sup> (AHMED, 2002). Segundo COX (1997) e BROWN *et al.* (1998),

existem evidências de que muitas infecções são controladas por mecanismos humorais e celulares, sendo que a imunorregulação das infecções difere em relação aos tipos celulares envolvidos, às citocinas e mediadores secretados, bem como os seus efeitos supressores ou indutores sobre respostas imunes do tipo Th1 e Th2.

As células Th apresentam um papel duplo; suprem as citocinas necessárias para a maturação de isótipos de imunoglobulinas de alta afinidade, e produção e ativação de macrófagos (BROWN & PALMER, 1999).

Existem dois subgrupos distintos de células Th, que são diferenciados pelas citocinas que secretam: as células Th1, que secretam caracteristicamente interleucina 2 (IL-2), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), e a linfotóxina fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) dentro de poucas horas após o estímulo por um antígeno, e as células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 vários dias após a exposição a um antígeno (TYZARD, 1998).

Como suposto por ZINTL *et. al.* (2005), animais adultos e jovens responderiam com uma resposta imune Th1 à infecção primária com *Babesia bovis*, caracterizada pela produção de IL-12, bem como estimulação de citocinas pró-inflamatórias no baço.

A composição final da resposta das células Th ao antígeno, pode determinar se as respostas inflamatórias e auto-imunes serão favoráveis ou não (MURPHY & REINER, 2002).

GOFF *et. al.* (2001), após inocular eritrócitos infectados com *B. bovis* em bovinos jovens constatou que a resposta imune inata protetora de bezerros frente à babesiose possui atributos tipo I, com uma indução precoce de IL-12 esplênica e a expressão de RNAm IFN- $\gamma$  seguido por um período curto de expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS).

Na metade dos anos 80, caracterizaram-se células T humanas e murinas contendo TCR (receptor de células T) composto de heterodímeros  $\gamma/\delta$ , que levou a um grande interesse no papel das células T $\gamma\delta$  nas respostas imunes (POLLOCK & WELSH, 2002).

Cerca de 1 a 3% dos linfócitos do sangue periférico nos humanos e nos camundongos e até 60% nos ruminantes possuem TCRs que consistem em cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ ; essas células em humanos e nos camundongos possuem uma diversidade limitada, no



entanto, nos ruminantes essas células constituem uma alta proporção da população de células T e são capazes de se conjugar com uma larga variedade de antígenos, sugerindo que possuam uma importância funcional maior (TYZARD, 1998).

De acordo com FIKRI *et.al.* (2000), em bovinos, as células  $T\gamma\delta$  constituem uma população proeminente das células mononucleares periféricas bovinas (PBMC), atingindo mais de 20 – 30% em bovinos jovens. ROGERS *et.al.* (2005) constataram que embora as células  $T\gamma\delta$  WC1.1<sup>+</sup> tenham sido as células predominantemente expressas em bezerros jovens, devido ao declínio precoce e rápido deste tipo celular, as células  $T\gamma\delta$  WC1.2<sup>+</sup> demonstraram uma quantidade semelhante de 1 a 2 anos de idade, indicando que também possuem papel importante em animais adultos.

Os bovinos possuem subpopulações de células  $T\gamma\delta$  que diferem no fenótipo celular e podem ter diferentes distribuições teciduais, e um dos antígenos de diferenciação mais estudados das células  $T\gamma\delta$  bovinas é uma molécula de superfície de 215 kDa denominada ‘Workshop Cluster 1’ (WC1), que é expressa na maioria das células  $T\gamma\delta$  na circulação periférica (POLLOCK & WELSH, 2002). WC1 é uma glicoproteína transmembrânica, membro da família do Receptor Scavenger Rico em Cisteína (SRCR), sendo unicamente expressa nas células  $T\gamma\delta$ . Uma grande proporção, freqüentemente a maioria das células  $T\gamma\delta$  do sangue periférico em animais jovens expressam WC1, tendo sido identificada somente em ruminantes e suínos (ROGERS *et.al.*, 2005).

Duas populações de células  $T\gamma\delta$  têm sido identificadas no sangue periférico bovino; uma delas é descrita como WC1<sup>+</sup>/CD2<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, e a outra é WC1<sup>-</sup>/CD2<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, sendo que quando comparamos células  $T\gamma\delta$  WC1<sup>-</sup>/CD2<sup>+</sup>, uma ampla proporção de células  $T\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup>/CD2<sup>-</sup> são encontradas no sangue periférico, enquanto existe uma ampla proporção de células  $T\gamma\delta$  WC1<sup>-</sup>/CD2<sup>+</sup> no baço (VESOSKY *et.al.*, 2003).

Além das células  $T\gamma\delta$  possuírem duas populações distintas, existem também três isoformas de WC1, referidas como WC1.1, WC1.2 e WC1.3, que são expressas em células  $T\gamma\delta$ , sendo que WC1.1 e WC1.2 são expressas na maioria das populações de células  $T\gamma\delta$ , enquanto WC1.3 é expressa em uma pequena subpopulação de células  $T\gamma\delta$  com característica de WC1.1.

Análises da distribuição tecidual de duas populações de células T  $\gamma\delta$  por citometria de fluxo revelaram que a população WC1<sup>+</sup> estava presente em altas concentrações no sangue periférico (30-60% em animais jovens) e baixas nos órgãos linfóides secundários (5-10%) e que a população WC1<sup>-</sup> foi baixa no sangue periférico (3-5%) e alta no baço, glândula mamária, e epitélio mucoso do intestino (20-60%) (PARK *et al.*, 2000).

Estudos têm mostrado que as células T  $\gamma\delta$  são ativadas e proliferam através da exposição a organismos patogênicos e parasitas. A atividade reguladora e efetora das subpopulações das células T  $\gamma\delta$ , de acordo com as pesquisas realizadas por PARK *et al.* (2000), são moduladas através de mecanismos diretos e indiretos: reconhecimento de antígeno através dos TCRs; e ativação através das citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos e citocinas ‘crossregulatory’ produzidas por células T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ .

Nos ruminantes, segundo TYZARD (1998), as células T $\gamma\delta$  respondem predominantemente na reação linfocítica mista, sugerindo que possam reconhecer antígenos estranhos do MHC e que também possam ser citotóxicas. Além disso, essas células também podem ser exigidas para proporcionar uma resposta imune precoce mediada por células nos animais cujas Igs falhem em atravessar a placenta.

As células T $\gamma\delta$  possuem diversas funções, dentre elas a capacidade de secretar citocinas tanto do tipo 1 quanto do tipo 2, a capacidade citolítica, o efeito regulador sobre o sistema imune (HOWARD *et al.*, 1999), a capacidade de reconhecerem antígenos protéicos (WELSH *et al.*, 2002), apresentarem antígenos às células T CD4<sup>+</sup> e induzirem a sua proliferação (COLLINS *et al.*, 1998) e de participarem na maturação das células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002).

Estudos de infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos exauridos de células T $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> através de anticorpo monoclonal sugeriram que a presença dessas células está associada com o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida com polarização Th1, com isso, acredita-se no papel das células T $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> como uma ligação entre a imunidade inata e adquirida, o que é fundamental para uma resposta imune apropriada (POLLOCK & WELSH, 2002).

Quanto à localização, em estudos realizados por PARK *et.al.* (2000), foi observado que as células WC1<sup>-</sup> estavam abundantes na polpa vermelha do baço, enquanto as células WC1<sup>+</sup> estavam predominantemente presentes na região periarteriolar e zona marginal; enquanto no linfonodo, ambas populações de células estavam localizadas nos seios subcapsulares da região cortical e medular. Neste mesmo trabalho, notou-se que as células WC1<sup>+</sup> estavam muito distribuídas no timo, em pouco número no córtex, e em maior concentração na região medular, em grupos próximos aos corpúsculos de Hassall. Quanto à idade, enquanto o decréscimo na porcentagem no sangue no primeiro ano de vida foi notado ser decrescente para células Tγδ WC1.1<sup>+</sup>, o mesmo não aconteceu com as células WC1.2<sup>+</sup> (ROGERS *et.al.*, 2005).

### 3.4.3 – Células B

A proteção contra a infecção aguda de *Babesia* envolve macrófagos ativados (BROWN & PALMER, 1999), neutrófilos, células NK (COURT *et al.*, 2001), entre outros, no entanto, o controle da parasitemia durante a persistência da infecção ou após a infecção por *Babesia* envolve também anticorpos (BROWN & PALMER, 1999).

As células B atuam como células efectoras primariamente, através da expansão clonal antígeno-específica e diferenciação celular (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

FLYNN *et. al.* (1998) sugerem que as células B antígeno-ativadas promovem um mecanismo de diferenciação das células Th e seu recrutamento para folículos B, onde o centro germinal se desenvolve.

Respostas de células B reguladas por células Th fazem uso das células B foliculares como precursoras e dependem de padrões qualitativamente diferentes da formação da sinapse imune para regular o destino das células B (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

Células B antígeno-específicas possivelmente continuam a chegar no linfonodo por alguns dias após a imunização, e provavelmente fazem uma interação cognata com as células T ativadas no linfonodo drenante do sítio de imunização (TOELLNER *et. al.*, 1998).

Após a re-exposição à mesma proteína antigênica, células B de memória são estimuladas para se diferenciar rapidamente em células plasmáticas que secretam anticorpos de alta afinidade, com mudança de isótipo como células efectoras de longo prazo na imunidade adaptativa (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

Ainda, estes autores afirmam que células B de memória, geralmente expressam isótipo mudado e Igs de membrana maturadas por afinidade, e requer regulação da memória cognata de células Th para sua resposta a um antígeno já conhecido (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

### **3.4.4 – Resposta em Tecidos Linfóides**

O sistema linfóide é muito mais do que um acúmulo de órgãos linfóides como baço, timo, medula óssea, tecido linfóide associado ao intestino, e linfonodos; nos organismos vivos, existe uma troca dinâmica e uma reorganização das subpopulações de linfócitos entre esses órgãos linfóides, e até mesmo na maioria dos tecidos (HAY & ANDRADE, 1998).

A resistência inata à *B. bovis* parece depender de uma resposta precoce tipo I que é amplamente limitada aos órgãos linfóides, particularmente o baço. O baço é um grande órgão linfóide que possui células T, B, NK e macrófagos (HOMER *et. al.*, 2000), e seu papel central no controle da babesiose bovina em animais jovens é suportado pelo fato conhecido de que bezerros esplenectomizados são tão susceptíveis quanto bovinos adultos infectados pela primeira vez por *Babesia* (ZINTL *et. al.*, 2005).

Os linfonodos são os órgãos aonde a resposta imune inata conduz a uma imunidade adquirida; é onde alguns dos patógenos mais devastadores evadem a resposta imune, e linfócitos auto-reativos encontram pela primeira vez antígenos próprios tecido-específicos e são tolerados ou ativados. Os principais papéis dos linfonodos dependem da migração coordenada de seus constituintes celulares; os linfonodos possuem diversas funções importantes no sistema imune: recrutar grande número de linfócitos virgens do sangue; coletar antígenos e células dendríticas dos tecidos periféricos; suprir o ambiente

para tolerância antígeno-específica ou promover respostas efetoras primárias e secundárias; modular as características orientadoras das células T de memória, levando-as aos tecidos que contêm os antígenos cognatos; e promover o 'look out' para as células centrais de memória (VON ANDRIAN & MEMPEL, 2003).

Nos linfonodos estimulados por um antígeno, algumas das células dentro desses nódulos se expandem para formar estruturas características, conhecidas como centros germinais (CGs), onde as células B sofrem o processo de mutação somática, e onde ocorre a mudança de classe imunoglobulínica e a formação de células de memória (TYZARD, 1998).

A importância da formação do CG nas respostas a antígenos protéicos é descrita por LANE *et al.* (1994) ao demonstrar que camundongos carentes de CGs foram incapazes de produzir anticorpos de alta afinidade, ou segundo MATSUMOTO *et al.* (1996), embora produzam IgGs precisa-se de doses imunogênicas altas para gerar tal afinidade.

De fato, as únicas estruturas capacitadas para conferir a especificidade necessária para uma resposta imune bem sucedida são os CGs, uma vez que neles os genes variáveis Ig nas células B sofrem hipermutação somática e troca de isotipos ao se diferenciarem em centroblastos, que convertem-se em centrócitos não proliferativos (LIU *et al.*, 1992) que expressam Igs de membrana que ficam expostas aos complexos imunes nas FDC.

Duas regiões principais podem ser distinguidas histologicamente nos linfonodos - o córtex e a medula, sendo o córtex dividido em paracórtex (área das células T), e a área mais superficial das células B, que consiste de folículos primários e (após desafio antigênico), centros germinais. Os folículos das células B são os principais sítios das respostas humorais, enquanto a paracórtex é o sítio onde os linfócitos circulantes entram nos linfonodos, e onde as células T interagem com as células dendríticas. A medula é um 'labirinto' de seios drenantes que são separados pelos cordões medulares, que contêm muitas células plasmáticas e alguns macrófagos e células T de memória (VON ANDRIAN & MEMPEL, 2003).

A diferenciação de células B reguladas por linfócitos T começa com a ativação e migração de células dendríticas às zonas T dos linfonodos que drenam as áreas do tecido exposto ao antígeno protéico. A captação do antígeno, processamento e sua apresentação

dentro do contexto MHC II, permitem a interação da célula dendrítica ativada e a célula T auxiliar não marcada e o posterior início de uma sinapse imune, a qual gera a expansão de clones antígeno-específicos tanto de células T quanto B (GULBRANSON-JUDGE & MACLENNEN, 1996).

As células T são ativadas pela apresentação do antígeno apropriado, e subseqüentemente influenciam a proliferação, a troca de isótipo, a sobrevivência, e/ou a mutação somática das células B do centro germinal pelo contato e/ou produção de citocinas. No entanto, os requerimentos das células T para a formação do centro germinal são diferentes para a troca de isótipos e para secreção de Igs (SECORD *et. al.*, 1996).

As interações células B e T, desencadeiam uma reação no centro germinal, ocorrendo hipermutação somática, seleção antígeno-específica, preservando as células plasmáticas de alta afinidade com longevidade e células B de memória como células precursoras sensibilizadas por um antígeno já conhecido (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

Ainda, de acordo com SECORD *et. al.* (1996), a interação entre células T e B antígeno-específicas ativadas progride com a proliferação de células B; algumas se diferenciam prematuramente em plasmócitos nas zonas parafoliculares, com a conseqüente produção de anticorpos de vida curta não diversificados somaticamente, enquanto outras, junto com as células T CD4<sup>+</sup> são induzidas a migrarem aos folículos linfóides primários, estimulando a formação de centros germinais (CGs) antígeno-específicos altamente reativos. Segundo VON ANDRIAN & MEMPEL (2003), as células T são inicialmente ativadas na área de células T, especialmente no paracórtex superficial, enquanto as células B antígeno-específicas são dispersas através dos folículos de células B. Depois, as células T CD4<sup>+</sup> se localizam ao redor dos folículos, onde vão auxiliar as células B antígeno-específicas promovendo a formação de centros germinais.

Essas respostas T-dependentes induzem uma diferenciação de células plasmáticas de vida curta e o desenvolvimento do centro germinal com células plasmáticas maduras de vida longa e células B (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

A formação dos CGs freqüentemente é caracterizada pela estratificação de subpopulações linfocíticas em regiões proliferativas e não proliferativas bem conhecidas

como zonas escura e clara respectivamente (MACLENNAN, 1994; CAMACHO *et al.*, 1998). Em bovinos essa formação tem sido claramente observada e o tempo de aparecimento dos mesmos parece depender do imunógeno utilizado (FREITAS, 2000; RESENDE 2003).

### **3.4.5 – Recirculação de linfócitos**

A integração e o controle das respostas imunes sistêmicas dependem do tráfego regulado dos linfócitos (BUTCHER & PICKER, 1996). A migração dos linfócitos do sangue para dentro dos tecidos periféricos e linfóides é determinada por eventos complexos e combinados, envolvendo múltiplas moléculas que, juntas regulam o acesso tecidual de subtipos especializados de linfócitos (DEBES *et.al.*, 2005). A recirculação contínua dos linfócitos entre o sangue, tecidos e linfa é essencial para a coordenação e disseminação das respostas imunes. O sangue contém ‘pools’ distintos de linfócitos que diferem na sua competência de recirculação (YOUNG *et.al.*, 1997).

O processo de recirculação dispersa o repertório imunológico, direciona os subtipos de linfócitos para os microambientes especializados que controlam sua diferenciação e regulam sua sobrevivência, além de direcionar células imunes efetoras aos sítios de invasão antigênica ou microbiana (BUTCHER & PICKER, 1996).

A saída dos linfócitos dos tecidos e a migração via linfa aferente dentro dos linfonodos drenantes é um mecanismo de migração homeostática crítico para células T de memória e efetoras (DEBES *et.al.*, 2005). Um ‘pool’ de células de memória originadas do sangue tem a capacidade de entrar em múltiplos tecidos, ambos linfóides e não linfóides, e essa entrada é diferentemente regulada (KLONOWSKI *et.al.*, 2004).

DEBES *et.al* (2005) demonstraram que a saída dos linfócitos dos tecidos pela linfa é um processo seletivo e ativo, e que o receptor de quimiocina CCR7 é a chave desse processo.

A expressão de alguns receptores de adesão de superfície celular nas células linfáticas está correlacionada com a sua presença na linfa drenante específica do tecido, sugerindo que eles podem ser ‘pools’ fenotipicamente definidos de linfócitos que preferencialmente migram através dos tecidos distintos, sendo que os PBLs representam todos esses ‘pools’ (YOUNG *et.al.*, 1997).

O ‘pool’ de linfócitos que recirculam ativamente pelo organismo tem sido estimado ser dez vezes maior do que o ‘pool’ sangüíneo; mesmo assim, essas células ativamente recirculantes representam somente 10% do número total de linfócitos. A maioria dos linfócitos dentro do timo é incapaz de recircular, ou seja, talvez a massa tímica não seja incluída no total, além do que, o ‘pool’ de linfócitos recirculantes não pode ser considerado homogêneo, visto que é composto de múltiplas populações com comportamentos diferentes. A característica fenotípica dos subtipos de linfócitos no sangue é similar ao do baço e diferente dos linfonodos, linfa pós-nodal e pré-nodal (HAY & ANDRADE, 1998).

Os experimentos de KLONOWSKI *et.al.* (2004) demonstraram que um ‘pool’ de células de memória originadas do sangue foram capazes de entrar na maioria dos tecidos não linfóides e que essas células migratórias foram funcionalmente ativas, sugerindo um mecanismo capaz de conferir rapidamente uma ampla proteção frente a uma infecção secundária. No entanto, apesar deste experimento ter sido capaz de demonstrar a capacidade migratória das células T de memória, ele não foi capaz de demonstrar o movimento das células T CD8 de memória ao longo dos tecidos.

Segundo HAY & ANDRADE (1998), tem sido demonstrado que as células derivadas das linfas possuem diferentes capacidades migratórias em relação aos linfócitos derivados do sangue, e que um desafio antigênico de um único linfonodo pode primeiramente reduzir a produção de linfócitos e então, aumentar marcadamente o recrutamento do sangue e subseqüentemente a produção dentro da linfa eferente.



### 3.5. Métodos de controle da babesiose

Considerando-se as peculiaridades da babesiose, incluindo sua característica aguda, na maioria das vezes, intensos esforços têm sido feitos para desenvolver métodos ou produtos capazes de controlá-la (ALARCÓN *et.al.*, 2003).

RAMÍREZ-CRUZ *et.al.* (1997) afirmam que não existe um procedimento que por si mesmo constitua um controle real da babesiose no mundo, visto que há diferentes aspectos que determinam e condicionam a presença da enfermidade.

A redução da transmissão da babesiose na atualidade é favorecida pelo controle dos carrapatos que é realizado de maneira estratégica por meio de aplicação de drogas acaricidas em determinados períodos do ano, baseados em dados de levantamento epidemiológico, estas medidas reduzem os níveis populacionais dos carrapatos (NARI, 1990).

Esforços significativos têm sido investidos no desenvolvimento de vacinas para bovinos e outros animais, de qualquer forma, devem eventualmente se mostrar utilizáveis para o desenvolvimento de uma vacina humana (HOMER *et. al.*, 2000).

A imunização, sob o ponto de vista de RAMÍREZ-CRUZ *et.al.* (1997), parece ser o procedimento que oferece as melhores perspectivas, pois este método de prevenção e controle é considerado uma das alternativas primordiais para resolver o complexo problema da babesiose bovina.

É preciso salientar que embora as vacinas sejam desenvolvidas para proteger os animais contra um amplo número de patógenos importantes, freqüentemente elas são apenas parcialmente efetivas, seja pela sua ineficiência em gerar uma resposta imune celular (ELLIS, 2004), seja pela possibilidade de transmitir doenças.

DE VOS & BOCK (2000), estudando a eficiência de vacinas contra babesioses, cita que uma vacina ideal deve apresentar as seguintes características: prevenir a doença, proteger contra as diferentes cepas, induzir imunidade de longa duração, ser livre de antígenos contaminantes, conservar a potência durante o armazenamento e transporte, de fácil administração.

### 3.5.1. Premunicação

A premunicação consiste na inoculação de sangue de um animal portador (doador) em um animal susceptível (receptor), esta teve origem no início do século XX, na Austrália, por C. J. Pound (CALLOW *et al.*, 1997); apesar de ser o método mais antigo, atualmente, esta prática continua sendo amplamente utilizada no controle da babesiose em plantéis de bovinos leiteiros no Brasil.

PATARROYO (1979) destaca as limitações desse método já que o inoculo é desconhecido tanto qualitativa como quantitativamente. A necessidade de medicação dos animais que apresentam a doença na forma aguda interrompe o mecanismo de desenvolvimento da imunidade, necessitando-se, por isso, de repetidas inoculações. Como o volume de sangue inoculado é relativamente grande (em geral 5 mL), ocorrerá a sensibilização do receptor para grupos sangüíneos, o que poderá conduzir à doença de incompatibilidade de sangue entre o bezerro e a vaca. DIMMOCK & BELL (1970), afirmam que isto ocorre devido à formação de anticorpos polireativos contra as hemácias.

Outra desvantagem é a necessidade de suporte veterinário mesmo após a fase de premunicação (SOUZA *et al.*, 2000). Pois, os doadores podem ser portadores de outras doenças infecciosas como brucelose, tuberculose, leucose, diarreia bovina a vírus (BVD), rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), língua azul, erlichiose, tripanossomose, etc., as quais podem ser disseminadas por este método. Aliados a isto, estão o alto custo do processo e a dificuldade de imunizar grande número de animais simultaneamente.

### 3.5.2. Vacinação

A primeira vacina contra *B. bovis* desenvolvida por pesquisadores australianos; trata-se de uma vacina viva atenuada, que a princípio foi utilizada em áreas endêmicas do

país e posteriormante exportada (CALLOW & MELLORS, 1966; CALLOW *et.al.*,1979). Entretanto, por causa da variabilidade antigênica destes parasitos não tem sido possível obter, até o momento, uma vacina efetiva e economicamente viável (WRIGHT *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1995; PALMER & McELWAIN, 1995; PATARROYO *et al.*, 1995b). Apesar de efetiva, a vacina apresenta algumas desvantagens no que diz respeito ao curto período de validade (5-7 dias a 5°C), a transmissão de agentes infecciosos como o da leucose bovina, e a proteção parcial dos animais vacinados (BOCK *et al* , 1992).

A presença de reações pós-vacinais intensas, e a necessidade de tratamento terapêutico levaram à investigação de atenuação de cepas de *Babesia* capazes de manter a sua imunogenicidade, através de passagens rápidas em bezerros esplenectomizados e à radiação, a fim de não ser patogênicos aos hospedeiros (RAMÍREZ-CRUZ *et al.*, 1997).

No entanto, pode-se dizer que as vacinas vivas atenuadas apresentam desvantagens, como dificuldades de estocagem, risco de transmissão de outras infecções, proteção parcial dos animais vacinados, isoterólise fetal, competição antigênica devido à utilização de amostras vivas, além do risco de inocular enzimas e outras proteínas oriundas do animal do qual a amostra foi multiplicada. Considerando-se que o intuito de desenvolver uma vacina contra *B. bovis* é evitar a morte e diminuir gastos com tratamento de animais e com funcionários para monitorar os animais após a vacinação, então, as vacinas vivas atenuadas oferecem desvantagens que não justificam sua utilização.

Na atualidade ainda não há vacinas inativadas no mercado, apesar das tentativas que têm sido realizadas. A imunogenicidade de parasitas mortos provenientes de eritrócitos infectados com *B. bovis* foi primeiramente abordada por MAHONEY & WRIGHT (1976), no entanto, os animais vacinados mostraram proteção parcial quando desafiados com organismos heterólogos; desenvolvendo a infecção, apenas de forma sub-clínica.

### 3.5.3. Controle com exoantígenos

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que propiciaram a manutenção *in vitro* de *B. bovis* geraram um grande interesse no cultivo deste parasita, como fonte de vacinas babesiais a partir de antígenos presentes no sobrenadante de cultura (LEVY & RISTIC, 1980).

Exoantígenos presentes em sobrenadante de cultivo de amostra atenuada de *B. bovis* foram capazes de induzir uma resposta imune protetora contra amostras virulentas heterólogas quando desafiados, indicando que a vacina com antígenos solúveis de *B. bovis* são capazes de elicitar tanto a resposta imune humoral quanto a celular (PATARROYO *et al.*, 1995a).

BROWN *et al.* (1995), bem como TUO *et al.* (1999), realizaram pesquisas com o intuito de indentificar proteínas de *B. bovis* que fossem imunogênicas e pudessem ser utilizadas na produção de vacinas formadas por subunidades protéicas.

#### 3.5.4. Proteína Associada às Roptrias (RAP)

Com o passar dos anos, notou-se a importância de se identificar epítomos universais de células T que são reconhecidos por indivíduos com múltiplos haplótipos do MHC para promover a melhor proteção possível a nível populacional (NORIMINE *et.al.*, 2002).

Em 1995, foi observado em estudos realizados por PALMER & MCELWAIN, que anticorpos monoclonais contra merozoítos íntegros ou organelas do complexo apical (tais como as roptrias, os micronemas, os corpos esféricos e os grânulos densos) permitiam a identificação de proteínas requeridas para a sobrevivência do parasita.

A família multigênica que codifica proteínas de 58-60 kDa, denominadas RAP, que estão associadas tanto à superfície dos merozoítos quanto às roptrias do complexo apical de *B. bovis* e *B. bigemina*, demonstram capacidade de estimular a resposta imune adaptativa tanto do tipo humoral quanto celular. As proteínas produzidas em organelas do

complexo apical têm grande importância no processo de invasão do parasita na célula hospedeira (BROWN *et al.*, 1996).

A proteína associada à roptria-1 (RAP-1) família gene homólogo inclui: *Babesia bovis*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. divergens* e a *B. ovis* (SKUCE *et al.*, 1996). Segundo WRIGHT *et al.* (1992), a proteína RAP-1 é responsável pelo estabelecimento do parasitismo intra-eritrocitário e é conservada em vários isolados de espécies geograficamente diferentes, além de apresentar epítomos altamente imunogênicos para linfócitos B e células T-CD4<sup>+</sup> (PALMER *et al.*, 1991; SUAREZ *et al.*, 1991).

Embora alguns estudos mostrem que os epítomos para células B mais antigênicos da proteína RAP-1, normalmente não são conservados entre espécies diferentes e que seqüências altamente conservadas são pouco imunogênicas (SUAREZ *et al.*, 1993), BROWN *et al.* (1996) demonstraram não apenas que a proteína RAP-1 de *B. bovis* é altamente imunogênica, como também que os epítomos para células Th são conservados entre isolados geograficamente diferentes de *B. bovis*.

A significância imunológica de RAP-1 é indicada pela inibição do desenvolvimento *in vitro* de *Babesia* utilizando anticorpo monoclonal específico contra RAP-1 e a habilidade deste em imunizar contra alterações do parasitismo no gado (FIGUEROA & BUENING, 1991; McELWAIN *et al.*, 1991). Então, uma vacina contra *B. bovis* constituída de subunidades protéicas deve conter epítomos T e B reativos, não sujeitos a variação antigênica, devendo ser reconhecidos por uma grande variedade de moléculas MHC-II, o que coloca a proteína RAP-1 como forte candidata para produção de vacina (BROWN & PALMER, 1999).

A resposta imune de bovinos imunizados com roptrias purificadas de *Babesia bigemina* foi observada por MACHADO *et.al.* (2004), que constataram que as células B estavam em número maior na região medular dos linfonodos das vacas imunizadas.

### 3.5.5. Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos são seqüências de aminoácidos construídas e derivadas de uma ou várias proteínas. O grande interesse na utilização de peptídeos sintéticos na produção de vacinas decorre da capacidade de simulação dos sítios antigênicos ou dos receptores protéicos, da qual provém a seqüência aminoacídica do peptídeo (PATARROYO & GUZMAN, 2004).

Ao contrário das vacinas tradicionais, as peptídicas apresentam grandes vantagens, tais como: alto grau de pureza e completa segurança quanto à caracterização química e a ausência de contaminantes, reprodutibilidade na produção, fim da manipulação de cultivo celular em biorreatores, alta estabilidade e baixo custo da produção em escala, permite, também, a manipulação da resposta imunológica, pois os imunógenos sintéticos podem ser desenhados de tal forma que estimulem uma resposta imune apropriada (NEURATH & KENT, 1986), bem como ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou, autoimunes (PATARROYO *et al.*, 1995b). Portanto, o uso de peptídeos sintéticos como vacinas teriam a vantagem de ser mais um produto químico que biológico (PATARROYO & GUZMAN, 2004).

Atualmente há um interesse crescente pelo uso de peptídeos sintéticos no campo da medicina preventiva, diagnóstico e controle, assim como na terapêutica tem sido alavancada com diferentes comprovações e a aprovação de outros fármacos pela FDA. Assim, existem peptídeos em fase de teste clínico com adjuvante para imunização contra o *P. falciparum*, o *B. microplus*, o *S. mansoni*, entre outros para o diagnóstico de malária, doença de Chagas, leishmanioses, fascioloses, hidatidoses e cisticercoses, sendo o mais recente avanço a liberação do Fuzeon<sup>TM</sup> para o controle da AIDS (PATARROYO & GONZÁLEZ, 2004); isto, também, se da devido ao fato dos peptídeos poderem ser sintetizados e serem muito estáveis à temperatura ambiente, a utilização destes pode melhorar a padronização e reprodutibilidade dos diferentes testes para sorodiagnóstico (PATARROYO *et.al.*, 1999b).

Os resultados obtidos por FREITAS (2001) em experimento com células *ex vivo* permitiram constatar que a resposta ao peptídeo híbrido 23.290 foi caracterizada pelas maiores taxas de produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 por PBMC, sendo então o peptídeo que apresentou maior imunogenicidade e reconhecimento celular em relação aos outros peptídeos testados.

A intervenção vacinal com o peptídeo sintético SBbo23290 derivado de RAP-1 de *B. bovis*, reduz a taxa de mortalidade de animais imunizados após o desafio com amostra patogênica, bem como a eficácia desta vacinação estar associada ao desenvolvimento

precoce da habilidade de desenvolver uma resposta antígeno específica envolvendo células B e linfócitos TCD4<sup>+</sup> (BITTAR, 2002).

De acordo com pesquisas realizadas no LBCHV/BIOAGRO, utilizando peptídeos sintéticos, concluiu-se que quando bem desenhados e convenientemente testados, tais peptídeos comportam-se como uma proteína nativa, portanto, este trabalho tem como intuito realizar estudos sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunológica ao imunôgeno sintético SBbo23290.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de realização do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) do Departamento de Veterinária (DVT), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Isolamento contra Artrópodes e Vetores de Hematozoários para Bovinos, localizado no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa - MG.

## 4.2. Animais

Foram utilizados nos ensaios de imunização, 12 bovinos *Bos taurus taurus* da raça holandesa, machos, com idade entre 4-5 meses; os quais foram identificados sorológica e hematologicamente como negativos para hemoparasitas.

Os bovinos foram confinados no isolamento a prova de artrópodes e vetores de hematozoários. Durante a realização da pesquisa, os mesmos receberam diariamente ração balanceada com 17% de proteína e Capim Napier picado proveniente de área livre de carrapato, duas vezes por dia, além de suplemento mineral. Durante todas as fases, os bovinos receberam água à vontade.

## 4.3. Peptídeo sintético

A proteína RAP possui P.M. de 64,97 kDa e é composta de 565 aa. Esta foi sintetizada em 31 peptídeos diferentes, alguns com "overlap" entre uma sequência e outra. Os peptídeos foram catalogados no livro de seqüências de 5.067 até 5.097. Após o mapeamento de epítomos B e T de todos os peptídeos, utilizando experimentos "in vitro" e "ex vivo", realizou-se a hibridização dos peptídeos SBbo5084 (epítomo B) e do SBbo5081 (epítomo T) com adição de cisteína no N- e C- terminal, originando o peptídeo sintético SBbo23290 (PATARROYO *et al.*, 1999a), sendo o SBbo23290 o peptídeo mais imunogênico de acordo com os estudos de FREITAS (2001).

Este peptídeo foi desenvolvido e produzido pelo LBCHV/BIOAGRO/DVT/ UFV, em parceria com a Fundación Instituto de Immunologia de Colômbia (FIDIC). O peptídeo sintético SBbo23290 foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por MERRIFIELD (1963).



#### 4.4. Esquema de imunização

Os 12 animais utilizados no experimento foram agrupados, através de sorteio, em dois grupos de quatro animais e um de três, mantidos em iguais condições ambientais. Esses animais foram inoculados por via subcutânea (sc) de acordo com a tabela 1.

Como adjuvante, utilizou-se saponina (Saponine®) na dose de 1,5 mg/animal/dose.

**Tabela 1– Esquema de Imunização**

N.º grupo	N.º animais	Inoculação (n.º doses/via)	Intervalo	Produto
01 (Peptídeo)	04	4x/sc	30 d	2 mg SBbo 23.290 2 mL H <sub>2</sub> O destilada 1,5 mg saponina
02 (Saponina)	04	4x/sc	30 d	1,5 mg saponina 2 mL H <sub>2</sub> O destilada
03 (Controle)	04	4x/sc	30 d	2 mL H <sub>2</sub> O destilada

#### 4.5. Infecção – Desafio

Uma amostra virulenta de Bbo UFV1, sétima passagem, mantida sob criopreservação em nitrogênio líquido no LBCH/BIOAGRO, foi descongelada para o experimento. Após o descongelamento, a amostra foi inoculada em um bezerro para reativação da mesma. Quando a parasitemia alcançou 1,4% coletou-se o sangue total para ser usado como inóculo nos animais do experimento.

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 receberam 1,0 mL de sangue contendo aproximadamente  $1,2 \times 10^6$  hemácias infectadas por mL, como inóculo de desafio por via endovenosa. O desafio foi realizado 60 dias após a última imunização.

#### 4.6. Imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico (PBL)

Foram realizadas cinco coletas de sangue completo à vácuo, com anticoagulante EDTA nos dias -7, 7, 37, 65 e 172, conforme descrito na tabela 2.

Os leucócitos foram isolados por centrifugação (300g, por 15 minutos a 18° C) e criopreservados (40% de albumina sérica bovina a 20%, 60% de solução crioprotetora FARMOTERÁPICA, 10 % da solução final de dimethylsulfoxido (DMSO) e 2UI de heparina sódica por mL) em nitrogênio líquido.

Os marcadores de diferenciação de linfócitos foram analisados por citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados, específicos para antígenos de superfície celular bovina CD21, CD4, CD8 e o antígeno de superfície WC1 das células T $\gamma\delta$ , ambos utilizados em citometria de fluxo e produzidos pela Serotec® descritos no tabela 3, foram previamente padronizados utilizando-se sangue total bovino e amostras congeladas de PBL bovino.

A titulação específica para cada anticorpo foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se quantidades específicas (1,5; 0,75; 0,37 e 0,50  $\mu$ L) para cada anticorpo diluído em 15  $\mu$ L de PBS.

**Tabela 2 - Dias referentes às coletas de PBL**

<b>Coleta</b>	<b>Dias</b>	<b>Dias correspondentes</b>
<b>C1</b>	-7	7 dias antes da 1 <sup>a</sup> inoculação
<b>C2</b>	7	7 dias após a 1 <sup>a</sup> inoculação
<b>C3</b>	37	7 dias após a 2 <sup>a</sup> inoculação
<b>C4</b>	65	5 dias após a 3 <sup>a</sup> inoculação
<b>C5</b>	172	15 dias após o desafio

O criotubo de PBL com volume de 350  $\mu$ L foi retirado do freezer e colocado diretamente no banho-maria a 37° C. Após ser descongelado, o sangue foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL fundo em V, sendo então adicionado 5 mL de meio RPMI incompleto. O sangue foi centrifugado a 300g por 10 minutos, a 4°C. Após descartar cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender o sedimento, retirou-se 30  $\mu$ L (correspondendo a aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por mL) de PBL que foram colocados em tubos Falcon de 5 mL (n°352052) contendo 15  $\mu$ L dos anticorpos monoclonais específicos. Depois de homogeneizar, o tubo Falcon contendo o PBL e os anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de solução de lise (FACS™ Lysing Solution, na diluição 1:10) sob agitação. Os leucócitos totais, após incubação de 10 minutos, foram centrifugados a 300g por 10 minutos, a 18° C. O PBL foi lavado duas vezes da seguinte maneira: o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1 mL de PBS, o tubo foi homogeneizado com o auxílio de um Vórtex e centrifugou-se a 300g por 10 minutos a 18°C. Depois de descartar o sobrenadante, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução fixadora (paraformaldeído 1% em tampão cacodilato de sódio 10g/L, pH 7,2) e analisados no citômetro de fluxo FACSscan – BENCTON DICKINSON.

**Tabela 3: Anticorpos Monoclonais utilizados**

Nome	Especificidade	<i>Diluição</i>	Isótipo
<b>Mabs CC8</b>	Anti-CD4 conjugado com FITC	1:240	Camundongo IgG2a
<b>Mabs CC63</b>	Anti-CD8 conjugado com FITC	1:120	Camundongo IgG2a
<b>Mabs CC21</b>	Anti-CD21 conjugado com FITC	1:200	Camundongo IgG1
<b>Mabs CC101</b>	Anti-WC1 conjugado com FITC	1:10	Camundongo IgG2a

A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares, foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest. A cada etapa do experimento, foi analisado inicialmente o controle de células (controle negativo), importante na padronização da qualidade do perfil celular.

Para a análise da expressão dos antígenos de superfície linfocitária, o primeiro passo consistiu na identificação da população de linfócitos. Para isso, foram utilizados gráficos de distribuição pontual nos quais a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

Após a seleção da região de interesse (R1) o percentual de subpopulações celulares dentro da população selecionada foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual com coordenadas de fluorescência 1 (FL1) *versus* fluorescência 2 (FL2). Este gráfico tipo “dot-plot” permite identificar o percentual de células fluorescentes para um determinado fenótipo de marcação, quantificado através da estatística de quadrantes incluída no programa.

O corte foi posicionado considerando-se a população celular positiva para os marcadores CD4, CD8, CD21 e WC1, o que permitiu obter o percentual equivalente à população de linfócitos reativos dentro da população de leucócitos totais.

Também foram avaliados alguns marcadores que se expressam de forma constitutiva na superfície celular. Para isto foi utilizada a estratégia de análise por meio de Canal Médio de Fluorescência (CMF), que representa a intensidade total de luz emitida pela excitação do fluorocromo indiretamente ligado à superfície celular. Esta estratégia objetiva ampliar a sensibilidade na detecção das possíveis variações na expressão durante as diferentes fases do experimento. A intensidade de fluorescência foi avaliada através de histogramas unidimensionais para os marcadores CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup>.

#### **4.7. Histologia dos linfonodos bovinos**

Linfonodos pré-escapulares foram cirurgicamente removidos nos dias -1, 5, 34, 63 e 160 (tabela 4). Os fragmentos de linfonodos seccionados foram fixados durante 4 horas em paraformaldeído a 4% (pH 7,2), e desidratados por 24 horas em soluções alcóolicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), e posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast Plus<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>) (PROPHET *et al.*, 1992). Os linfonodos foram coletados do mesmo lado que a imunização.

Realizaram-se cortes histológicos seriados de 5µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER – American Optical Company, os quais foram corados segundo as técnicas de Hematoxilina & Eosina e Verde Metil Pironina.

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600<sup>1</sup>.

**Tabela 4 – Dias referentes às coletas de linfonodos bovinos**

<b>Coleta</b>	<b>Dias</b>	<b>Dias correspondentes</b>
<b>C1</b>	-1	1 dias antes da 1 <sup>a</sup> inoculação
<b>C2</b>	5	5 dias após a 1 <sup>a</sup> inoculação
<b>C3</b>	34	4 dias após a 2 <sup>a</sup> inoculação
<b>C4</b>	63	3 dias após a 3 <sup>a</sup> inoculação
<b>C5</b>	160	3 dias após o desafio

#### **4.8. Hematoxilina & Eosina**

Os cortes foram desparafinados em xilol por 5 minutos, sendo hidratados em soluções alcóolicas decrescentes (100% por três minutos; 90%, 80% e 70% por um minuto cada), e lavados em água comum por três minutos. Então, os cortes foram corados em Hematoxilina por um minuto e meio, lavados em água comum por cinco minutos, e corados com Eosina por três minutos e lavados em água comum novamente por cinco

minutos. Posteriormente, os cortes foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes por dois minutos cada, desparafinados em xilol por cinco minutos, e montados entre lâmina e lamínula com Entellan®.

#### **4.9. Verde Metil Pironina**

Os cortes foram desparafinados em xilol por cinco minutos, lavados em água destilada por quinze minutos, e corados com Verde Metil Pironina por seis minutos. Então os cortes foram lavados duas vezes em butanol por cinco minutos cada, desparafinados em xilol por cinco minutos e montados entre lâmina e lamínula com Entellan®.

#### **4.10. Pesquisa de antígenos de *Babesia bovis* em linfonodos bovinos através da técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase – PAP (PROPHET *et al.* 1992)**

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, duas passagens de 30 minutos cada, sendo hidratados em soluções alcólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) trocando-se de solução a cada 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS pH 7,4 (1,48g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,43g de fosfato de sódio monobásico anidro, 7,2g de cloreto de sódio e água deionizada q.s.p. 1000ml), foi feita a digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1mg/ml em PBS pH 7,4 durante 15 minutos a 37°C.

Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4. Em seguida, cobriram-se os cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubaram-se em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro e sem deixar secar os cortes colocou-se anticorpo primário específico (IgG de coelho anti-*Babesia bovis*), produzido pelo LBCH,

---

<sup>1</sup> Microscópio Óptico – Eclipse E600 – Nikon – Japan

diluído 1:20 em PBS pH 7,4; os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), produzidos pelo LBCH, diluído 1:10 em PBS 7,4. Após incubação em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C, os cortes foram lavados três vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 e posteriormente cobertos com o complexo PAP produzido em coelho (SIGMA®), diluído 1:200 de acordo com especificação do fabricante, e imediatamente incubados em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C. Lavaram-se os cortes novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e imediatamente foram colocados em solução reveladora recém preparada [25mg de diaminobenzidina (DAB), 200µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes em 100ml de PBS pH 7,4] durante 5 minutos. Finalmente, lavaram-se os cortes durante 5 minutos em PBS pH 7,4 e contra corou-se com Hematoxilina de Harris 1:10 em PBS pH 7,4 durante 20 segundos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan® entre lâmina e lamínula.

#### **4.11. Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi feita por intermédio da análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey, nível de 5% de probabilidade. Os cálculos estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software Graph Pad Prisma versão 4.03.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Avaliação histopatológica de linfonodos pré-escapulares bovinos**

O exame microscópico dos linfonodos dos animais inoculados com o peptídeo SBbo23290, corados com Hematoxilina & Eosina (H&E) demonstrou que a partir dos cinco dias após a primeira inoculação foi possível constatar reatividade de centros germinais - CGs (Figura 1C e D) e de áreas paracorticais, diferente dos do grupo controle (Figura 1A e B). Igualmente constatou-se que algumas regiões interfoliculares estavam levemente hiperplásicas. Quatro dias após a segunda inoculação a formação de CGs se mostrou mais evidente, igualmente os cordões medulares estavam nitidamente hiperplásicos (Figura 2B).



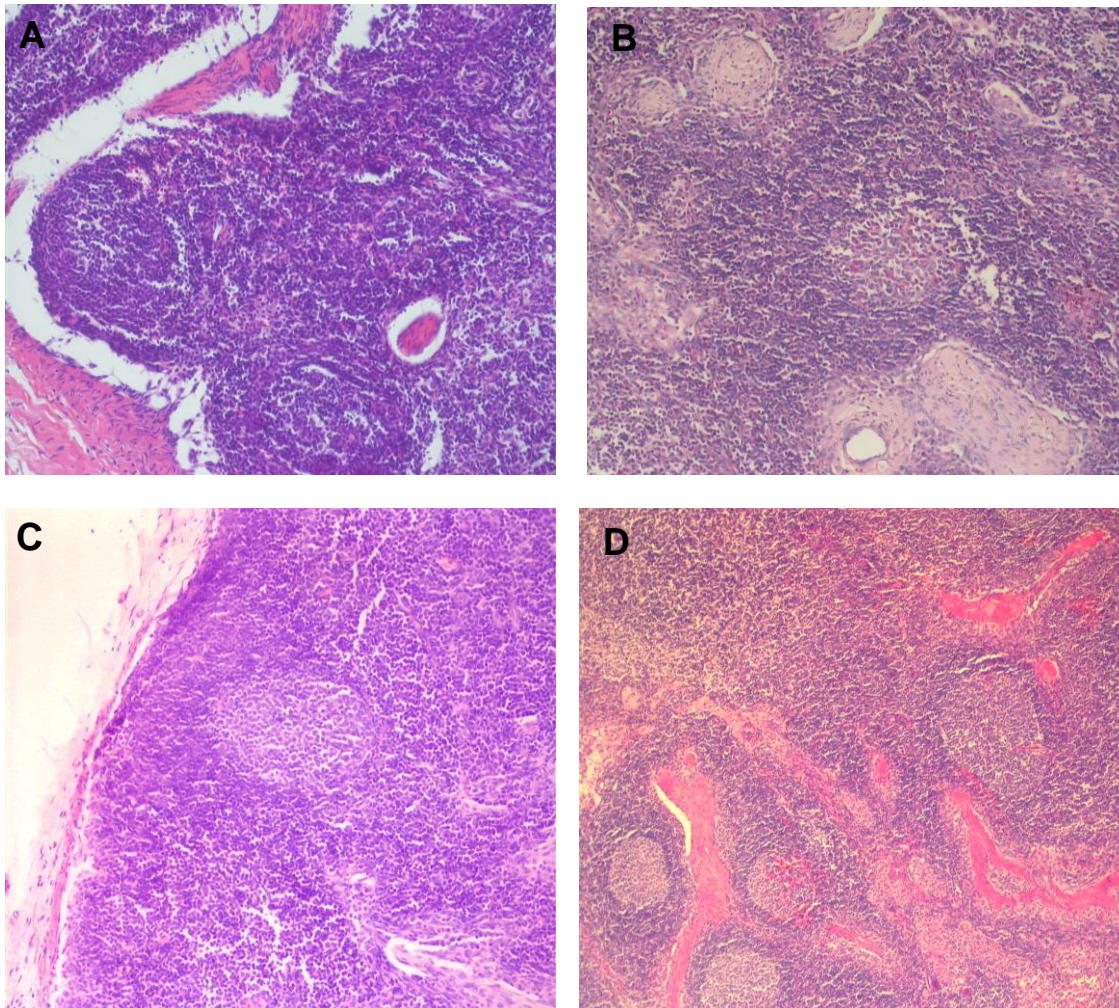
Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que quando se usam antígenos T-dependentes, a resposta de células T após um segundo desafio geralmente é mais rápida e efetiva em relação ao desafio antigênico inicial, como consequência do aumento no número de células antígeno-específicas e de memória que respondem mais eficazmente do que as células virgens durante as repostas primárias, concordando com o constatado por FREITAS (2001), quando trabalhou com uma amostra atenuada de *Babesia bovis*; GONZÁLEZ (2003) e SALES JÚNIOR (2003) ao trabalharem com o peptídeo sintético SBm7462; e BOUSSO & KOURILSKY (1999) utilizando tetrâmeros. Além disso, a maior reatividade dos CGs, bem como a hiperplasia de cordões medulares e de áreas T-dependentes observada neste trabalho quatro dias após a segunda imunização, três dias após a terceira inoculação, e três dias após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis* comprova-se que a resposta imune secundária é mais rápida e efetiva em relação à primária, isto devido à memória imunológica.

Visto que foi possível constatar uma reatividade dos linfonodos caracterizada pela formação de CGs e hiperplasia das áreas paracorticais, pode-se dizer que o imunógeno sintético SBbo23290 utilizado neste estudo induziu uma resposta imune adaptativa do tipo T-dependente, concordando com o que foi referido por LIU *et al.* (1992). Assim, as particularidades histológicas dos CGs também descritas por vários autores em órgãos linfóides periféricos de bovinos (FREITAS, 2001; SAKAMOTO & CABRERA, 2003; RESENDE, 2003; GONZÁLEZ, 2003) são características de resposta a antígenos T-dependentes. Estes achados também têm sido descritos por vários autores em órgãos linfóides periféricos de humanos (CAMACHO *et al.*, 1998) e camundongos (SALES JÚNIOR, 2003) tais como: baço, linfonodos (REARDON & PIERCE, 1981), tonsilas (CAMACHO *et al.*, 1998) e Placas de Payer (GULBRANSON-JUDGE *et.al.*, 1997).

Além disso, quando os cortes histológicos foram corados com Verde Metil Pironina foi possível observar que aos cinco dias após a primeira inoculação (Figura 2 B e D) haviam células intensamente coradas de vermelho principalmente nos cordões medulares, enquanto nos seios medulares havia predominância de células coradas de azul em quantidade elevada, sendo possível notar a presença de células dendríticas e plasmócitos, sendo estes achados mais notáveis após cada inoculação (Figura 2C). Corroborando os resultados de FREITAS (2001) e RESENDE (2003), na região cortical

notou-se a presença de células fortemente coradas de vermelho e de azul, porém em menor quantidade. A zona escura dos CGs apresentava células fortemente coradas de vermelho, enquanto na zona clara havia uma nítida predominância de células coradas de azul.

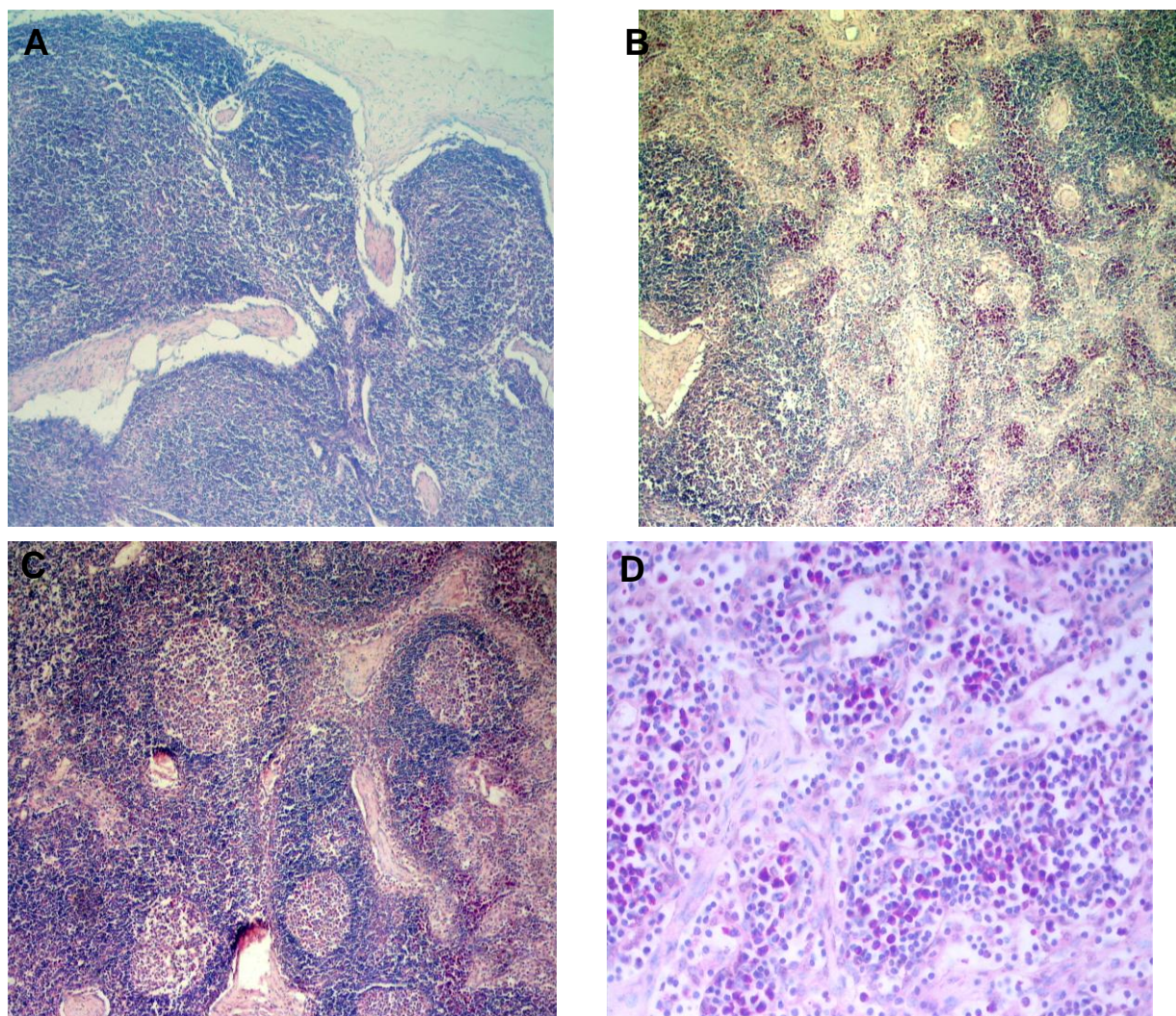
FREITAS (2001) e RESENDE (2003) constataram que durante a primeira semana as células formadoras de anticorpos localizadas nas áreas extrafoliculares produziam anticorpos de baixa afinidade, células estas caracterizadas como plasmócitos quando coradas pelo Verde Metil Pironina, o que também foi descrito por SMITH *et al.* (1997), ZHENG *et al.* (1996) e TARLINTON (1998). Nesta técnica de coloração, o RNA é corado de vermelho e somente as células que estão em divisão são coradas, como é o caso dos linfócitos B; e o DNA é corado de verde ou azul acinzentado. Os achados acima descritos corroboram os resultados do presente trabalho, visto que foi possível constatar a presença de grande quantidade de células com características de plasmócitos aos quatro dias após a segunda imunização, aos três dias após a terceira inoculação, e aos três dias após o desafio. Nas regiões interfoliculares foi possível observar células dendríticas, ao redor das quais agrupavam-se células cujo citoplasma corou-se intensamente de vermelho com Verde Metil Pironina, semelhantes àquelas que se encontram nos cordões medulares.



**Figura 1**– Linfonodos bovinos dos grupos controle, saponina e imunizados com o peptídeo sintético SBbo23290. **A:** Animal controle aos cinco dias após a primeira inoculação, coloração H&E, 20X. **B:** Animal controle aos cinco dias após a primeira inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 20X. **C:** Animal do grupo saponina aos cinco dias após a primeira imunização com formação de CG, coloração H&E, 20X. **D:** Animal do grupo



peptídeo aos cinco dias após a primeira imunização com maior formação CGs em relação aos demais grupos, coloração H&E, 10X.



**Figura 2**– Linfonodos de bovinos dos grupos controle, saponina e imunizados com o peptídeo SBbo23290. **A:** Animal do grupo saponina aos quatro dias após a segunda inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 10X. **B:** Animal do grupo peptídeo aos cinco dias após a primeira inoculação Verde Metil Pironina, 10X. **C:** Animal do grupo peptídeo

aos quatro dias após a segunda inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 10X. **D:** Animal do grupo peptídeo aos cinco dias após a primeira inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 40X.

Então, esses achados sugerem que o imunógeno sintético SBbo23290 foi capaz de provocar uma resposta imune com produção de células de memória, já que segundo MORRISON *et al.* (1986) as duas principais funções dos CGs são a produção de células de memória e a regulação do nível e duração da resposta de anticorpos, fato este comprovado por JARDIM (2005) quando avaliou o mesmo imunógeno sintético em bovinos, visto que a autora observou aumento dos níveis de IgG após a segunda e a terceira inoculações.

A cinética de formação dos CGs que foi observada nos linfonodos é semelhante ao que foi descrito por outros autores, quando utilizaram antígenos T-dependentes, uma vez que na resposta imune primária eles aparecem ao redor do quarto dia pós-imunização (JACOB *et al.*, 1991; GULBRANSON-JUDGE *et al.*, 1997; HAN *et al.*, 1997; KENNETH *et al.*, 1997; FREITAS, 2001; GONZÁLEZ, 2003 ; SALES JÚNIOR, 2003).

Assim, os resultados obtidos por GONZÁLEZ (2004) e SALES JÚNIOR (2003) ao imunizar bovinos e camundongos respectivamente, com o peptídeo sintético SBm7462 anti-carrapato *Boophilus microplus*, e de RESENDE (2003), que utilizou uma amostra de *Anaplasma marginale*, são semelhantes aos obtidos com o peptídeo sintético SBbo23290 utilizado neste trabalho já que após a primeira imunização, houve pouca reatividade de CGs, as áreas paracorticais e algumas regiões interfoliculares encontravam-se hiperplásicas, constatando-se uma ligeira hiperplasia de cordões medulares, sendo essas características mais evidentes e intensas após cada inoculação com os referidos imunógenos.

Entretanto, alguns antígenos T-independentes, tais como lipopolissacarídeos ligados a haptenos e alguns surfactantes, entre outros, podem induzir à formação de CGs ou reações semelhantes a CGs (KELSOE, 1995). No entanto, visto que nenhuma das substâncias supracitadas estava presente no imunógeno ou no veículo utilizados, pode-se

afirmar que a resposta imune T-dependente foi induzida pelo peptídeo sintético SBbo23290.

No grupo controle observaram-se alguns folículos secundários, porém sem reatividade e em menor número que os observados nos animais imunizados, com presença de poucas células linfocíticas. Não houve hiperplasia de áreas interfoliculares, paracorticais e nem de cordões medulares. Em trabalhos experimentais com *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, FREITAS (2001) e RESENDE (2003) respectivamente, também observaram reatividade de CGs nos linfonodos dos animais não inoculados, fato este atribuído, como no presente trabalho, a respostas inespecíficas.

Os resultados do grupo saponina foram semelhantes aos resultados do grupo peptídeo, porém com menos reatividade de CGs e menos hiperplasia dos cordões medulares. Essa diferença de responsividade foi mais evidente após a segunda e terceira coleta.

## **5.2. Avaliação imunohistoquímica de linfonodos pré-escapulares bovinos inoculados através do método Peroxidase anti-peroxidase (PAP)**

Ao examinar os cortes histológicos submetidos ao teste imunohistoquímico Peroxidase anti-peroxidase (PAP), foi possível observar que aos cinco dias após a primeira inoculação houve resposta positiva nas células dendríticas dos CGs. FREITAS (2001), ao avaliar os fragmentos de linfonodos de animais imunizados com uma cepa atenuada de *Babesia bovis*, detectou reatividade fracamente positiva em células dendríticas dos CGs aos doze dias pós-inoculação em células dendríticas foliculares, indicando a presença do antígeno.

Aos quatro dias após a segunda imunização observou-se células PAP fortemente positivas nos cordões medulares, o que corrobora os achados de GONZÁLEZ (2004), que observou o mesmo fato aos cinco dias após a segunda inoculação, e de FREITAS (2001), que constatou a reatividade fortemente positiva aos três dias após a reinoculação. As células PAP positivas encontravam-se dispersas na região paracortical, cordões medulares

e nos CGs, sendo que as células marcadas foram claramente distinguíveis das células não marcadas. Algumas das células PAP positivas apresentavam-se com abundante citoplasma e prolongações evidentes à semelhança de células dendríticas, enquanto outras apresentavam citoplasma escasso semelhante a células linfocíticas.

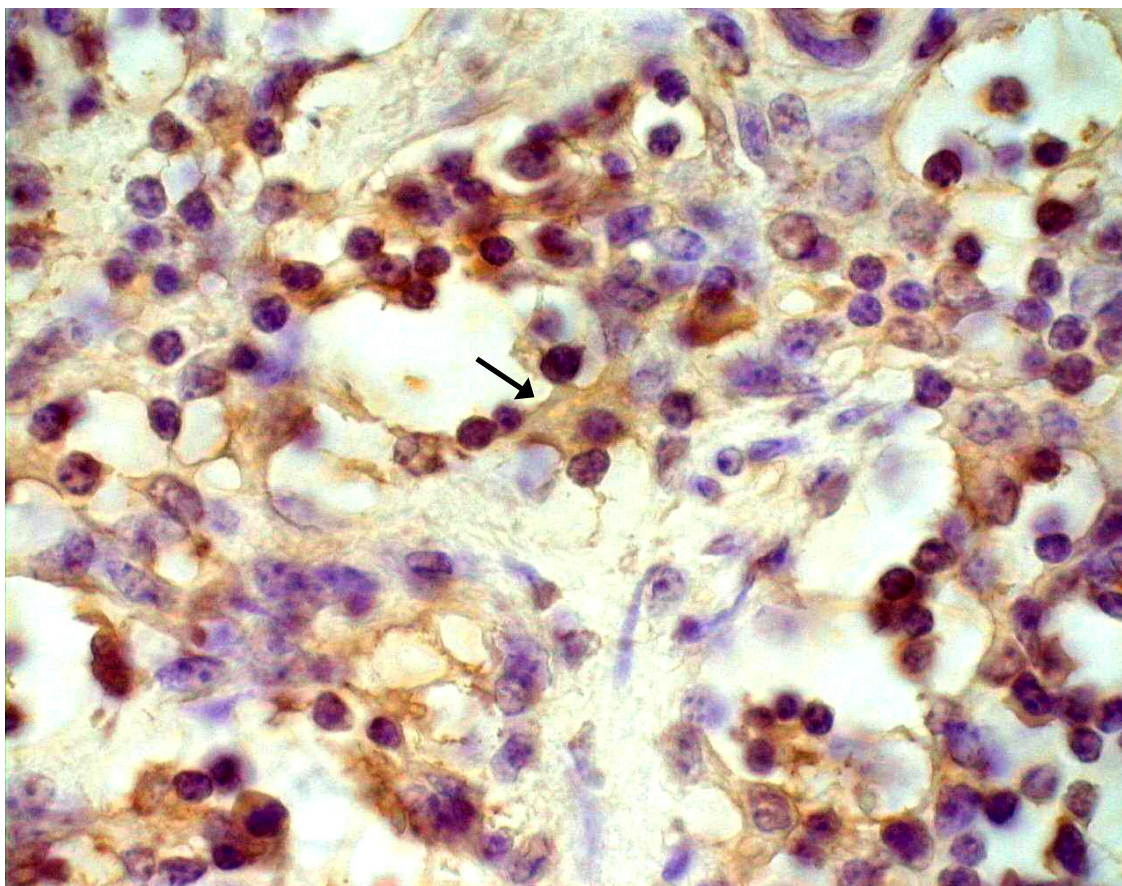
Aos três dias após a terceira inoculação (Figura 3) e aos três dias após o desafio, observou-se um número maior de células PAP positivas. Então, pode-se dizer que a memória gerada pelo imunógeno SBbo23290 estaria associada aos eventos observados pela técnica de PAP; esta suposição se fundamenta na marcada presença de células PAP positivas verificadas neste experimento após cada imunização. Entretanto, de acordo com GONZÁLEZ (2004), a intensidade e a velocidade da resposta ao antígeno detectada pelo PAP na segunda imunização, também pode ser resultado do reconhecimento antigênico por células B antígeno-específicas geradas na resposta imune primária, ou ao seqüestro de imunoglobulinas ligadas a antígenos dentro das redes de células dendríticas. Por outro lado, a intensidade e a velocidade da resposta ao antígeno, detectada pela técnica de PAP na re-inoculação, também pode ser devido ao processo de maturação das células dendríticas ocorrido entre a primeira e segunda inoculação, o que seguramente foi devido a endocitose do peptídeo. Segundo GRAY *et al.* (1996), a reposição contínua do antígeno pelas células que se visualizam como PAP positivas estaria envolvida na geração de células B de memória a partir de células ativadas logo após a seleção de mutantes somáticos com alta afinidade dentro dos CGs.

A presença de grande quantidade de células dendríticas nos linfonodos pode ser devido à via de inoculação visto que, geralmente, quando um antígeno é injetado através da via subcutânea, as células dendríticas são as mais prováveis carreadoras, processadoras e apresentadoras do antígeno (HOWARD *et al.*, 1999).

No presente trabalho foi observada a presença de um tipo celular diferente, que não células dendríticas, possivelmente envolvido na apresentação antigênica, já que a existência de células PAP positivas não caracterizadas morfológicamente como dendríticas, poderiam ser linfócitos T $\gamma\delta$  WC1 ou B capacitados na apresentação antigênica. O fato anterior poderia corroborar o trabalho desenvolvido por COLLINS *et al.* (1998), no qual foi demonstrado que as células T $\gamma\delta$  WC1 são capazes de apresentar antígenos



protéicos às células  $CD4^+$  e induzir a sua proliferação. Poderíamos dizer ainda, que o peptídeo sintético se comporta como um verdadeiro antígeno/imunógeno protéico.



**Figura 3-** Resultado do teste Peroxidase anti-peroxidase para detecção de antígenos. Linfonodo pré-escapular. Observa-se célula dendrítica (seta) contendo peptídeo sintético SBbo23290 (coloração amarronzada) e apresentando a linfócitos aos três dias após a terceira inoculação, PAP, 100X.



### **5.3. Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup> em sangue periférico**

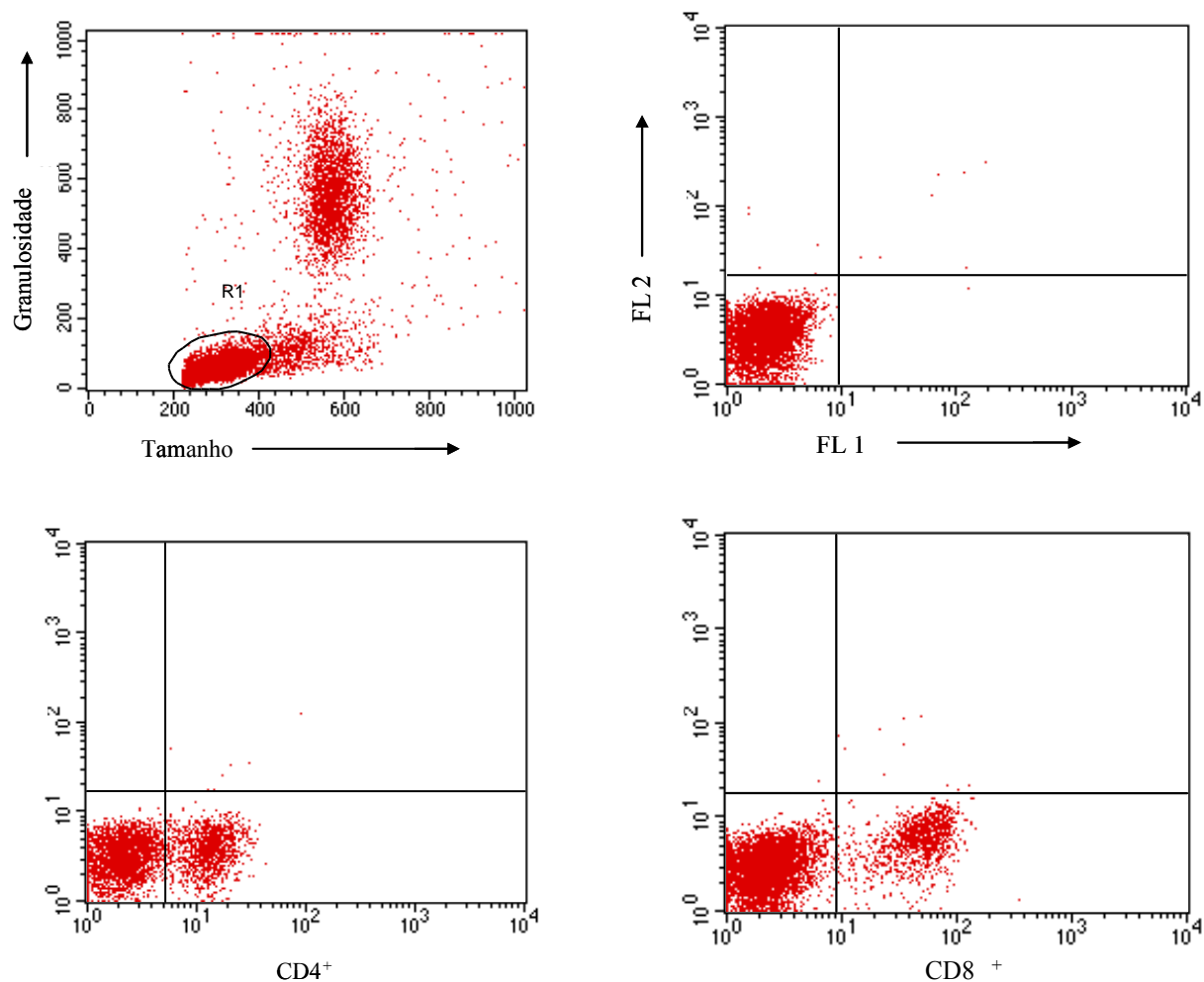
#### **5.3.1. Linfócitos periféricos T CD4<sup>+</sup>**

Tem sido demonstrado que a distribuição periférica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> depende da idade do animal, sendo que em condições fisiológicas, pode variar de 15-30% das células de sangue periférico em animais adultos. É importante salientar que os linfócitos CD4<sup>+</sup> migram mais eficientemente do que os CD8<sup>+</sup> ou linfócitos B (DEBES *et.al.*, 2005).

A porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> sete dias após a primeira inoculação nos animais do grupo peptídeo, saponina e controle (figura 5) foi de 14,91 ( $\pm 12,07$ ), 15,41 ( $\pm 8,40$ ) e 11,56 ( $\pm 4,14$ ) respectivamente, não havendo diferença estatística entre os grupos. O grupo controle obteve diferença estatística entre as coletas dos dias sete antes e sete após a primeira imunização ( $p < 0,05$ ). Houve um aumento significativo da porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> sete dias após a segunda imunização, como pode ser observado na tabela 5, as médias foram de 21,04 ( $\pm 1,97$ ), 19,78 ( $\pm 5,77$ ) e 21,94 ( $\pm 3,23$ ) nos grupos peptídeo, saponina e controle, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados do presente trabalho corroboram os achados de GONZÁLEZ (2004), ao avaliar a resposta de bezerros imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Boophilus microplus* SBm7462, visto que a referida autora notou que a partir do quinto dia após a segunda imunização, as células T CD4<sup>+</sup> mostraram um sutil aumento, com média de 22,35 ( $\pm 4,48$ ), provavelmente devido à memória imunológica.

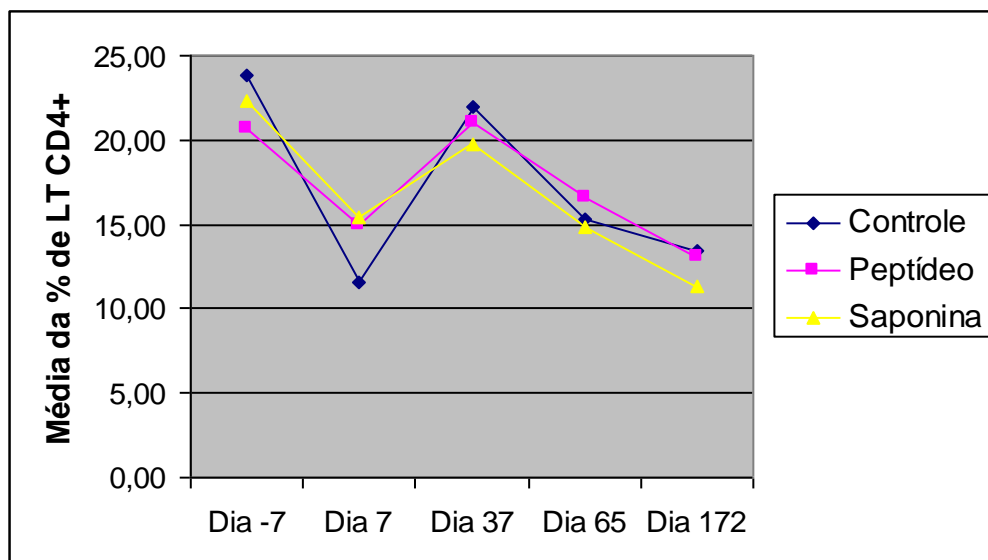
O trabalho anteriormente descrito mostrou que o grupo controle obteve médias superiores em relação aos grupos imunizados durante todo o experimento, fato este não

observado no presente estudo. Apesar da referida autora também ter trabalhado com peptídeo sintético, pode ser que o carrapato *B. microplus* induza um perfil de resposta imunológica diferente do perfil induzido contra o parasita *B. bovis*. BITTAR (2002),



**Figura 4:** Representação gráfica da Imunofenotipagem dos linfócitos bovinos. Perfil dos leucócitos periféricos bovinos obtidos de PBL (A); Controle de células (B); população marcada com anticorpos específicos para linfócitos T CD4<sup>+</sup> (C), CD8<sup>+</sup> (D), WC1<sup>+</sup> (F) e B CD21<sup>+</sup> (E). FL 1 fluorescência 1 e FL 2 fluorescência 2.

também estudando a resposta imune frente à *B. bovis* utilizando peptídeo sintético, observou que não houve diferença estatística entre os grupos durante a imunização corroborando o resultado do presente trabalho.



**Figura 5**– Porcentagem de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Aos cinco dias após a terceira inoculação, notou-se uma ligeira queda nas porcentagens de LT CD4<sup>+</sup>, visto que os animais do grupo peptídeo apresentaram 16,55 ( $\pm 4,90$ ), o grupo saponina 14,80 ( $\pm 5,78$ ), e o grupo controle apresentou uma média de 15,30 ( $\pm 4,75$ ). Também foi possível observar uma diminuição na média das porcentagens de LT CD4<sup>+</sup> cinco dias após o desafio com a amostra virulenta de *B. bovis*: o grupo peptídeo apresentou 13,08 ( $\pm 2,76$ ), o grupo saponina 11,36 ( $\pm 1,42$ ) e 13,48 ( $\pm 2,94$ ) no grupo controle. Estes resultados diferem dos obtidos por GONZÁLEZ (2004), visto que aos três dias após a terceira inoculação, foi observada uma média de 22,33 ( $\pm 2,94$ ) nos grupos imunizados, e 28,42 ( $\pm 3,37$ ) no grupo controle, valores estes, muito próximos aos

obtidos após a segunda imunização e após o desafio. No trabalho de BITTAR (2002), no qual foi testado o peptídeo sintético anti-*Babesia bovis* SBbo23290, observou-se que a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico dos bovinos pertencentes aos grupos experimentais variou de 26,22 a 29,04 ( $x = 27,73 \pm 1,42$ ) na primeira imunização, de 27,77 a 29,14 ( $x = 28,62 \pm 0,73$ ) na segunda imunização e de 28,23 a 28,62 ( $x = 28,48 \pm 0,21$ ) na terceira imunização, não havendo diferença estatística da porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os grupos durante as intervenções. Apesar da porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> terem sido inferiores em relação aos trabalhos supracitados, pode-se dizer que o peptídeo SBbo23290 foi capaz de induzir uma resposta imune efetiva, visto que embora a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tenha sido relativamente baixa, a porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> e B CD21<sup>+</sup> foram altas, indicando um outro perfil de resposta imunológica.

**Tabela 5- Média da Porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	20,62 ( $\pm 5,53$ )	14,91 ( $\pm 12,07$ )	21,04 ( $\pm 1,97$ )	16,55 ( $\pm 4,90$ )	13,08 ( $\pm 2,76$ )
<b>Saponina</b>	22,34 ( $\pm 2,07$ )	15,41 ( $\pm 8,40$ )	19,78 ( $\pm 5,77$ )	14,80 ( $\pm 5,78$ )	11,36 ( $\pm 1,42$ )
<b>Controle</b>	23,78 ( $\pm 5,91$ )	11,56 ( $\pm 4,14$ )	21,94 ( $\pm 3,23$ )	15,30 ( $\pm 4,75$ )	13,48 ( $\pm 2,94$ )

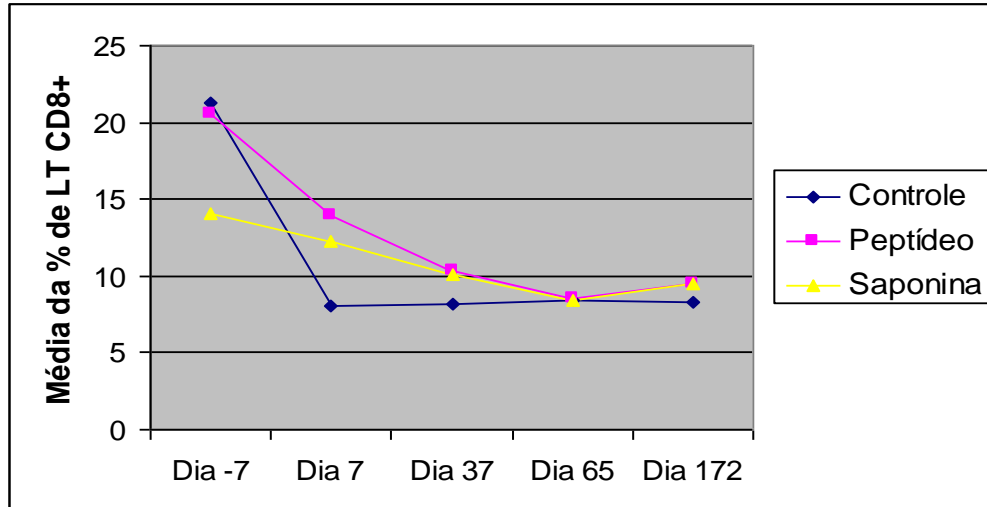
### 5.3.2. Linfócitos periféricos T CD8<sup>+</sup>

As células T CD8<sup>+</sup> se encontram relacionadas com respostas a parasitas intracelulares, vírus ou antígenos citosólicos que induzem a expressão de moléculas MHC da classe I. Suas propriedades têm sido estudadas quanto à sua citotoxicidade e como células efectoras (CERWENKA *et al.*, 1999), mais do que como indutoras de uma resposta.

Além disso, foi demonstrado que a proteção que este tipo celular pode oferecer a esses antígenos está diretamente relacionada com a sua capacidade de migração e efetividade citolítica aos locais ativos de infecção.

A porcentagem dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi inferior em relação aos outros linfócitos e, em geral, foi decrescente no decorrer das imunizações nos animais do grupo peptídeo e saponina (figura 6), exceto após o desafio em que houve um ligeiro aumento, enquanto no grupo dos animais controle houve um aumento gradativo no decorrer das três inoculações e um decréscimo após o desafio, como pode ser observado no tabela 6. Sete dias após a primeira imunização, a média foi de 13,89 (±10,47) e 12,31 (±1,07) nos animais imunizados (grupos peptídeo e saponina respectivamente), e de 8,02 (±2,05) no grupo controle (tabela 6). Os grupos peptídeo e controle apresentaram diferença estatística entre as coletas, sendo o grupo peptídeo entre o dia sete antes da primeira imunização e cinco após a terceira imunização ( $p<0,05$ ), e o grupo controle entre o dia sete antes da primeira imunização e todas as outras coletas ( $p<0,01$ ). O grupo peptídeo mostrou maiores porcentagens durante todo o experimento em relação aos demais grupos.

Nos fenótipos CD8<sup>+</sup>, GONZÁLEZ (2004) não evidenciou diferença de porcentagens entre períodos e entre animais imunizados e controles. Nestes as médias apresentadas alcançaram 16,22% nos animais imunizados com o peptídeo anti-carrapato *Boophilus microplus* e de 17,88% no grupo controle. Já BITTAR (2002), notou que a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no grupo peptídeo foi discretamente mais elevada que no grupo saponina e grupo controle por todo o período de imunização, porém não houve diferença estatística.



**Figura 6**– Porcentagem de Linfócitos T CD8<sup>+</sup>

No trabalho de BITTAR (2002) também foi possível notar que a porcentagem de LT CD8<sup>+</sup> foi inferior à de LT CD4<sup>+</sup>, variando de 18,24 ( $\pm 3,69$ ) a 22,78 ( $\pm 9,46$ ) na primeira imunização, de 18,34 ( $\pm 22,44$ ) a 22,44 ( $\pm 10,24$ ) na segunda imunização, e de 16,84 ( $\pm 1,85$ ) a 23,58 ( $\pm 13,45$ ) na terceira imunização. O grupo peptídeo obteve médias superiores aos outros dois grupos, não havendo diferença significativa entre eles, o que corrobora com os resultados do presente trabalho. Os trabalhos de FIKRI *et.al.* (2000) mostraram que nas PBMC, WC1<sup>+</sup>, e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> representaram 42%, 21% e 14% respectivamente, ou seja, é esperado que a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> sejam inferiores aos demais, o que corrobora os achados do presente estudo.

As células T CD8 virgens migram através do sangue, tecidos linfóides secundários (linfonodos, baço, placas de Peyer), e retornam ao sangue via linfa eferente até que a célula T encontre um antígeno apresentado pelas células dendríticas nos tecidos linfóides secundários; a célula T se torna então um linfócito T citotóxico, o qual possui um padrão de tráfego modificado semelhante às células efectoras, sendo distribuídos aos múltiplos tecidos não-linfóides, enquanto nos tecidos terciários, as células T citotóxicas podem entrar em contato com células-alvo expressando antígeno, dessa forma mediando a eliminação do tecido infectado pelo patógeno. Após o pico proliferativo da resposta, uma fase de

contração apoptótica ocorre em todos os sítios, permanecendo uma pequena população de células de memória antígeno-específicas em todos os tecidos (KLONOWSKI *et.al.*, 2004).

A distribuição fenotípica dos subtipos de linfócitos não é a mesma no sangue, linfa aferente e eferente, e experimentos têm demonstrado que os linfócitos variam nas suas propriedades migratórias (HAY & ANDRADE, 1998). Esse mecanismo de recirculação talvez possa explicar a baixa porcentagem deste tipo celular no sangue periférico, visto que assim que as células T CD8 forem capazes de entrar na circulação, também serão capazes de entrar em órgãos como pulmão, fígado, medula óssea, e tecidos linfóides com a mesma eficiência (KLONOWSKI *et.al.*, 2004). O autor supra-citado afirma também que parece possível que os atributos funcionais das células de memória sejam modificados como resultado da migração do sangue para tecidos não linfóides, devido às interações que ocorrem durante o extravasamento e/ou como resultado dos fatores ambientais tecido-específicos. Linfócitos originados da linfa migram através do mecanismo de recirculação linfática, sendo que mais de 1/3 de todos os linfócitos periféricos sangüíneos (PBLs) foram excluídos do circuito linfático e migraram para o baço. Análises fenotípicas mostraram que a maioria dos PBLs não circulantes eram células B (YOUNG *et.al.*, 1997).

O fato acima descrito pode explicar as baixas porcentagens de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, visto que foram observados em cortes histológicos uma grande quantidade de linfócitos T CD8 nos linfonodos durante as coletas experimentais, sugerindo que este tipo celular estivesse presente nos órgãos linfóides em quantidade muito superior em relação ao ‘pool’ sangüíneo. Outro fato que também deve ser levado em consideração é a amostra utilizada no presente trabalho, pois de acordo com HAY & ANDRADE (1998), o sangue é uma conveniente amostra, porém ainda questiona-se a sua validade ao determinar o ‘status’ imunológico de um indivíduo baseado na caracterização de uma amostra de linfócitos originados do sangue, pois as mudanças mais súbitas da difusão de linfócitos associados ao exercício, sono, e perturbações endócrinas representam desafios experimentais adicionais. Segundo o referido autor, se os linfócitos no sangue não refletirem adequadamente o resto do sistema imune, eles podem afetar a interpretação dos experimentos envolvendo amostras de sangue, visto que a recirculação de linfócitos é um processo complexo que envolve um amplo número de células que se movem entre uma variedade de ‘pools’.

Ainda, visto que nem todos os linfócitos no sangue possuem uma probabilidade igual de migração, muitas estimativas prévias da taxa e do grau da recirculação de linfócitos fora do sangue e dentro dos tecidos são provavelmente subestimadas, além do que, dada a importância das mensurações do sangue periférico no contexto clínico, todo cuidado é necessário ao interpretar a contagem de PBL como uma ‘janela’ no sistema imune, especialmente nas condições em que mudanças nas proporções de PBL não são necessariamente refletidas nos tecidos linfóides periféricos (YOUNG *et.al.*, 1997).

Pode-se dizer que o peptídeo SBbo23290 desenvolve uma resposta antígeno específica envolvendo células B, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup>. É importante lembrar que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e WC1<sup>+</sup> também podem apresentar papel citotóxico, sendo um possível motivo para a queda da porcentagem dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

**Tabela 6 - Média da Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	20,61 ( $\pm 3,97$ )	13,89 ( $\pm 10,47$ )	10,33 ( $\pm 1,43$ )	8,56 ( $\pm 0,85$ )	9,55 ( $\pm 1,64$ )
<b>Saponina</b>	14,04 ( $\pm 4,76$ )	12,31 ( $\pm 1,07$ )	10,06 ( $\pm 2,63$ )	8,42 ( $\pm 1,71$ )	9,51 ( $\pm 1,75$ )
<b>Controle</b>	21,30 ( $\pm 4,47$ )	8,02 ( $\pm 2,05$ )	8,20 ( $\pm 2,16$ )	8,40 ( $\pm 2,05$ )	8,28 ( $\pm 1,69$ )

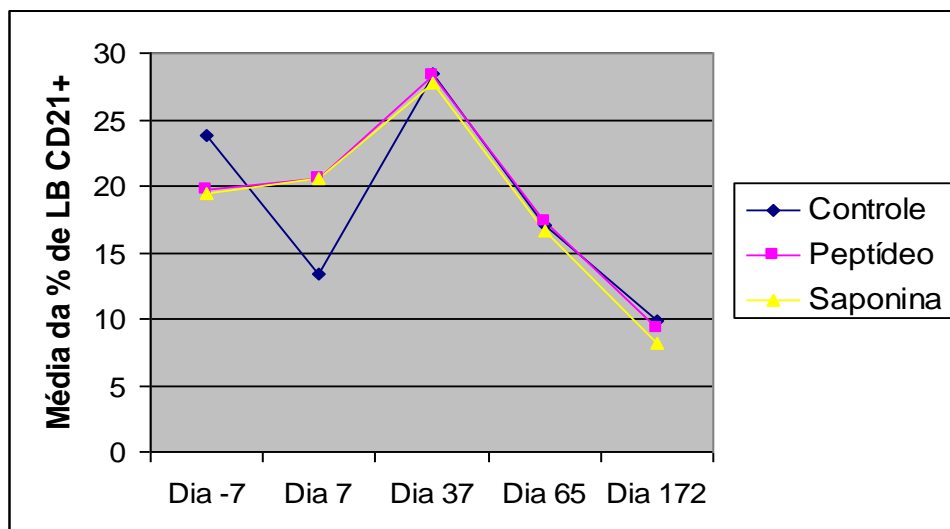
### 5.3.3. Linfócitos periféricos B CD21<sup>+</sup>

A população de LB CD21<sup>+</sup> foi predominante neste estudo, como se pode observar na tabela 7. Aos sete dias após a primeira imunização foi possível observar um grande número de LB CD21<sup>+</sup> (figura 7), com médias que variaram de 13,37 ( $\pm 6,16$ ) no grupo controle, e 20,56 ( $\pm 6,46$ ) no grupo peptídeo. Houve um aumento considerável na porcentagem de LB CD21<sup>+</sup> sete dias após a segunda imunização, sendo que o grupo



peptídeo apresentou média de 28,28 ( $\pm 5,35$ ), o grupo saponina 27,71 ( $\pm 8,63$ ) e o grupo controle 28,50 ( $\pm 2,07$ ). Houve diferença estatística entre as coletas em todos os grupos experimentais, sendo o grupo peptídeo entre a coleta após a segunda imunização e após o desafio ( $p < 0,01$ ); o grupo saponina entre os sete dias após a primeira imunização e após o desafio ( $p < 0,05$ ) e após a segunda imunização e após o desafio ( $p < 0,01$ ); e o grupo controle entre o dia zero e pós-desafio ( $p < 0,05$ ), entre os sete dias após a primeira e a segunda imunização ( $p < 0,05$ ), e entre os sete dias após a segunda imunização e após o desafio ( $p < 0,01$ ).

JARDIM (2005) em conjunto com o presente trabalho observou que a produção de IgG foi superior no grupo peptídeo em relação aos demais grupos durante todo o experimento, havendo diferença estatisticamente significativa entre o grupo imunizado com o peptídeo sintético SBbo23290 e os outros grupos experimentais, não havendo diferença entre o grupo saponina e controle. Sendo assim, foi possível notar que a cinética de resposta ao peptídeo SBbo23290 demonstrada no estudo supracitado apresentou uma curva clássica de resposta de IgG, mostrando uma resposta intensa alcançando a produção máxima entre a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> semana após cada inoculação e declinando em seguida. Além disso, a referida autora concluiu que o peptídeo sintético SBbo23290 induziu elevados níveis de IgG e seus isótipos IgG1 e IgG2, ambos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controles, e a resposta imune humoral foi caracterizada pela predominância de anticorpos antígeno-específicos da classe IgG1. Os fatos anteriores corroboram os achados do presente trabalho, se levarmos em conta a cinética da formação dos centros germinais e a produção de células T e B.



**Figura 7**– Porcentagem de Linfócitos B CD21<sup>+</sup>

Em relação aos linfócitos B CD21<sup>+</sup>, GONZÁLEZ (2004) encontrou porcentagens maiores no grupo controle do que nos animais imunizados, sendo o grupo controle com porcentagens de linfócitos B CD21<sup>+</sup> inferiores a 24,28% enquanto os imunizados obtiveram porcentagens de até 39,51%, o que em parte difere do presente trabalho, visto que no dia 7 o grupo controle apresentou média inferior aos demais grupos experimentais, e nos dias 37, 65 e 172, a média do grupo controle se manteve semelhante à média do grupo peptídeo, e muito próxima do grupo saponina. Neste estudo também foi constatado um aumento gradual na porcentagem de células dos animais imunizados após a primeira imunização. A queda da porcentagem dos linfócitos B CD21<sup>+</sup> neste trabalho coincide com o aumento da população de células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup>, indicando que este tipo celular pode ter sido mais atuante neste período do experimento em relação aos linfócitos B.

No trabalho de BITTAR (2002), notou-se que os linfócitos B CD21<sup>+</sup> dos animais do grupo peptídeo possuíam as menores porcentagens de linfócitos B CD21<sup>+</sup> quando comparados ao grupo saponina e grupo controle. A porcentagem de linfócitos B CD21<sup>+</sup> do grupo peptídeo, no período das imunizações, variou de 14,71 a 17,30 ( $x = 15,23 \pm 1,86$ ), no grupo saponina foi de 14,47 a 16,03 ( $x = 15,03 \pm 8,86$ ) e no grupo controle variou de 20,39 a 17,59 ( $x = 19,51 \pm 1,66$ ), o que difere dos resultados do presente trabalho, pois a porcentagem de LB CD21<sup>+</sup> do grupo peptídeo não foi inferior aos demais grupos em

nenhuma das cinco coletas. Além disso, a referida autora obteve menores porcentagens de LB CD21<sup>+</sup> do que de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, visto que as médias de LB CD21<sup>+</sup> variaram de 14,46 (±4,88) a 20,39 (±10,11) na primeira imunização, de 13,67 (±8,30) a 20,53 (±8,53) na segunda, e de 16,02 (±5,07) a 17,59 (±8,64) na terceira, enquanto neste trabalho, em geral, as médias de LB CD21<sup>+</sup> foram maiores do que as de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>. Neste trabalho os linfócitos B CD21<sup>+</sup> não variaram significativamente em nenhum dos grupos experimentais durante todo o período analisado.

**Tabela 7 - Média da Porcentagem de linfócitos B CD21<sup>+</sup>**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	19,77 (±7,24)	20,56 (±6,46)	28,38 (±5,35)	17,37 (±2,94)	9,24 (±5,47)
<b>Saponina</b>	19,50 (±1,83)	20,55 (±1,45)	27,71 (±8,63)	16,56 (±3,20)	8,18 (±1,92)
<b>Controle</b>	23,86 (±6,43)	13,37 (±6,16)	28,50 (±2,07)	17,07 (±2,12)	9,85 (±3,92)

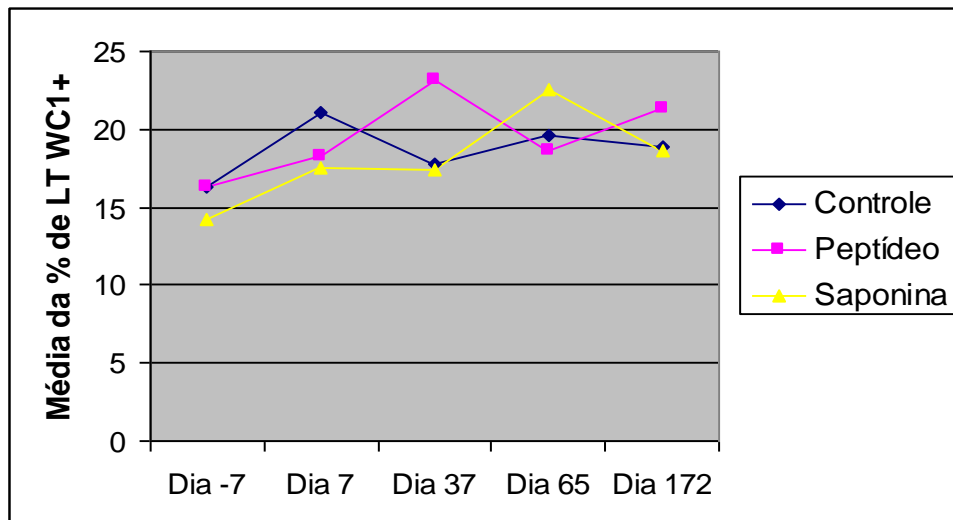
### 5.3.4. Linfócitos periféricos T WC1<sup>+</sup>

A análise dos linfócitos T WC1<sup>+</sup> demonstrou que a média das porcentagens desses linfócitos aumentou desde a pré-imunização até a segunda imunização (figura 8), e se manteve constante até depois do desafio. Na pré-imunização, as médias variaram de 14,25 (±3,53) a 16,32 (±4,53), na primeira imunização variou de 17,48 (±1,36) a 21,08 (±2,37), e na segunda imunização, variou de 17,36 (±0,67) a 23,19 (±2,62). Após a terceira imunização e após o desafio com a cepa virulenta de *B. bovis*, as médias se mantiveram semelhantes, como mostra a tabela 8. Entre as coletas, houve diferença estatística nos grupos peptídeo e saponina; no grupo peptídeo, ocorreu entre o dia zero e após a segunda imunização ( $p < 0,05$ ), e no grupo saponina, entre o dia zero e após a terceira imunização. Visto que o clone utilizado é CD2<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup>, pode-se afirmar que o tipo de célula avaliada foi célula T $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup>. Foi possível notar que o aumento da população de células T $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> coincidiu com a queda de outros tipos celulares.

No trabalho de YOUNG *et.al.* (1997), foi observado que a maioria dos PBLs marcados que migraram dentro da linfa foram as células T  $\gamma\delta$ , sugerindo que este subtipo pode ser particularmente eficiente durante a recirculação de linfócitos, fato este, que pode explicar a porcentagem superior deste subtipo no presente trabalho. Ainda, em ruminantes, as células T  $\gamma\delta$  compreendem a população de principal proporção nas células mononucleares periféricas bovinas, de acordo com KENNEDY *et.al.* (2002).

Em estudo realizado por VALDEZ *et.al.* (2002), observou-se que bezerros timectomizados tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4 foram capazes de controlar uma anaplasnose aguda induzida, em contraste com a predição de que uma depressão significativa de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre os grupos tratados pudesse anular a resistência à uma infecção aguda, o que sugere um possível papel para os linfócitos T $\gamma\delta$  no controle da anaplasnose aguda.

A ativação seletiva das células WC1.1<sup>+</sup>, quando propicia a secreção de IFN- $\gamma$  durante a vacinação, pode promover maneiras de estimular consistentemente respostas imunes tipo 1 e pode ser especialmente útil no desenvolvimento de vacinas para patógenos intra-celulares bacterianos, protozoários e vírus, podendo permitir maneiras de direcionar respostas imunes adaptativas mesmo quando vacinas de subunidade são utilizadas (ROGERS *et.al.*, 2005). Animais WC1<sup>+</sup>-deprimidos exibiram decréscimo da resposta proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, aumento da produção de IL-4 antígeno-específica, e falta de IgG2 específica, sugerindo que células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> contribuem direta ou indiretamente, para polarização Th1 da resposta imune na tuberculose bovina, sendo essa hipótese baseada no decréscimo da produção inata de IFN- $\gamma$  (KENNEDY *et.al.*, 2002).



**Figura 8**– Porcentagem de Linfócitos T WC1<sup>+</sup>

GONZÁLEZ (2003), ao imunizar bovinos com o peptídeo sintético SBm7462, notou que os linfócitos T WC1<sup>+</sup> mostraram variações no decorrer do período, visto que a população aumentou cinco dias após a segunda imunização e diminuiu nos dias subseqüentes se comparados com as porcentagens da pré-imunização, fato não observado no presente estudo, talvez devido à diferença no perfil de resposta entre os dois peptídeos.

Em trabalho com o parasita intracelular *Theileria parva*, foi observado que as células T $\gamma\delta$  bovinas são ativadas pelo parasita e lisam as células infectadas através do reconhecimento induzido pelo parasita ou pelos antígenos derivados do parasita de maneira MHC irrestrita (DAUBENBERGER *et.al.*, 1999), o que também pode explicar a porcentagem superior deste tipo celular em relação aos outros observado no presente estudo, visto que a *B. bovis* também é um parasita intracelular.

Foi observado por KENNEDY *et.al.* (2002) que a depressão das células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> resultou em diferenças evidentes da resposta imune durante o curso da infecção por *M. bovis*; evidenciou-se também que as células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> exercem um papel no direcionamento da resposta celular inicial ao parasita, acompanhando a infecção do hospedeiro natural. A principal observação foi que as células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> são ativadas após a infecção com o aumento das células CD4<sup>+</sup>, e que a depressão imediatamente resultou em

uma menor produção de IFN- $\gamma$ , uma diminuição da resposta proliferativa tardia, aumento de IL-4, e níveis reduzidos de IgG2, o que corrobora os resultados de JARDIM (2005), em estudo conjunto com o presente trabalho, visto que foi observada uma queda de IgG2 e aumento dos níveis de IgG1. Tudo isso sugere que a produção precoce de IFN- $\gamma$  pelas células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup>, possivelmente como parte da resposta imune inata, promove a ativação de linfócitos e influencia a polarização de citocinas, contribuindo para a produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo ser parte do processo que resulta na polarização Th1 com resposta de anticorpo IgG2. Uma outra possibilidade é que as células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> podem influenciar a produção inata de IFN- $\gamma$  através de uma segunda população, como as células NK.

**Tabela 8- Média da Porcentagem de linfócitos T WC1<sup>+</sup>**

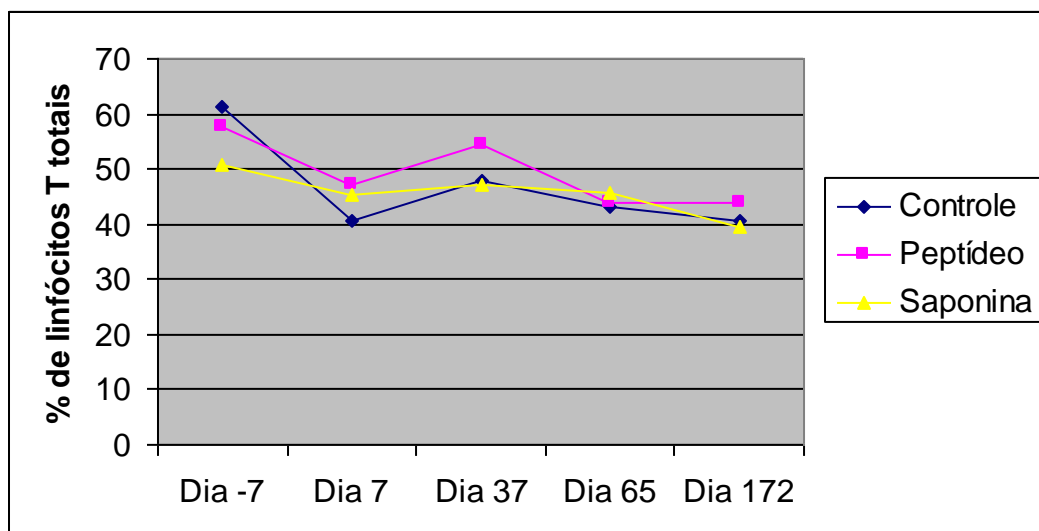
<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	16,27 ( $\pm 2,41$ )	18,27 ( $\pm 4,04$ )	23,19 ( $\pm 2,62$ )	18,61 ( $\pm 1,31$ )	21,35 ( $\pm 1,34$ )
<b>Saponina</b>	14,25 ( $\pm 3,53$ )	17,48 ( $\pm 1,36$ )	17,36 ( $\pm 0,67$ )	22,55 ( $\pm 2,24$ )	18,62 ( $\pm 2,30$ )
<b>Controle</b>	16,32 ( $\pm 4,53$ )	21,08 ( $\pm 2,37$ )	17,71 ( $\pm 4,02$ )	19,62 ( $\pm 2,67$ )	18,92 ( $\pm 5,18$ )

### 5.3.5. Imunofenotipagem dos linfócitos T totais

O percentual dos linfócitos T totais no grupo peptídeo foi maior por quase todo o experimento exceto aos 5 dias após a terceira inoculação, visto que o grupo saponina foi discretamente maior do que os demais. Como pode ser observado na tabela 9, houve um aumento de linfócitos T totais 7 dias após a segunda inoculação, principalmente no grupo peptídeo, havendo um decréscimo desta população 5 dias após a terceira inoculação, e 15

dias após o desafio, no entanto, o grupo peptídeo apresentou um acréscimo quase insignificante após o desafio (figura 9). Não houve diferença estatística entre os grupos.

No trabalho de BITTAR (2002), as porcentagens de células T totais nos grupos experimentais não variou durante o período, sendo as médias do grupo peptídeo, saponina e controle, de 51,37 (0,58); 46,29 (0,92) e 47,52 (0,77) respectivamente. Pode-se observar que os animais pertencentes ao grupo peptídeo possuíam porcentagens de linfócitos T totais maior do que o grupo controle e saponina, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.



**Figura 9**– Porcentagem de Linfócitos T totais

No entanto, no trabalho de GONZÁLEZ (2003), notou-se que os animais imunizados apresentaram porcentagem de linfócitos T totais ligeiramente menores que o grupo controle, diferindo do presente trabalho. Observou-se ainda, que o percentual de células T totais nos grupos experimentais não variou significativamente durante todo o período nos animais imunizados, e nos animais controle os valores oscilaram em média de 54,01 a 60,31% e 58,67 a 63,70% nos animais imunizados e controle, respectivamente. Apesar da referida autora também ter trabalhado com peptídeo sintético, pode-se sugerir

que os dois peptídeos sintéticos em questão (SBm7462 e Sbbo23290) induzam perfis diferentes de resposta imune.

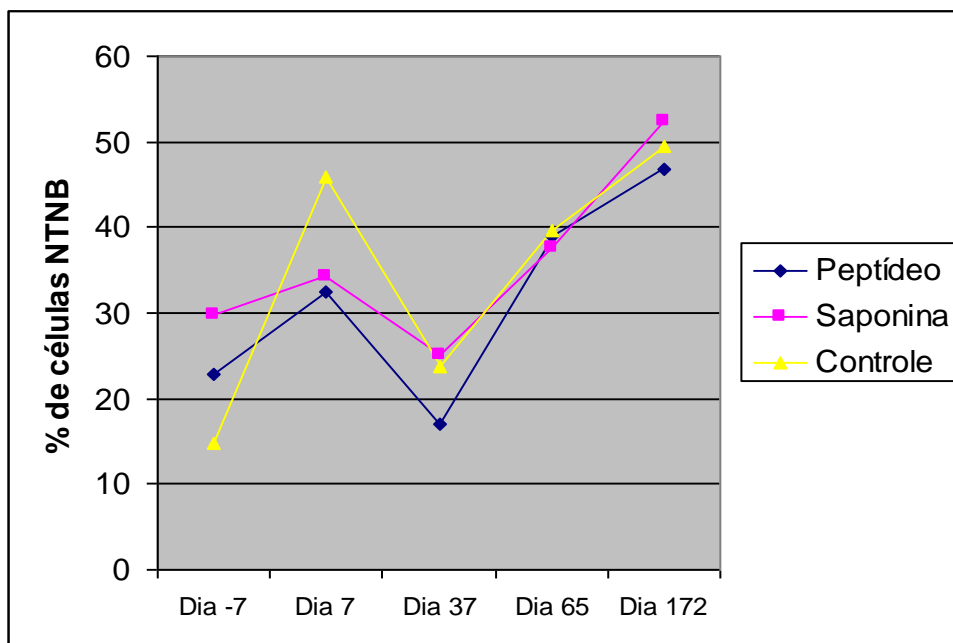
**Tabela 9- Média da Porcentagem de linfócitos T totais**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	57,50 (±5,44)	47,07 (±26,23)	54,56 (±2,89)	43,72 (±3,80)	43,98 (±3,16)
<b>Saponina</b>	50,63 (±3,93)	45,20 (±9,03)	47,20 (±8,63)	45,77 (±8,86)	39,49 (±5,24)
<b>Controle</b>	61,40 (±11,76)	40,66 (±6,19)	47,85 (±7,07)	43,32 (±6,33)	40,68 (±8,14)

### 5.3.6. Imunofenotipagem de células NTNB

Em relação à porcentagem das células NTNB, houve maior porcentagem destas células sete dias após a primeira inoculação e quinze dias após o desafio (Figura 10). Nenhum dos grupos se manteve constantemente com níveis maiores de células NTNB em relação aos demais durante o experimento. A maior porcentagem destas células foi observada após o desafio, sendo que o grupo saponina obteve 52,33 (±11,85), o grupo controle 49,47 (±14,69) e o grupo peptídeo 46,78 (±10,12), o que pode ser observado na tabela 10.





**Figura 10**– Porcentagem de Células NTNB

De acordo com os resultados obtidos por BITTAR (2002), o grupo saponina apresentou porcentagem maior do que os demais grupos durante todo o experimento, o que, em parte corrobora os achados do presente estudo, já que o grupo saponina se manteve com níveis semelhantes ou superiores. Após a primeira imunização, a autora observou porcentagens de 38,25 ( $\pm 7,64$ ) no grupo saponina, (34,57  $\pm 13,33$ ) no grupo peptídeo e (32,97  $\pm 9,47$ ) no grupo controle. Essa média superior do grupo saponina em relação aos demais grupos permaneceu por todo o período de imunização. Após a terceira imunização o grupo peptídeo apresentou uma diminuição da porcentagem das células NTNB (30,90  $\pm 14,33$ ) enquanto o grupo controle apresentou uma elevação no percentual celular (34,54  $\pm 9,85$ ). As variações do percentual celular durante as imunizações e entre os grupos não foram estatisticamente significativas. A cinética das células NTNB no presente trabalho pode ser explicada levando-se em consideração o aumento de outros tipos celulares em circulação, como algumas populações de células T e células B. É importante salientar que no trabalho de BITTAR (2002) foi observada uma porcentagem superior à observada no presente estudo porque neste a população WC1 foi incluída como parte da

população total de linfócitos T, refletindo consequentemente na porcentagem das células consideradas NTNB.

GONZÁLEZ (2003) em seu trabalho com *B. microplus*, notou que houve uma queda de porcentagens de células NTNB nos animais imunizados após a primeira imunização e mantendo-se relativamente igual até a última amostragem, sendo que essa diferença foi mais evidente no dia 35, diferente dos resultados obtidos no presente trabalho. Segundo a autora, estes resultados se devem ao aumento de outros tipos celulares em circulação como as células CD21<sup>+</sup> e algumas outras subpopulações de linfócitos T nos animais imunizados. Os animais controle apresentaram porcentagens superiores em relação aos animais imunizados durante todo o experimento. As porcentagens nos grupos imunizados variaram entre 5,57 ( $\pm 4,44$ ) cinco dias após a segunda imunização e 7,48 ( $\pm 6,46$ ) aos dez dias após a terceira imunização.

**Tabela 10- Média da Porcentagem de células NTNB**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	22,73 ( $\pm 7,56$ )	32,37 ( $\pm 11,86$ )	17,06 ( $\pm 10,48$ )	38,91 ( $\pm 9,97$ )	46,78 ( $\pm 10,12$ )
<b>Saponina</b>	29,87 ( $\pm 9,47$ )	34,25 ( $\pm 9,98$ )	25,09 ( $\pm 8,46$ )	37,67 ( $\pm 12,36$ )	52,33 ( $\pm 11,85$ )
<b>Controle</b>	14,74 ( $\pm 7,63$ )	45,97 ( $\pm 11,12$ )	23,65 ( $\pm 7,96$ )	39,61 ( $\pm 10,75$ )	49,47 ( $\pm 14,69$ )

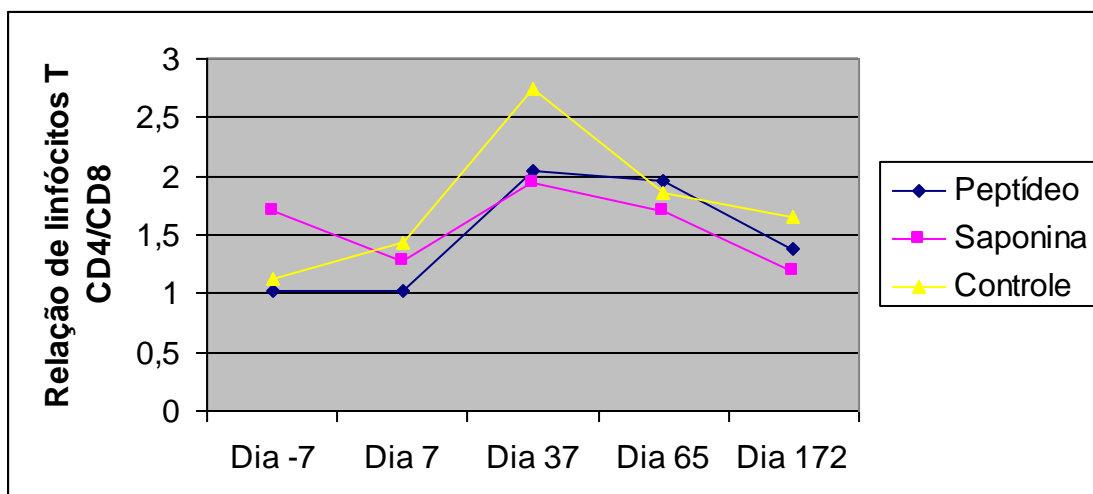
### 5.3.7. Relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

Conforme o esperado, a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> circulantes de bovinos imunizados avaliada em relação à subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> foi menor durante todo o período. O grupo peptídeo obteve as menores relações T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no início do experimento (no dia zero e após a primeira imunização), apresentando a maior média

somente após a terceira imunização (figura 11). O grupo saponina só apresentou média superior em relação aos demais grupos no dia zero, enquanto o grupo controle obteve as maiores médias após a primeira e a segunda imunização, e após o desafio, como mostra o tabela 11. A relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> diferiu estatisticamente somente no grupo peptídeo, entre o dia zero e após a segunda imunização ( $p < 0,05$ ) e entre as coletas após a primeira e a segunda imunização ( $p < 0,05$ ).

Em média, as proporções CD4:CD8 dos animais experimentais foram semelhantes às observadas por outros autores (GONZÁLEZ, 2003; BITTAR, 2002; TUO, 1999; POLLOCK *et. al.* 2001), exceto após a segunda inoculação, quando as porcentagens foram superiores aos trabalhos citados.

No trabalho realizado por BITTAR (2002), o grupo peptídeo apresentou a menor relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> desde a primeira imunização, corroborando os achados do presente trabalho. O grupo saponina ( $1,61 \pm 0,08$ ) apresentou durante maior parte do experimento médias superiores ao grupo peptídeo ( $x = 1,36 \pm 0,07$ ) e grupo controle ( $1,49 \pm 0,13$ ), diferente do presente estudo, visto que o grupo controle apresentou médias superiores na maior parte do experimento. A relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> não diferiu estatisticamente entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11**– Relação entre os linfócitos T CD4 e CD8

Tem-se evidenciado relações CD4/CD8 iguais ou maiores às descritas neste trabalho em animais após infecção experimental com *Micobacterium bovis*, (POLLOCK *et al.*, 2001; RHODES *et al.*, 2000; VANDEN BUSH & ROSENBUSCH, 2003), isto pode de alguma maneira sugerir que o SBbo23290 induz uma resposta no sistema imune com efeitos evidentes sobre a expansão da população CD4<sup>+</sup> mais do que a CD8<sup>+</sup>. De fato, a população CD4<sup>+</sup> é considerada a população mais envolvida nas respostas imunes adquiridas na maioria de antígenos protéicos (RHODES *et al.*, 2000), pois a expansão celular inicial em respostas ao reconhecimento antigênico é principalmente, mediada por uma via de crescimento autócrino gerada a partir das células CD4<sup>+</sup>.

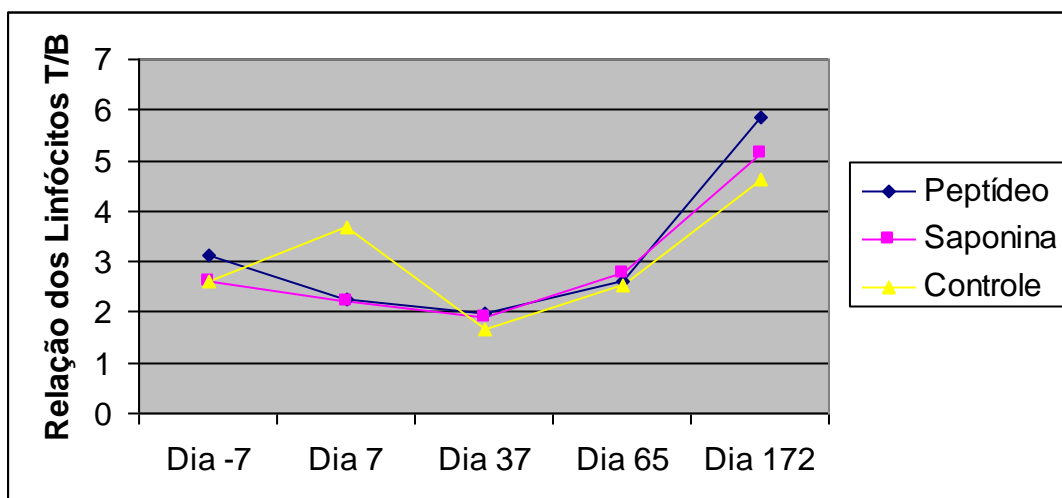
**Tabela 11- Média da Relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	1,00 (±0,41)	1,07 (±0,31)	2,04 (±0,19)	1,93 (±0,64)	1,37 (±0,29)
<b>Saponina</b>	1,59 (±0,56)	1,25 (±0,78)	1,96 (±0,19)	1,76 (±0,44)	1,19 (±0,15)
<b>Controle</b>	1,12 (±0,32)	1,44 (±0,31)	2,67 (±0,50)	1,82 (±0,59)	1,63 (±0,49)

### 5.3.8. Relação entre os linfócitos T e B

A média da relação T/B se manteve muito semelhante entre os grupos durante o experimento (figura 12). As menores médias foram obtidas após a segunda imunização, variando de 1,70 (±0,94) a 1,92 (±0,33) (grupos saponina e peptídeo respectivamente), e as maiores médias foram observadas após o desafio: 4,13 (±1,90) no grupo controle, 4,76 (±2,63) no grupo peptídeo e 4,83 (±2,09) no grupo saponina (tabela 12). Somente os grupos peptídeo e saponina apresentaram diferença estatística entre as coletas, sendo essa diferença notada entre as coletas após a primeira e a segunda imunização ( $p < 0,05$ ), e entre

a coleta após a segunda imunização e após o desafio ( $p<0,05$  para o grupo saponina, e  $p<0,01$  para o grupo peptídeo). A média da relação T/B foi maior no grupo peptídeo durante as duas primeiras imunizações no trabalho de BITTAR (2002), porém na terceira imunização essa relação diminuiu, mas não significativamente. Os grupos controle e saponina permaneceram com médias inferiores às do grupo imunizado durante todo o processo de imunização, o que difere dos achados do presente estudo.



**Figura 12**– Relação entre os linfócitos T e B

Foi evidenciada por GONZÁLEZ (2003) uma discreta diminuição da relação T/B nos animais imunizados ao longo do experimento e uma notável diferença quando comparada com os animais controle, o que difere do presente trabalho. Além disso, a média da relação T/B foi menor desde o começo do experimento nos animais imunizados do que nos controles, não havendo nenhuma variabilidade durante todo o período, o que indica que houve um movimento diferente nas populações T/B somente nos animais imunizados, o que não aconteceu no presente trabalho, visto que a relação T/B se manteve muito semelhante entre os grupos experimentais durante quase todo o experimento. No entanto o presente trabalho corrobora os resultados de GONZÁLEZ (2003) e BITTAR (2002) no que diz respeito à estatística, visto que em ambos estudos foi observado que não houve diferença estatística significativa entre os grupos durante os experimentos. Pode-se

dizer que a resposta frente ao peptídeo SBbo23290 induz uma resposta caracterizada pela produção superior de linfócitos T em relação aos linfócitos B, resposta essa, que se manteve constante entre os grupos.

**Tabela 12- Média da Relação entre os linfócitos T e B**

<i>Grupo</i>	<b>Dia -7</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 37</b>	<b>Dia 65</b>	<b>Dia 172</b>
<b>Peptídeo</b>	2,91 ( $\pm 0,79$ )	2,29 ( $\pm 0,78$ )	1,92 ( $\pm 0,33$ )	2,52 ( $\pm 0,69$ )	4,76 ( $\pm 2,63$ )
<b>Saponina</b>	2,60 ( $\pm 0,36$ )	2,20 ( $\pm 0,41$ )	1,70 ( $\pm 0,94$ )	2,76 ( $\pm 0,41$ )	4,83 ( $\pm 2,09$ )
<b>Controle</b>	2,57 ( $\pm 0,41$ )	3,04 ( $\pm 2,20$ )	1,68 ( $\pm 0,24$ )	2,54 ( $\pm 0,28$ )	4,13 ( $\pm 1,90$ )

Encontra-se disposto na tabela 13 um resumo com todos os resultados obtidos através da técnica de imunofenotipagem.

**Tabela 13- Impacto diferencial entre as coletas de PBL**

<i>GRUPO</i>	Dia -7	Dia 7	Dia 37	Dia 65	Dia 172
<b>Peptídeo</b>		CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↑ WC1: ↑ T/B: ↓ CD4/CD8: ↑ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↑ CD8: ↓ CD21: ↑ WC1: ↑ T/B: ↓ CD4/CD8: ↑ T tot.: ↑ NTNB: ↓	CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↓ WC1: ↓ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↓ CD8: ↑ CD21: ↓ WC1: ↑ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↑ NTNB: ↑
<b>Saponina</b>		CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↑ WC1: ↑ T/B: ↓ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↑ CD8: ↓ CD21: ↑ WC1: ↓ T/B: ↓ CD4/CD8: ↑ T tot.: ↑ NTNB: ↓	CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↓ WC1: ↑ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↓ CD8: ↑ CD21: ↓ WC1: ↓ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑
<b>Controle</b>		CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↓ WC1: ↑ T/B: ↑ CD4/CD8: ↑ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↑ CD8: ↑ CD21: ↑ WC1: ↓ T/B: ↓ CD4/CD8: ↑ T tot.: ↑ NTNB: ↓	CD4: ↓ CD8: ↑ CD21: ↓ WC1: ↑ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑	CD4: ↓ CD8: ↓ CD21: ↓ WC1: ↓ T/B: ↑ CD4/CD8: ↓ T tot.: ↓ NTNB: ↑

## 6. CONCLUSÕES

- O peptídeo sintético SBbo23290 utilizando saponina como adjuvante foi eficaz, estimulando a resposta imune dos bovinos imunizados e submetidos ao desafio com a amostra virulenta de *Babesia bovis*.
- Os animais imunizados com o peptídeo SBbo23290 desenvolveram uma resposta imune que promoveu mudanças nas populações circulantes de linfócitos T CD4 e T $\gamma\delta$  e B CD21.
- A resposta imune induzida pelo SBbo23290 nos tecidos linfóides demonstrou formação típica de estruturas que conferiram especificidade e memória após as inoculações.
- Foi demonstrado através da imunohistoquímica que o peptídeo em questão é eficientemente apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) às células T CD4<sup>+</sup>, induzindo uma resposta T-dependente e de memória.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J.S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmosis. **Parasitol. Res.**, 2002, 88: 48-50.

ALARCÓN, G.J.C.; RAMÍREZ, E.E.R.; MARTÍNEZ, J.A.A.; ARAGÓN, J.A.R.; GUALITO, J.J.M.; VEGA Y MURGUÍA, C.A.; MILLÁN, J.V.F. Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* en una confrontación de campo. II Imunización en una área endêmica. **Téc. Pecu. Méx.**, 2003, 41 (3): 307-315.

APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T cells: the holy grail? **Clin. Exp. Immunol.**, 2004, 138: 10-13.

BABES, V. Sur l'hémoglobinurie du bouf. **C. R. Acad. Sci.**, 1888, 107: 692-694.

BARREIRA, J.D.; DORIA ROSSI, M.I.; SILVA, G.V.O.; PIRES, F.A.; MASSARD, C.L. Avaliação clínico-parasitológica de *Meriones unguiculatus* frente à infecção experimental com amostras modificadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2004, 13 (1): 230.

BENSAID, A.; HADAM, M. Bovine Cd4 (BoCD4). **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, 1991, 27: 51-54.

BITTAR, J.F.F. **Vacinação experimental de bovinos com o peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*: Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral.** Dissertação (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG, 88p, 2002.

BOCK, R.E.; DE VOS, A.J.; KINGSTON, T.G.; SHIELS, I.A.; DALGLIESH, R.J. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. **Vet. Parasitol.**, 1992, 43 (1-2): 45-56.

BOCK, R.E.; KINGSTONE, T.G.; DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, 1999, 77 (7): 461-464.

BOMFIM, T.C.B.; HUBER, F.; GOMES, R.S.; FORLANO, M.D.; MASSARD, C.L. Influência da infecção por *Babesia* sp. em vacas, sobre o peso ao nascer de bezerros da raça Jersey. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2004, 13 (1): 230.

BOUSSO, P. KOURILSKY, P. A clonal view of  $\alpha\beta$  T cell responses. **Semin. Immunol.**, 1999, 11: 423-431.

BROWN, W.C.; LOGAN, K.S.; ZHAO, S.; BERGMAN, D.K.; RICE-FICHT, A.C. Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous-flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper Tcell clones derived from *B. bovis*. Immune Cattle. **Infect. Immun.**, 1995, 63: 3106-3116.

BROWN, W.C., DAVIS, W.C., TUO, W. Human IL-12 upregulates proliferation and IFN- $\gamma$  production by parasite antigen-stimulated Th cell clones and g/d T cell of cattle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1996, 795: 321-324.

BROWN, W.C., RICE-FICHT, A.C., ESTES, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 1998, 63: 45-55.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* e *B. bigemina*. **Parasitol. Today**, 1999, 15 (7): 275-280.

BROWN, W.C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune response to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. **Vet. Parasitol.**, 2001, 101: 233-248.

BUSHELL, G.; GARRONE, B.; GOODGER, B.; WRIGHT, I.; DALRYMPLE, B.P. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **Inst. J. Parasitol.**, 1991, 21 (5): 609-611.

BUTCHER, E.C.; PICKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science.**, 1996, 272: 60-67.

CAETANO, B.C. **Estudos de citoaderência “in vitro” de eritrócitos de bovinos inoculados com *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893) em células endoteliais de aorta bovina.** Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 76 p., 2001.

CALLOW, L.L.; MELLORS, L.T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. **Aust. Vet. J.**, 1966, 42: 464-465.

CALLOW, L.L.; MELLORS, L.J.; MCGREGOR, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomised calves. **Int. J. Parasitol.**, 1979, 9: 333-338.

CALLOW, L.L.; DALGLIESH, R. J.; DE VOS, A.J. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis – the longest field trial? **Int. J. Parasitol.**, 1997, 27 (7): 747-767.

CAMACHO SA, KOSCO-VILBOIS MH, BEREK C. The dynamic structure of the germinal center. **Immunol. Today.**, 1998, 1 (11): 511-4.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson.** São Paulo: Ed. Artmed, 308p, 1998.

CERWENKA, A.; MORGAN, T.M.; HARMSSEN, A.G.; DUTTON, R.W. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. **Exp. Med.**, 1999, 189 (2): 423-434.

COLLINS RA, WERLING D, DUGGAN SE, BLAND AP, PARSONS KR, HOWARD Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells. **J Leukoc Biol.**, 1998, 63 (6): 707-714.

COURT, R.A.; JACKSON, L.A.; LEE, R.P. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. **Int J. Parasitol.**, 2001, 31: 29-37.

COX F.E. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, 1997, 27: 1147-1157.

DAUBENBERGER, C.A.; TARACHA, E.L.N.; GAIDULIS, L.; DAVIS, W.C.; McKEEVER, D.J. Bovine  $\gamma\delta$  T-cell Responses to the Intracellular Protozoan Parasite *Theileria parva*. **Infect. and Immun.**, 1999, 67 (5): 2241-2249.

DEBES, G.F.; ARNOLD, C.N.; YOUNG, A.J.; KRAUTWALD, S.; LIPP, M.; HAY, J.B.; BUTCHER, E.C. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. **Nature Immunology.**, 2005, 6 (9): 889-894.

DE VOS, A.J.; BOCK, R.C. Vaccination against bovine babesiosis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 2000, 916: 540-545.

DIMMOCK C. K.; BELL K. Haemolytic disease of the newborn in calves. **Aust. Vet. J.**, 1970, 46: 44-47.

ELLIS, S. The cattle major histocompatibility complex: is it unique? **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, 2004, 102: 1-8.

FIGUEROA, J.V.; BUENING, G. M. *In vitro* inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. **J. Clin.Microbiol.**, 1991, 29: 997-1003.

FIKRI, Y.; NYABENDA, J.; DENIS, M.; PASTORET, P.P. Purification and characterisation of bovine WC1+  $\gamma\delta$  T lymphocytes from peripheral blood. **Vet. Res.**, 2000, 31: 229-239.

FLYNN, S.; TOELLNER, K.M.; RAYKUNDALIA, C.; GOODALL, M.; LANE, P. CD4 Cell cytokine differentiation: The B Cell activation molecule, OX40 ligand, Instructs CD4 T Cell to express interleukin 4 and Upregulates Expression of the Chemokine Receptor, Blr-1. **J. Exp. Med.**, 1998, 188 (2):297-304.

FRANSSEN, F.F.J.; GAFFAR, F.R.; YATSUDA, A.P.; VRIES, E. Characterisation of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing. **Microbes and Infection.**, 2003, 5: 365–372.

FREITAS, C.M.B. **Avaliação da resposta imune de bovinos, inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893).** Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 105 p, 2001.

GAFFAR, F.R. **Invasion of erythrocytes by *Babesia bovis***. Dissertação (Pós-Doutorado). Utrecht: Universiteit Utrecht, 124 p, 2004.

GRAU, G.E.; PIQUET, P.F.; VASSALI, P.; LAMBERT, P.H. Tumor necrosis factor and other cytokines in malaria: experimental and clinical data. **Immunol. Rev.**, 1989, 112: 49-70.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; TUO, W.; VALDEZ, R.A. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunol.**, 2001, 23: 463-471.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; ELSASSER, T.H.; DAVIS, W.C.; VALDEZ, R.A. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, 2002, 84: 237-251.

GONZÁLEZ, C.Z.L. **Controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm 7462**. Dissertação (Mestrado). Belo Horizonte: UFMG, 74 p, 2003.

GRAY D, SIEPMANN K, VAN ESSEN D, POUDRIER J, WYKES M, JAINANDUNSING S, BERGTHORSDOTTIR S, DULLFORCE P. B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. **Immunol Rev.**, 1996, 150: 45-61.

GULBRANSON-JUDGE, A.; MacLENNAN, I. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome C. **Eur. J. Immunol.**, 1996, 26: 1830-1837.

GULBRANSON-JUDGE, A., CASAMAYOR-PALLEJA, M., MacLENNAN, I.C.M. Mutually dependent T and B cell responses in germinal centers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1997, 815: 199-210.

HAN, S., ZHENG, B., TAKAHASHI, Y., KELSOE, G. Distinctive characteristics of germinal center B cells. **Semin. Immunol.**, 1997, 9: 255-260.

HAY, J.B.; ANDRADE, W.N. Lymphocyte recirculation, exercise, and immune Responses. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 1998, 76: 490-[496](#).

HERMOSILLA, C.; BURGER, H.; ZAHNER, H.T. T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. **Vet. Parasitol.**, 1999, 84 (1-2): 49-64.

HERNÁNDEZ, M.X.S. **Fisiopatologia da *Babesia bovis*: Moléculas de Adesão expressadas em células endoteliais (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e Trombospondina)**. Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 97p, 2002.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2000, 13 (03): 451-469.

HOWARD, C.J.; COLLINS, R.A.; SOPP, P.; BROOKE, G.P.; KWONG, L.S.; PARSONS, K.R.; WEYNANTS, V.; LETESSON, J.-J.; BEMBRIDGE, G.P. T-cell responses and the influence of dendritic cells in cattle. **Adv. Vet. Med.**, 1999, 41: 275-288.

JACOB, J., KASSIR, R., KELSOE, G. *In situ* studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. **J. Exp. Med.**, 1991, 173: 1165-1175.

JAMES, M. A. Immunology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, p.119-130, 1988.

JARDIM, L.F.B., M.S.. **Avaliação de alguns parâmetros clínicos em bovinos inoculados com o imunógeno sintético SBbo 23290 e desafiados com amostra virulenta de *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1893)**. Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 60p, 2005.

KELSOE, G. *In situ* studies of the germinal center reaction. **Adv. Immunol.**, 1995, 60: 267-288.

KENNEDY, H.E.; WELSH, M.D.; BRYSON, D.G.; CASSIDY, J.P.; FORSTER, F.I.; HOWARD, C.J.; COLLINS, R.A.; POLLOCK, J.M. Modulation of Immune Responses to *Mycobacterium bovis* in Cattle Depleted of WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T Cells. **Infect. and Immun.**, 2002, 70 (3): 1488-1500.

KENNETH, G.C.S., AMANDA, L., NOSSAL, G.J.V., TARLINTON, D.M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, 1997, 16 (11): 2996-3006.

KESSLER, R.H. *et al.* Tristeza parasitária dos bovinos. In: EMBRAPA. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite.** Brasília, 2000.

KJEMTRUP, A.M.; CONRAD, P.A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. **Intern. J. for Parasitol.**, 2000, 30: 1323-1337.

KLONOWSKI, K.D.; WILLIAMS, K.J.; MARZO, A.L.; BLAIR, D.A.; LINGENHELD, E.G.; LEFRANÇOIS, L. Dynamics of Blood-Borne CD8 Memory T Cell Migration In Vivo. **Immunity.**, 2004, 20: 551-562.

LANE P, BURDET C, HUBELE S, SCHEIDEGGER D, MULLER U, MCCONNELL F, KOSCO-VILBOIS M.B. Cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T cells. **J Exp Med.**, 1994, 179 (3): 819-30.

LESLIE, D.S.; VINCENT, M.S.; SPADA, F.M.; DAS, H.; SUGITA, M.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. **Exp Med.**, 2002, 1969 (12): 1575-1584.

LEVINE, N.D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man.** 2.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 406 p, 1973.

LEVY, M.G.; RISTIC, M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. **Science.**, 1980, 207: 1218-1220.

LIU, Y-J., JOHNSON, G D., GORDON, J. AND MACLENNAN, I. C.M. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. **Immunol Today.**, 1992, 13: 17-21.

MACHADO, R.Z.; VALADÃO, C.A.A.; COSTA, M.T.; ANDRADE, G.M.; ALESSI, A.C.; SUEIRO, A.R. Cellular immune response in cattle after experimental immunization with *Babesia bigemina* purified rhoptries. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2004, 13 (1): 230.

MacLENNAN M I C. Germinal Centers. **Ann Rev Immunol.**, 1994, 12: 117-139.

MADRUGA, C.R. Triste fim. **Revista Produtor Parmalat**, p. 13-16, jan. 2003.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: WELLS, E.A. ed. **Workshop on Hemoparasites (anaplasmosis and babesiosis)**. Cali, Colombia, CIAT. p. 49-62, 1975.

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G. *Babesia argentina* immunization of cattle with a killed antigen against infection with heterologous strain. **Vet. Parasitol**, 1976, 2: 273-282.

MATSUMOTO M, LO SF, CARRUTHERS CJ, MIN J, MARIATHASAN S, HUANG G, PLAS DR, MARTIN SM, GEHA RS, NAHM MH, CHAPLIN DD. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. **Nature**, 1996, 382: 462-466.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KRIER, P. J., **Babesiosis**. New York: Academic Press, p.1-24, 1981.

McELWAIN, T.F. et al. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1991, 47: 213-222.

McHEYZER-WILLIAMS, M.G. B cells as effectors. **Curr. Opin. in Immunol.**, 2003, 15: 354-361.

MEHLHORN, H.; SHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Adv. Parasitol.**, 1984, 23: 37-103.

MORRISON, W.I.; LALOR, P.A.; CHRISTENSEN, A.K. e WEBSTER, P. Cellular constituents and structural organization of bovine thymus and lymph node. In: **The ruminant immune system in health and disease** (Morrison, W.I.), Cambridge University, 1986.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature**, 2002, 2: 933-944.



NARI, A. Methods currently used for the control of one-host ticks: their validity and proposals for future control strategies. **Parasitologia.**, 1990, 32: 133-143.

NEURATH, A. R., KENT, S. B. H. Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur.Virol.**, 1986, 137E: 513-514.

NEVILS, M.A.; FIGUEROA, J.V.; TURK, J.R.; CANTO, G.J.; LE, V.; ELLERSIECK, M.R.; CARSON, C.A. Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. **Parasitol. Res.**, 2000, 86: 437-443.

NEW, D.L.; QUIM, J.B.; QUERESHI, M.Z.; SIGLER, S.J. Vertically transmitted babesiosis. **J. Pediat.**, 1997, 131: 163-164.

NORIMINE, J.;SUAREZ, C.E.; McELWAIN, T.F.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; BROWN, W.C. Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* Rhoptry-Associated Protein 1 that elicit memory CD4<sup>+</sup> T lymphocyte responses in *Babesia bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. **Infect. and Immunity**, 2002, 70 (4): 2039-2048.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; ARAUJO JR, J.P. AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **Internat. J. for Parasitol.**, 2005, 35: 105-111.

PALMER, G. H. et al. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface exposed epitopes. **Infect. Immunol.**, 1991, 59: 3340-3342.

PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Vet. Parasitol.**, 1995, 57: 233-253.

PARK, Y.H.; YOO, H.S.; YOON, J.W.; YANG, S.J.; NA, J.S.; DAVIS, W.C. Phenotypic and functional analysis of bovine  $\gamma\delta$  lymphocytes. **J. Vet. Sci.**, 2000, 1 (1): 39-48.

PATARROYO, J.H. Seminário nacional sobre parasitoses dos bovinos. **Anais...** Campo Grande – EMBRAPA/CNPQC, p.299, 1979.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Vet. Parasitol.**, 1982, 11: 301-308.

PATARROYO, J.H.; PRATES, A.A.; TAVARES, C.A.P.; MAFRA, C.L. Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as vaccine against bovine babesiosis. **Vet. Parasitol.**, 1995a, 59: 189-199.

PATARROYO, J.H.; MAFRA, C.L.; SEIXAS, P.B.; SAMMARCO, P.; PRATES, A.A.; GUZMAN, F.; PEREIRA, R.W. Peptídeos sintéticos como vacinas para o controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) In: Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinaria., 9, 1995, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBPV, 95p., 1995b.

PATARROYO, J.H.S. *et al.* Mapeamento de epítomos T reativos da proteína Bv60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinaria., 9, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: [s.n.]. p. 197, 1999a.

PATARROYO, J.H., CAETANO, B.C., MARCELINO, F.C., KILGER, G.U. Modelo “in vitro” de adesão em células endoteliais de eritrócitos e leucócitos de bovinos infectados com *Babesia bovis*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11. **Anais...** Salvador, Brasil, 1999b.

PATARROYO, J.H.; GONZÁLEZ, C.Z.L. Resposta imune a vacinas sintéticas anti *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2004, 113 (1): 129-134.

PATARROYO, J.H. & GUZMAN, F. Vacinas de oligopeptídeos. In: ALMEIDA, M.R.; BORÉM, A.; FRANCO, G.R. (Ed). **Biotecnologia e Saúde**. Ed. Folha de Viçosa Ltda. p. 113-139, 2004.

POLLOCK, J.M.; McNAIR J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**., 2001, 81 (1-2): 103-172.

POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D. The WC1+  $\gamma\delta$  T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 2002, 89: 105-114.

RAMÍREZ-CRUZ, G.T.; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J.L.; SIERRA, E.M. La inmunización contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* como método de control de la babesiosis bovina. **Rev. Biomed.**, 1997, 8: 240-246.

REARDON, M.J.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Patol.**, 1981, 18:48-61.

RESENDE M.D. **Resposta celular em linfonodos de bovinos inoculados com *Anaplasma marginale***. Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 60 p, 2003.

RHODES, S.G.; BUDDLE, B.M.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. **Immunol.**, 2000, 99 (2): 195-202.

RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Flórida: CRC Press, 1988. 255 p.

ROGERS, A.N.; VANBUREN, D.G.; HEDBLUM, E.; TILAHUN, M.E.; TELFER, J.C.; BALDWIN, C.L. Function of ruminant  $\gamma\delta$  T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, 2005, 108: 211–217.

SAKAMOTO T, CABRERA PA. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. **Acta Trop.**, 2003, 85 (2): 271-279.

SALES JÚNIOR, P.A. **Utilização de Microesferas Biodegradáveis PLGA como Sistema de Liberação para a Vacina Sintética SBm7462 no Controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): Modelo Experimental em Camundongos**. Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 77 p, 2003.

SAM-YELLOWE, T.Y. Rhoptry organelles of apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitol. Today.**, 1996, 12: 308-315.

SECORD, E.A.; RIZZO, L.V.; BARROSO, E.W.S.; UMETSU, D.T.; THORBECKE, G.J.; DeKRUYFF, R.H. Reconstitution of Germinal Center Formation in Nude Mice with Th1 and Th2 clones. **Cell. Immunol.**, 1996, 174: 173-179.

SKUCE, P.J.; MALLON, T.R.; TAYLOR, S.M. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1996, 77: 99-102.

SILVA, N.R.S. Tristeza parasitária bovina: babesiose e anaplasmoses. **Hora Vet.**, 1981, 1: 28-36.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. USDA **Bur. Anim. Ind. Bull.**, 1893, 1:267-269.

SMITH KG, LIGHT A, NOSSAL GJ, TARLINTON DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, 1997, 16 (11): 2996-3006.

SOARES, C.; SOUZA, J.C.P.; MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, 2000, 20 (2): 75-79.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C.R.; CUNHA, N.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bigenina* em bovinos na mesorregião Norte-Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, 2000, 20 (1): 26-30.

STICH, R., SHODA, L., DREEWES, M., ADLER, B., JUNGI, T., BROWN, W. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Am. Soci. Microbiol.**, 1998, 66 (9): 4130-4136.

SUAREZ, C.E., *et al.* Characterisation of the gene encoding a 60 kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 1991, 46: 45-52.

SUAREZ, C.E.; PALMER, G.H.; HINES, S.A., McELWAIN, T.F. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. **Infect. Immun.**, 1993, 61 (8): 3511-3517.

TARLINTON, D. Germinal centers: form and function. **Curr. Opinion Immunol.**, 1998, 10: 245-251.

TOELLNER, K.M.; LUTHER, S.A.; SZE, D.M.Y.; CHOY, R.K.W.; TAYLOR, D.R.; MacLENNAN, I.C.M.; ACHA-ORBEA, H. T helper 1 (Th1) and Th2 Characteristics start to develop during T Cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. **J. Exp. Med.**, 1998, 187 (8): 1193-1204.

TUO, W.; BAZER, F.W.; DAVIS, W.C.; ZHU, D.; BROWN, W.C. Differential effects of type I IFNs on the growth of WC1- CD8+  $\gamma\delta$  T cells and WC1+ CD8-  $\gamma\delta$  T cells *in vitro*. **The Journal of Immunology.**, 1999, 162: 245-253.

TYZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. São Paulo: Ed. Roca, 545 p., 1998.

VALDEZ, R.A.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; JORDAN, J.M.; KNOWLES, D.P. Selective In Vivo Depletion of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes with Anti-CD4 Monoclonal Antibody during Acute Infection of Calves with *Anaplasma marginale*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 2002, 9 (2): 417-424.

VALEIRÓN, C.R. Autoanticuerpos contra globulos rojos em Hemoparasitosis. **Gaceta de Ciências Veterinárias.**, 1998, 4 (1): 17-35.

VANDEN BUSH, T.J.; ROSENBUSCH, R.F. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 2003, 94 (1-2): 23-33.

VESOSKY, B.; TURNER, O.C.; TURNER, J.; ORME, I.M. Activation marker expression on bovine peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells during post-natal development and following vaccination with a commercial polyvalent viral vaccine. **Developmental and Comparative Immunology.**, 2003, 27: 439-447.

VON ANDRIAN, U.H.; MEMPEL, T.R. Homing and Cellular Traffic in Lymph Nodes. **Immunology.**, 2003, 3: 867-878.

WELSH MD, KENNEDY HE, SMYTH AJ, GIRVIN RM, ANDERSEN P. Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. **Infect Immun.**, 2002, 70 (11): 6114-20.

WRIGHT, I.G. Biochemical characteristic of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: KREIER, J.P.; RISTIC, M. (eds) **Babesiosis**. New York Academic Press, p. 171-206, 1981.

WRIGHT, I.G.; CASU, R.; COMMINS, M.A.; DALRYMPLE, B.P.; GALE, K.R.; GOODGER, B.V.; RIDDLES, P.W.; WALTISBUHI, D.J.; ABETZ, I.; BERRIE, D.A. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. **Vet. Parasitol.**, 1992, 44 (1-2): 3-13.

YOSHINARI, N.H.; ABRÃO, M.G.; BONOLDI, V.L.N.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Coexistence of antibodies to Tick-borne agents os babesiosis and Lyme Borreliosis in patients from Cotia, São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 2003, 98 (3): 311-318.

YOUNG, A.J.; MARSTON, W.L.; DESSING, M.; DUDLER, L.; HEIN, W.R. Distinct Recirculating and Non-Recirculating B-Lymphocyte Pools in the Peripheral Blood Are Defined by Coordinated Expression of CD21 and L-Selectin. **Blood.**, 1997, 90 (12): 4865-4875.

ZAUGG, L.J. Babesiose. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. Ed. Manole, v.2, p.1080-1084, 1993.

ZHENG, B., HAN, S., ZHU, Q., GOLDSBY, R., KELSOE, G. Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. **Nature.**, 1996, 384: 263-266.

ZINTL, A.; GRAY, J.S.; SKERRETT, H.E.; MULCAHY, G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunol.**, 2005, 27: 115-120.