

JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR

Trecho de  
Bittar  
2002



**VACINAÇÃO EXPERIMENTAL DE BOVINOS COM PEPTÍDEO SINTÉTICO DE RAP-1 DE  
*Babesia bovis*: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS  
COM ÊNFASE NA IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2002

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
20/01/03

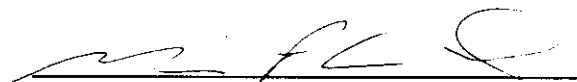
102693-05


B624v  
2002

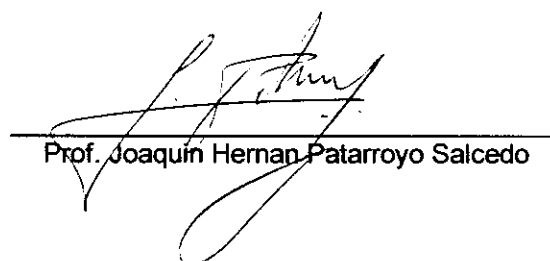
Bittar, Joely Ferreira Figueiredo, 1971-  
Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de  
RAP-1 de Babesia bovis. Avaliação de parâmetros parasitológicos e  
imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral / \ Joely  
Ferreira Figueiredo Bittar . - Belo Horizonte : UFMG-Escola de  
Veterinária, 2002.  
90p. : il.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola  
de Veterinária  
1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Babesiose em bovinos –  
Vacina – Teses. 3. Imunidade celular – Teses. 4. Imunologia – Teses.  
I. Título.

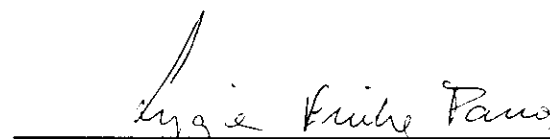
CDD – 636.208 96

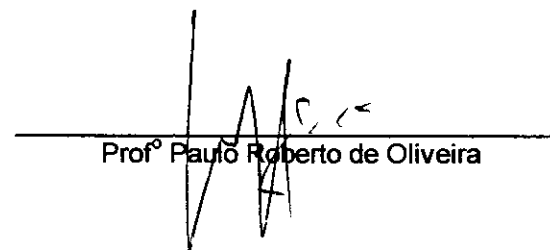
Dissertação defendida e aprovada em 23 de agosto de 2002 pela comissão examinadora constituída por:

  
Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro  
Orientador

  
Prof. Olindo Assis Martins Filho

  
Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo

  
Prof.ª Lygia Maria Friche Passos

  
Prof.º Paulo Roberto de Oliveira



*Ao querido Eustáquio  
por ser minha vida e minha alegria*



## AGRADECIMENTOS

A *Deus* que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, principalmente nas horas que mais precisava e sempre colocou pessoas boas no meu caminho para me apoiar e ajudar neste percurso.

Ao Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro pela confiança em meu trabalho e contribuição na minha carreira profissional;

Ao Dr. Olindo Assis Martins-Filho que além da colaboração profissional para a realização deste trabalho mostrou ser um grande amigo;

À Dra. Silvana Elói pela amizade e pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho;

Ao Dr Rodrigo Corrêa Oliveira pela colaboração ao disponibilizar o uso do seu laboratório;

Ao Prof. Joaquim H. Patarroyo Salcedo, pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho e pelas valiosas sugestões nesse trabalho;

À Prof Lygia Maria Friche Passos que primeiro me deu oportunidade no campo da pesquisa e pela colaboração neste trabalho;

À amizade e companheirismo de Ana Paula Vieira Marciano durante toda a realização deste trabalho;

Aos amigos Márcio e Daniela da UFV pela inestimável contribuição na realização deste trabalho;

Ao João, José Carlos, Cauzinho e Waldir por toda a colaboração e cuidados nos tratamentos com os animais no isolamento;

Aos amigos do laboratório de Doenças de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou Vanessa, Roberta, Flávia, Ana Paula, Danielle, Renato, Josi, Gustavo, Ricardo, Xênia, Bia, pela amizade, agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de Doenças de Imunologia do Centro de Pesquisa René Rachou, Clari, Tiza, Ariane, Vanessa, Andréa, Luciana, Isabella pela amizade;

Aos Amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas do Departamento de Bioquímica da UFMG: Marcelo Santoro, Marcelo Benquerer, Jamil, Vandertei, Thiago, Ellen, Jaqueline, Malu, Alexandre, Leo, Janete, Maria Cristina pela convivência e por propiciar momentos alegres;

A Tatiana pela amizade, dedicação, compromisso com a medicina veterinária e pela colaboração que tornou este trabalho possível de ser realizado;

A Mercês e Marianna pela amizade, alegria e solidariedade nos momentos de dificuldade;

Aos amigos Neide e Rodrigo pela convivência e apoio nos momentos difíceis;

Aos amigos Wanny, Carlos, Patrícia e Glorinha, pela amizade e apoio nos momentos difíceis

Aos Amigos de Belo Horizonte, Aparecida, Herbert, Felipe, Júnior e Maria Luíza, Dizinha, Wellington, Camila e Rafael, Eunice, Djavan, Lucas e Leandro e ao Gustavo, pelos excelentes momentos.

Aos amigos Margô, Eustáquio, Daniel, Érika e Thiago, que muito nos ajudaram e nos ensinaram a tornar nossas vidas cada vez melhor e mais alegres;

Aos meus cunhados, Ricardo e Jairo pela amizade, exemplo e pelos bons momentos;

À minha família, meus pais *Joaquim e Elisa* e minhas irmãs *Jonisy e Josely*, que sempre me incentivaram a conquistar novos horizontes, por sempre estarem ao meu lado me amparando nos momentos mais difíceis e por me fazer tão feliz. A vocês agradeço por tudo que sou;

À D Marilda, Elias, Mario, Cíntia, Mario Henrique, Ricardo, Isaac, Mariângela, Guilherme, Vinícius, Reinaldo, Ássima, Gustavo e Rafael, pelo apoio, amizade e bons momentos.

A todos os amigos cuja presença e convívio fortaleceram a concretização do meu ideal, tornando mais agradável o trabalho realizado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudo;

*A todos meus sinceros agradecimentos!*

*... Quem deve ser levado em conta não é aquele que censura, que denuncia os tropeços dos fortes ou as limitações dos beneméritos...  
"O valor pertence ao homem que está de fato na arena, cujo rosto está desfigurado pela poeira, pelo suor e pelo sangue;  
que luta valentemente e torna a falhar;  
que conhece os grandes entusiasmos, as grandes dedicações;  
que se empenha numa causa justa e que quando vence, conhece finalmente a vitória das grandes realizações  
e, na pior das hipóteses se fracassa, será enquanto se aventura magnificamente, de modo que seu lugar nunca será junto aquelas almas timoratas que não conhecem a vitória nem a derrota"*

**Theodore Roosevelt**

SUMÁRIOS		Pág
RESUMO.....		21
ABSTRACT.....		22
1. INTRODUÇÃO.....		24
2. LITERATURA CONSULTADA.....		25
2.1. Babesiose bovina.....		25
2.2. Ciclo Biológico.....		26
2.3. Patogenia e sinais clínicos.....		26
2.4. Controle da babesiose bovina.....		28
2.5. Proteína associada à Rhoptria (RAP-1) e peptídeo sintético de RAP-1.....		30
2.6. Resposta imune contra <i>Babesia bovis</i> .....		32
2.6.1. Resistência do hospedeiro à babesiose bovina.....		32
2.6.2. Imunidade inata.....		33
2.6.3. Resposta imune.....		35
2.6.4. Resposta imune celular.....		37
3. OBJETIVOS.....		39
3.1. Objetivo geral.....		39
3.2. Objetivos específicos.....		39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....		40
4.1. Local de realização do experimento.....		40
4.2. Animais experimentais.....		40
4.3. Grupos experimentais.....		40
4.4. Peptídeo sintético 23290.....		40
4.5. Imunização.....		41
4.6. Desafio.....		41
4.7. Avaliação parasitológica e imunológica antes e após o desafio.....		41
4.7.1. Coleta de sangue e soro.....		41
4.8. Avaliação clínica dos animais.....		41
4.9. Avaliação parasitológica.....		42
4.9.1. Determinação da parasitemia por esfregaço de ponta de orelha e/ou cauda.....		42
4.9.2. Determinação da parasitemia por citometria de fluxo. Marcação com Hidroetidina..		42
4.9.3. Análise das marcações por hidroetidina.....		43
4.10. Avaliação da resposta imune celular no contexto <i>ex vivo</i> .....		44
4.10.1. Padronização dos anticorpos monoclonais anti CD4, CD8 e CD21 bovinos utilizados para os ensaios de citometria de Fluxo .....		44
4.10.2. Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos.....		44
4.10.3. Análise da Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos.....		45
4.11. Avaliação da resposta imune celular no contexto <i>in vitro</i> .....		45
4.11.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....		45
4.11.2. Cultivo das células mononucleares do sangue periférico e marcação com timidina tritiada.....		46
4.11.3. Estimulação <i>in vitro</i> das células mononucleares de sangue periférico com o peptídeo sintético 23290.....		46
4.11.4. Imunofenotipagem das células mononucleares mantidas em cultivo sob estimulação do peptídeo sintético 23290 e análise por citometria de fluxo.....		46



SUMÁRIOS	Pág
<b>4.12. Avaliação da resposta imune humoral.....</b>	<b>47</b>
4.12.1. Teste imunoenzimático ELISA para determinação do perfil de anticorpos (IgG total) anti - <i>Babesia bovis</i> .....	47
4.12.2. Teste imunoenzimático ELISA para determinação do perfil de anticorpos (IgG total) anti-peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> .....	47
<b>4.13. Análise estatística.....</b>	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Avaliação do perfil parasitológico e imunológico dos bovinos experimentais....</b>	<b>48</b>
5.1.1. Avaliação clínica.....	48
5.1.2. Avaliação da ausência de infecção natural por <i>B. bovis</i> nos animais experimentais.....	48
5.1.3. Celularidade do sangue periférico dos animais experimentais.....	48
5.1.3.1. Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T, B e células não T não B (NTNB)...	48
5.1.3.2. Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	49
5.1.3.3. Relação dos linfócitos T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> .....	50
5.1.4. Estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i> na linfoproliferação de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais.....	50
5.1.4.1. Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com mitógeno para células T (Concanavalina-A).....	50
5.1.4.2. Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com peptídeo sintético de RAP-1 de <i>Babesia bovis</i> (23290).....	51
5.1.5. Estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i> na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais.....	51
5.1.5.1. Imunofenotipagem dos linfócitos T totais, B CD21 <sup>+</sup> e células NTNB.....	51
5.1.5.2. Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	52
5.1.5.3. Relação T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> .....	53
5.1.6. Resposta humoral dos animais experimentais.....	54
5.1.6.1. Detecção anticorpos anti - <i>Babesia bovis</i> (IgG total), por ELISA.....	54
5.1.6.2. Detecção anticorpos anti - peptídeo sintético (IgG total), por ELISA.....	54
<b>5.2. Avaliação do perfil parasitológico e imunológico dos bovinos experimentais mantidos em isolamento após o desafio com amostra virulenta de <i>Babesia bovis</i>...</b>	<b>55</b>
5.2.1. Avaliação clínica dos animais experimentais.....	55
5.2.1.1. Avaliação da temperatura retal.....	55
5.2.1.2. Hematócrito.....	55
5.2.1.3. Perfil parasitológico dos animais experimentais.....	56
5.2.1.3.1. Esfregaço de ponta de orelha.....	56
5.2.1.3.2. Avaliação da parasitemia pela técnica da hidroetidina.....	56
5.2.2. Avaliação da eficácia do peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> na imunização experimental contra a <i>Babesia bovis</i> .....	57
5.2.3. Celularidade do sangue periférico nos estágios recentes e tardios da infecção por <i>Babesia bovis</i> pós-vacinação experimental.....	57
5.2.3.1. Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T, B e células não T não B (NTNB)...	57
5.2.3.2. Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	58
5.2.3.3. Relação dos linfócitos T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> .....	59
5.2.4. Estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i> na linfoproliferação de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais.....	60
5.2.4.1. Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com mitógeno para células T (Concanavalina-A).....	60
5.2.4.2. Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com o peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> (23290).....	60

SUMÁRIOS	Pág
5.2.5. Estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i> na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais.....	61
5.2.5.1. Imunofenotipagem dos linfócitos T totais, B CD21 <sup>+</sup> e células NTNB.....	61
5.2.5.2. Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	63
5.2.5.3. Relação T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> .....	64
5.2.6. Reposta humoral dos animais experimentais.....	65
5.2.6.1. Detecção anticorpos anti - <i>Babesia bovis</i> (IgG total ), por ELISA.....	65
5.2.6.2. Detecção de anticorpos anti-peptídeo sintético (IgG total ), por ELISA.....	66
<b>6. SÍNTESE DOS RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
<b>6.1. Potencial imunogênico da intervenção vacinal</b> .....	<b>66</b>
<b>6.2. Diferenças detectadas seletivamente no Grupo Peptídeo</b> .....	<b>66</b>
<b>6.3. Diferenças detectadas seletivamente no Grupo Controle</b> .....	<b>67</b>
<b>6.4. Diferenças detectadas simultaneamente no Grupo Peptídeo e Grupo Controle</b> .	<b>68</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>7.1. Perfil parasitológico e imunológico dos bovinos imunizados</b> .....	<b>70</b>
<b>7.2. Perfil parasitológico e imunológico de bovinos imunizados após o desafio com amostra virulenta de <i>B. bovis</i></b> .....	<b>73</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>

LISTA DE TABELAS	Pag
<b>Tabela 1:</b> Composição dos grupos experimentais mantidos em isolamento. ....	<b>40</b>
<b>Tabela 2:</b> Percentual de hemácias fluorescentes positivas nos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle. ....	<b>48</b>
<b>Tabela 3:</b> Média das percentagens dos linfócitos T totais (CD4 <sup>+</sup> + CD8 <sup>+</sup> ), B CD21 <sup>+</sup> e NTNB no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle. ....	<b>49</b>
<b>Tabela 4:</b> Média das percentagens dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.....	<b>49</b>
<b>Tabela 5:</b> Média da relação das percentagens dos linfócitos T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.....	<b>50</b>
<b>Tabela 6:</b> Média do percentual de linfócitos T totais, B CD21 <sup>+</sup> e células NTNB nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.....	<b>52</b>
<b>Tabela 7:</b> Média do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.....	<b>53</b>
<b>Tabela 8:</b> Média da relação de linfócitos T/B e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.....	<b>53</b>

LISTA DE FIGURAS	Pag
<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Gráficos de fluorescência, representando o percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP). <b>A:</b> seleção da população de hemácias, <b>B:</b> controle negativo após incubação com hidroetidina e <b>C:</b> controle positivo após incubação com hidroetidina.....	43
<b>Figura 2:</b> Perfil dos leucócitos periféricos bovinos, após a lise do sangue periférico com solução de lise (FACS™ Lysing Solution) e incubação por cinco minutos.....	44
<b>Figura 3:</b> Representação gráfica da população de linfócitos bovinos marcada com o anticorpo monoclonal anti CD4 (A), anti CD8 (B) e anti CD21 (C), nas quantidades de 0,12µL, 0,5µL e 1,0µL.....	45
<b>Figura 4:</b> Representação gráfica da população de linfócitos pequenos e blastos de bovinos mantidos em cultura sob estimulação do peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> .....	47
<b>Figura 5:</b> Índice de proliferação celular das culturas de PBMC estimuladas com o mitógeno para células T (Con-A) do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○).....	51
<b>Figura 6:</b> Índice de proliferação celular das culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético 23290 do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○).....	51
<b>Figura 7:</b> Média das absorbâncias obtidas por ELISA frente a antígeno bruto de <i>B. bovis</i> , no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), durante o período de imunização.....	54
<b>Figura 8:</b> Média das absorbâncias obtidas por ELISA, frente ao peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> , no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) durante o período de imunização.....	55
<b>Figura 9:</b> Média da temperatura retal dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de <i>Babesia bovis</i> .....	55
<b>Figura 10:</b> Percentagem de volume globular médio dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de <i>Babesia bovis</i> .....	56
<b>Figura 11:</b> Percentagem de hemácias parasitadas fluorescentes após incubação da suspensão de hemácias com hidroetidina (25 µg/mL) dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de <i>B. bovis</i> .....	56
<b>Figura 12:</b> Percentagem de sobrevivência dos animais pertencentes ao Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), após desafio com amostra virulenta de <i>B. bovis</i> .....	57

LISTA DE FIGURAS	Pag
<b>Figura 13</b> Percentual de linfócitos T totais no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de <i>B. bovis</i> .....	57
<b>Figura 14</b> Percentual de linfócitos B CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de <i>B. bovis</i> .....	58
<b>Figura 15</b> Percentual de células NTNB no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de <i>B. bovis</i> .....	58
<b>Figura 16</b> Percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (A) e T CD8 <sup>+</sup> (B) no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de <i>B. bovis</i> .....	59
<b>Figura 17:</b> Percentual de linfócitos T/B (A) e T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (B) no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de <i>B. bovis</i> .....	60
<b>Figura 18:</b> Médias de proliferação celular dos linfócitos bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), estimulados com mitógeno para células T (Con-A) .....	60
<b>Figura 19:</b> Médias de proliferação celular dos linfócitos bovinos, dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), estimulados com o peptídeo sintético de RAP-1 de <i>Babesia bovis</i> .....	61
<b>Figura 20:</b> Percentual de linfócitos T totais (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	61
<b>Figura 21:</b> Percentual de linfócitos B CD21 <sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	62
<b>Figura 22:</b> Percentual de linfócitos NTNB (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	62
<b>Figura 23:</b> Percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	63
<b>Figura 24:</b> Percentual de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	64
<b>Figura 25:</b> Relação entre os linfócitos T e B (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	64

LISTA DE FIGURAS	Pág
<b>Figura 26:</b> Relação entre os linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de <i>B. bovis</i> . (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.....	65
<b>Figura 27:</b> Média das absorvâncias obtidas por ELISA, frente a antígeno bruto de <i>B. bovis</i> , no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), após o desafio com amostra virulenta de <i>Babesia bovis</i> . .....	65
<b>Figura 28:</b> Média das absorvâncias obtidas por ELISA, frente ao peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> , no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), após o desafio com amostra virulenta de <i>Babesia bovis</i> . .....	66
<b>Figura 29.</b> Potencial imunogênico da intervenção vacinal com o peptídeo sintético de RAP-1 de <i>B. bovis</i> : principais diferenças detectadas entre os animais do Grupo Peptídeo e do Grupo Controle.....	69
<b>Figura 30.</b> Impacto da Intervenção vacinal de RAP-1 de <i>B. bovis</i> : principais diferenças detectadas entre os animais do Grupo Peptídeo e do Grupo Controle.....	69
<b>Figura 31.</b> Impacto do Desafio com <i>B. bovis</i> : principais evidências de mecanismos imunoprotetores detectadas em animais sobreviventes (Grupo Peptídeo x Grupo Controle).....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Con-A	Concanavalina A
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
NTNB	células não T não B
PBMC	células sangüíneas mononucleares periféricas
RAP-1	Proteína associada à rhoptria
Th1	Resposta imune do tipo 1
Th2	Resposta imune do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral

## RESUMO

Para a avaliação da eficácia imunogênica do peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*, 15 bovinos com idades superiores a 12 meses, livres de hemoparasitoses foram mantidos em isolamento para hemoparasitoses e separados em três grupos de cinco animais. Os bovinos do Grupo Peptídeo receberam, por via subcutânea, nos dias D-90, D-60 e D-30, dois mg do peptídeo emulsionado em saponina. Os do Grupo Saponina receberam adjuvante saponina e os animais do Grupo Controle receberam soro fisiológico, sob o mesmo esquema do Grupo Peptídeo. Trinta dias após a última inoculação, os animais foram desafiados com  $5 \times 10^8$  hemácias parasitadas com *B. bovis* virulenta. Amostras de sangue e soro foram colhidas para a realização do estudo cinético de parâmetros parasitológicos e imunológicos. Nos estudos parasitológicos realizados por esfregaço sangüíneo de ponta de orelha e por citometria de fluxo, com marcação com hidroetidina, observou-se que a citometria de fluxo permitiu a detecção de *B. bovis* a partir do segundo dia após o desafio e manteve-se positiva por todo o experimento. Quanto ao esfregaço de ponta de orelha, a detecção do parasito se deu a partir do terceiro dia mas foi um achado inconstante. A avaliação imunológica da resposta imune celular foi realizada no contexto *ex vivo* e *in vitro*, por intermédio da imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico, com anticorpos monoclonais bovinos anti CD4, CD8 marcados com FITC e CD21 não marcado. A resposta imune humoral foi realizada por meio do teste imunoenzimático ELISA. A análise dos resultados revelou que o Grupo Peptídeo desenvolveu resposta imune protetora precoce envolvendo linfócitos T, principalmente T CD4<sup>+</sup>, células B produtoras de anticorpos e células NTNB. O grupo controle foi capaz de montar uma resposta antígeno específica pós-desafio envolvendo células B, mas não apresentou habilidade de recrutar células T CD4<sup>+</sup>, o que provocou a morte de três animais. O aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, nesse grupo, só foi observado tardiamente. O Grupo Saponina apresentou percentuais mais baixos de linfócitos T e B, e de IgG durante todo o experimento, porém, alto percentual de células não T não B (NTNB). A morte dos animais desse grupo provavelmente ocorreu devido a uma resposta imune exacerbada. A resposta linfoproliferativa *in vitro* na presença do mitógeno (Con-A) mostrou-se diminuída em todos os animais inoculados com amostra patogênica de *B. bovis*, enquanto que a resposta antígeno específica apresentou-se elevada, somente no Grupo Peptídeo. A partir dessas informações pode-se considerar que a imunização com o peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade, no grupo controle, de 60% para 20%, nos animais imunizados e desenvolver uma resposta antígeno específica envolvendo resposta celular, humoral e inata.

**Palavras-chave:** *Babesia bovis*, peptídeo sintético, RAP-1, imunologia, imunidade celular, imunidade humoral, citometria de fluxo, hidroetidina.

## ABSTRACT

The immunogenic efficiency of *B. bovis* RAP-1 synthetic peptide was evaluated in 15 twelve-month-old, hemoparasite-free bovines. The animals were kept in a hemoparasite-free environment and separated in three groups of five animals, named as Peptide, Saponin and Control group. Animals from the peptide group received 2 mg of the saponin peptide emulsion subcutaneously, at 30, 60, and 90 days post-experimental onset. On the same days, animals from the Saponin group received the saponin adjuvant and animals from the Control group received saline. Thirty days after the last inoculation, all animals were challenged with  $5 \times 10^8$  virulent *B. bovis*-infected erythrocytes. Blood and serum samples were collected in order to evaluate the parasitological and immunological kinetics parameters. To detect *B. bovis*, parasitological studies were performed by examining peripheral blood films and by flow cytometry of erythrocytes stained with the dye hydroethidine. The parasite was detected after the third day post-challenge in blood smears however the results after the point of detection tended to be inconsistent. Flow cytometry consistently revealed *B. bovis* detection from the second day post-challenge until the end of the experiment. The cellular immune response was evaluated *in vitro* and *ex-vivo* by leukocyte immunophenotyping of peripheral blood using FITC-labeled bovine monoclonal antibodies anti-CD4 and CD8, and unlabeled CD21. The humoral immune response was evaluated by the ELISA assay. The results obtained from this study showed that the Peptide group developed an early and protective immune response, including T lymphocytes, especially CD4<sup>+</sup> T cells, antibody producing B-cells, and NTN cells. The Control group was able to respond specifically to the antigen through a B-cell immune response; however, it did not show early CD4<sup>+</sup> T-cells recruitment. Death resulted in three of the Control group animals. During the whole experiment, the Saponin group showed low levels of T and B-lymphocytes and immunoglobulin G (IgG), but high levels of NTN cells. Death was observed in all animals from this group, and we speculate that a strong immune response was responsible for the 100% of mortality rate. The *in vitro* lymphoproliferative response in the presence of a mitogen (Con-A), was low in all animals infected with pathogenic *B. bovis*, while the antigen-specific immune response was high in all animals from the Peptide group. The results obtained in the present study suggest that immunization with *B. bovis* RAP-1 synthetic peptide might decrease the mortality rate of *B. bovis* infection, from 60%, Peptide group to 20% mortality, Control group, through the activation of cellular, humoral, and innate immune responses.

**Key words:** *Babesia bovis*, synthetic peptide, RAP-1, immunology, cellular immunity, humoral immunity, flow cytometry, hydroethidine.



## 1 INTRODUÇÃO

As vacinas contra agentes infecciosos como vírus e bactérias são reconhecidas e utilizadas com grande sucesso na medicina veterinária. Entretanto, o desenvolvimento de vacinas eficazes contra infecções parasitárias que causam grandes prejuízos para os produtores rurais como a tristeza parasitária bovina, as infestações por carrapatos e as verminoses é ainda um grande desafio para os pesquisadores. Neste contexto, a babesiose representa um dos importantes alvos de investigação, considerando seus aspectos clínico-epidemiológicos e o seu impacto na medicina veterinária.

A babesiose é uma doença que ocorre nos países de clima tropical e subtropical constituindo-se em empecilho para o desenvolvimento da indústria bovina, por ocasionar altas taxas de mortalidade (Kuttler, 1988), perdas na produção de carne e leite, elevados custos de medidas profiláticas e de controle da doença, além da dificuldade de expansão de bacias leiteiras de alta produtividade devido à restrição à introdução de animais susceptíveis em áreas livres (McCosker, 1981).

Essa doença é causada por várias espécies de *Babesia*, mas no Brasil, é causada principalmente por duas espécies: a *Babesia bovis* (Babes, 1888) e a *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), que em condições naturais, são transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Esses parasitos invadem e multiplicam somente no interior de eritrócitos e promovem o desenvolvimento de sinais como anemia, hemoglobinúria, anorexia e caquexia (Wright et al., 1989). Os eritrócitos infectados por *B. bovis* aderem aos capilares endoteliais e viscerais gerando sinais semelhantes à malária humana causada pelo *Plasmodium falciparum* como, disfunção cerebral, edema pulmonar e conseqüentemente morte (Wright et al., 1988).

Devido ao impacto que a babesiose causa na pecuária, métodos mais eficazes como a vacinação com parasitos atenuados, subunidades do hemoparasito, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos estão sendo investigados, desenvolvidos e testados visando o controle desta enfermidade.

Todos esses tipos de imunógenos visam desenvolver imunidade protetora nos animais, por intermédio do estabelecimento de uma resposta humoral e celular, com ativação de macrófagos e conseqüentemente morte dos parasitos. Estudos em bezerros infectados com *B. bovis* mostraram que eventos da imunidade humoral e celular estão envolvidos nos mecanismos imunológicos associados à resistência durante a infecção (Brown & Rice-Ficht, 1994). Nesse contexto, células B e linfócitos T CD4<sup>+</sup> parecem desempenhar um papel central no estabelecimento da imunidade protetora.

No âmbito da imunidade humoral, a função das imunoglobulinas foi descrita inicialmente por Mahoney et al., (1979). Eles afirmaram que a transferência passiva de soro hiperimune ou mistura de IgG1 e IgG2 era capaz de reduzir a parasitemia em bezerros esplenectomizados e subseqüentemente infectados.

Segundo Brown et al. (1995b), a imunidade protetora contra babesiose, como na malária humana, parece necessitar também do desenvolvimento de uma resposta imune celular, de natureza inflamatória com a participação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos anti-parasito, apresentando um perfil de citocinas do tipo Th1. Esse microambiente de citocinas seria importante para promover a ativação de macrófagos, a liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 12 (IL-12) e a produção de oxigênio tóxico e metabólitos de nitrogênio, principalmente o óxido nítrico e seus derivados.

Estudos recentes revelam que a resistência à infecção aguda na babesiose está

correlacionada à indução precoce de IL-12, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e óxido nítrico (Goff et al., 2001). Uma vez que a atividade antiparasitária é mediada por citocinas inflamatórias como IFN $\gamma$  e TNF  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , as quais ativam neutrófilos e macrófagos responsáveis pela fagocitose (Kumaratilake & Ferrante, 1992), o desenvolvimento estratégico de medidas imunoprolifáticas deve estar certamente orientado no sentido de se estabelecer um estado de imunidade do tipo Th1, imunoprotetor no contexto da infecção.

A imunidade protetora contra a infecção aguda de *Babesia* envolve macrófagos ativados e células "natural killer" (NK), enquanto que o controle da parasitemia durante a infecção persistente ou após infecção por *Babesia* envolve anticorpos citofílicos e macrófagos ativados. Como o parasito reside no interior dos eritrócitos, que são isentos de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I), a apresentação dos antígenos parasitários fica restrita à categoria de células profissionais como macrófagos, células B, células dendríticas ou células T ativadas. Assim, células T CD4<sup>+</sup>, hábeis na resposta a antígenos de natureza exógena representam o elo de ligação na interface entre a imunidade inata e adquirida (Brown & Palmer, 1999).

Portanto, uma vacina eficaz deverá conter epítomos capazes de recrutar tanto linfócitos B quanto células T CD4<sup>+</sup>. Várias proteínas imunoestimuladoras já foram testadas como, por exemplo, a proteína associada a rhoptria (RAP-1), a proteína 12D3, a proteína de corpos esféricos (SBP-1), o antígeno maior de superfície (MAS-1) e proteínas de "heat shock" como a Hsp-20.

No entanto, a proteína RAP-1, responsável pelo estabelecimento do parasitismo intraeritrocitário, tem se revelado como um bom imunógeno para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Tendo em vista que ela reduziu significativamente a parasitemia, após desafio com amostra virulenta de *Babesia* (Wright et al., 1992), e é reconhecida pelo soro de animais imunes à

babesiose (Suarez et al., 1993), além de ser conservada em várias entre as espécies de isolados geograficamente diferentes, e possuir epítomos conservados que induzem células T e B (Palmer et al., 1991, Suarez et al., 1991). Segundo Cooper et al. (1991), Figueroa et al. (1991) e Doury (1994) anticorpos produzidos contra proteínas de rhoptrias de *Babesia* e *Plasmodium* inibem *in vitro* a invasão do parasito.

Tendo em vista a importância da proteína RAP-1, o peptídeo sintético 23290, originado com base na estrutura íntegra dessa proteína foi desenvolvido e avaliado *in vitro* por Freitas (2001).

Com base nesse contexto, torna-se importante avaliar o poder imunogênico desse peptídeo sintético para um esquema de vacinação e, além disso, conhecer a sua habilidade de induzir proteção em animais desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*. Essas informações são relevantes para o conhecimento do impacto desse peptídeo na resposta imune dos animais imunizados, e fornecerão subsídios para o desenvolvimento de uma futura vacina contra essa hemoparasitose.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Babesiose bovina

A babesiose bovina é causada por protozoários do gênero *Babesia*, com ocorrência em várias regiões tropicais e subtropicais como América Central e do Sul, Norte da África, Ásia e Austrália; sua distribuição geográfica está correlacionada à presença de carrapatos.

Essa doença é causada por várias espécies de *Babesia*, entretanto no Brasil, a maioria dos bovinos é acometida por duas espécies *B. bovis* (Babes, 1888) e *B. bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) que, em condições naturais, são transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).

A babesiose bovina promove perdas econômicas devido aos efeitos diretos da

doença como mortalidade dos animais, queda da produção dos animais doentes e gastos com medicamentos para tratamentos. Paralelamente a isso, tem os efeitos indiretos devido aos elevados custos de medidas profiláticas e de controle da doença, além da dificuldade de expansão de bacias leiteiras de alta produtividade devido à restrição ao fluxo de animais provenientes de áreas instáveis (McCosker, 1981).

Segundo alguns trabalhos realizados no Brasil, Uruguai e Argentina (Madruga et al., 1986, Späth & Mangold, 1986), a babesiose é um dos maiores problemas na pecuária e provoca redução do ganho de peso de 23-45% (Solari et al., 1992).

Essa doença se tornou mais preocupante a partir do momento que novas práticas de manejo passaram a ser utilizadas, como o sistema "free stall", o aleitamento artificial de bezerros, o uso indevido de carrapaticidas, que têm propiciado o aparecimento de áreas de instabilidade enzoótica, devido ao restrito contato dos animais com os vetores.

Outro problema refere-se à importação de animais provenientes de áreas livres de carrapatos. Animais susceptíveis ao serem introduzidos em áreas endêmicas, necessitam de medidas preventivas para evitar a morte por infecção com hemoparasitos.

## 2.2 Ciclo Biológico

O ciclo de vida da *Babesia bovis* envolve tecidos do carrapato *B. microplus* como o intestino, o ovário e a glândula salivar e células sanguíneas do hospedeiro vertebrado.

No intestino do carrapato os eritrócitos infectados com merozoítos ingeridos pela teleógena permanecem por algumas horas e posteriormente os merozoítos começam a se desenvolver em gametócitos que se diferenciam em estágios uninucleados chamados corpos raiados (*Strahlenkörper*) e se fundem originando o zigoto (Mehlhorn & Schein, 1984). O zigoto evolui para uma

célula chamada oocineto que invade as células epiteliais do intestino do carrapato e inicia a divisão assexuada com a formação de cinetos que irão invadir hemócitos, e outros órgãos como ovário e conseqüentemente os oócitos.

Os cinetos que invadem os oócitos permanecem em dormência durante o desenvolvimento da larva dentro do ovo. Quando estas larvas eclodem e começam a se alimentar no hospedeiro ocorre novo processo de esporogonia e os cinetos invadem as células da glândula salivar, multiplicam e originam os esporozoítos que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (Friedhoff, 1988).

Após a transmissão transovariana, os cinetos presentes nos oócitos contaminados invadem vários órgãos no embrião, larva, ninfa e carrapatos adultos. Entretanto, é importante ressaltar que a *B. bovis* é transmitida somente na fase de larva do *B. microplus* (Mahoney & Mirre, 1979).

Nas células sanguíneas do hospedeiro vertebrado ocorre multiplicação assexuada, denominada merogonia (Mahoney & Mirre, 1977), que origina os merozoítos que são parasitos piriformes possuidores de complexo apical típico que invadem os eritrócitos.

O ciclo no hospedeiro vertebrado inicia-se após a penetração do merozoíto na célula sanguínea com formação de vacúolo parasitóforo que se perde posteriormente à transformação do merozoíto em trofozoíto. O trofozoíto origina, por merogonia, dois merozoítos que vão parasitar novos eritrócitos, após rompimento da hemácia parasitada. Segundo Mahoney (1969), o ciclo assexuado no hospedeiro vertebrado continua até que o hospedeiro morra ou elimine o parasito por meio de resposta imune eficaz e passe a ser portador sadio.

## 2.3 Patogenia e sinais clínicos

Apesar do ciclo no bovino acontecer principalmente no interior das hemácias, as características clínicas dos animais

infectados variam em função da espécie de *Babesia* envolvida e com a susceptibilidade do hospedeiro. Ou seja, as pequenas *Babesias* (ex.: *B. bovis*) são mais patogênicas que as grandes *Babesias* (ex. *B. bigemina*) e fatores relacionados ao hospedeiro como idade, raça, status imune e fisiológico influenciam diretamente a sintomatologia dos animais infectados.

Normalmente, os animais apresentam anemia febre, desidratação e esplenomegalia. Ambas infecções são acompanhadas por lises dos eritrócitos parasitados e a hemoglobinúria é um achado freqüente, principalmente na infecção por *B. bigemina*. Animais infectados por *B. bovis* podem apresentar problemas neurológicos, traduzidos por ataxia, crises convulsivas, coma e conseqüentemente morte (Mahoney & Mirre, 1977, Kreier & Baker, 1987)

O período de incubação após infestações por carrapatos varia de oito a 16 dias. O animal apresenta, paralelamente ao aumento da parasitemia, elevação da temperatura retal (41 - 41,5°C), e posteriormente, os sintomas clínicos anteriormente mencionados. A recuperação dos animais da infecção aguda pela babesiose é traduzida pelo desaparecimento do parasito do sangue periférico e dos sintomas clínicos. Normalmente os animais não apresentam recrudescência da doença.

A patogenia da babesiose deve-se a destruição de eritrócitos, liberação de mediadores químicos farmacologicamente ativos e seqüestro de hemácias parasitadas (microcirculação).

A destruição das hemácias pela saída dos merozoítos e pelo aumento da atividade fagocítica monocitária do baço e fígado ocasiona a retirada de hemácias parasitadas da circulação (Mahoney & Mirre, 1977).

Trabalhos mostram que durante a fase aguda da doença há liberação de antígenos solúveis que ativam os sistemas de calicreína e do complemento, o que

resulta a produção de calicreína, bradicinina e outros mediadores que irão causar hipotensão e conseqüentemente estase sangüínea que irá ativar o sistema de coagulação.

Os distúrbios da coagulação dependem do metabolismo do fibrinogênio, ou seja, há aumento da concentração de fibrina que tem afinidade com a superfície das hemácias infectadas ou não. Isso resulta em hipercoagulação devido à agregação delas (Goodger & Wright, 1979).

A hipercoagulação é potencializada devido à hipotensão que promove uma diminuição do fluxo sangüíneo, estase e conseqüentemente maior adesão das hemácias nos microcapilares endoteliais. A proximidade das hemácias faz com que os merozoítos passem diretamente de uma hemácia para a outra. Dessa forma, favorecem a multiplicação dos parasitos (Wahlgren et al., 1995).

Segundo Wright & Goodger (1988) uma das lesões mais graves da babesiose aguda é a estase sangüínea que promove adesão dos eritrócitos entre si e ao endotélio capilar principalmente do cérebro, rins e músculo esquelético. Commins et al., (1988) afirmaram que alterações na composição e concentração de lipídeos, vitamina E e ácido siálico influenciam na flexibilidade e elasticidade das hemácias tornando-as mais rígidas, o que facilita a agregação delas.

A estase sangüínea provocada por substâncias vasoativas, pela hipotensão, e pela anemia dificultam o suprimento de oxigênio nos tecidos, o que gera anóxia tecidual e conseqüentemente processos degenerativos e necróticos com indução de quimiotaxia e diapedese de leucócitos (Losos, 1986, Wright et al., 1989).

Os animais que morrem devido a babesiose apresentam, à necropsia, emaciação da carcaça, palidez das mucosas, espleno e hepatomegalia, vesícula biliar distendida, bexiga contendo urina avermelhada, pulmões levemente edematosos e congestionados, coágulos

vasculares em vários órgãos, principalmente coração e congestão de microcapilares principalmente do cérebro, rins e coração (Wright & Goodger, 1988).

## 2.4 Controle da babesiose bovina

Devido à importância da babesiose na bovinocultura de leite e de corte, trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de controlar essa enfermidade com métodos mais eficazes como controle de carrapatos, quimioprofilaxia, premunicação e vacinação.

Atualmente, o controle dos carrapatos é realizado de maneira estratégica por meio de aplicação de drogas acaricidas em determinados períodos do ano conciliadas a observações dos fatores climáticos e biológicos dos ixodídeos. Essas medidas reduzem os níveis populacionais de carrapatos e conseqüentemente, favorecem a redução da transmissão da babesiose (Johnston et al., 1981, Nari, 1990).

Outro método refere-se a quimioprofilaxia que se baseia na aplicação de sub doses de drogas anti-*Babesia* (diaceturato de diazoaminodibenzamidina ou imidocarb) no período em que os animais são expostos à infecção. A quimioprofilaxia não impede a infecção, mas reduz o aparecimento de doença clínica (Kuttler, 1988).

Entretanto, apesar de muito utilizados, esses métodos são caros e de difícil controle e os resultados são ainda controversos. Os processos de imunização são os mais apropriados para o controle dessa enfermidade, principalmente em animais importados visto que, as infestações por carrapatos acarretariam a morte do animal. A premunicação é o método mais antigo (Pound, 1897) e metodologicamente baseia-se na inoculação de sangue de um animal portador em animais susceptíveis. Esse método apresenta sérias limitações no que se refere à disseminação de outras doenças, o desconhecimento do número de parasitos inoculados, com riscos de indução da forma aguda da babesiose ou de desenvolvimento da doença hemolítica

devido à formação de anticorpos polirreativos contra as hemácias (Dimmock & Bell, 1970).

Em relação à vacinação, vários métodos têm sido desenvolvidos e estudados na tentativa de controlar a babesiose bovina. As vacinas podem ser classificadas em duas categorias: vacinas com parasitos vivos e vacinas com parasitos mortos (Timms, 1989).

As vacinas que empregam parasitos vivos foram desenvolvidas na Austrália e utilizaram como princípio a redução da virulência da *Babesia* pelas passagens de sangue infectado em animais esplenectomizados (Callow & Mellors, 1966). Esse tipo de vacina foi utilizado por mais de 20 anos e tem sido aplicado na África do Sul e em muitos países da América Latina, inclusive no Brasil (Taylor, 1989). Por serem produzidas com sangue de animais, os inóculos são preservados refrigerados ou congelados em nitrogênio líquido e podem disseminar outros patógenos (vírus, bactérias e rickettsias), além de apresentar alto custo de produção, dificuldade de estocagem e distribuição. Vacinas obtidas por meio da irradiação dos parasitos (Irvin et al., 1979, Wright et al., 1982) ou cultivo *in vitro* com modificação do meio de cultura (MASP) (Jorgensen et al., 1992) também foram produzidas, porém apresentaram limitações referentes à modificação da virulência dos parasitos sobreviventes à irradiação, com conseqüente baixa imunidade protetora ou ao custo de produção em alta escala.

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.

Quanto ao uso de extratos de parasitos, há estímulo e desenvolvimento de imunidade protetora, porém a imunogenicidade diminui conforme o grau de purificação,

enquanto que as outras proteínas não desenvolveram nenhum tipo de proteção (Timms & Barry, 1988).

Outras proteínas recombinantes reconhecidas por anticorpos monoclonais W11C5 (Gale et al., 1992), 12D3 (Wright et al., 1983) e T21B4 (Commins et al., 1985, Gale et al., 1992) induziram proteção em animais susceptíveis, quando desafiados com amostras heterólogas de *B. bovis* com redução significativa da parasitemia (Gale et al., 1992, Dalrymple, 1992). Após essas observações, esses grupos de pesquisadores relataram uma indução de proteção em torno de 90% nos animais imunizados com as proteínas recombinantes 12D3 e W11C5.

Pelo exposto, é notório observar os esforços de pesquisadores em obter vacinas para a babesiose bovina, a partir de parasitos mortos ou componentes antigênicos. Porém um dos maiores entraves na obtenção de uma vacina eficaz refere-se à dificuldade de se encontrar proteínas imunodominantes, simultaneamente imunogênicas para linfócitos B, e as indutoras de resposta celular, uma vez que uma vacina eficiente tem que estimular resposta humoral e celular.

Algumas das proteínas mencionadas anteriormente como a recombinante 12D3 rica em resíduos de cisteína, a SBP-1 de corpos esféricos, a MSP-1 proteína de superfície de merozoíto entre outras foram inicialmente caracterizadas como indutoras de células T helper *in vitro*. Entretanto, quando avaliadas para observação da resposta celular observou-se que eram fracamente reconhecidas por linhagens de células T helper provenientes de bovinos imunizados contra *B. bovis* como é o caso das proteínas recombinantes 12D3, MAS-1 e SBP-1 (Court et al., 1998, Brown et al., 1993a,b, Stich et al., 1999). Segundo Court et al., (1998) esse fraco reconhecimento da proteína 12D3 por células T deveria estar associado ao extenso dobramento intramolecular gerado pelos inúmeros resíduos de cisteína presentes em sua estrutura.

Outra proteína recombinante, GST-11C5 (glutathione-S-transferase), não induziu produção de IFN- $\gamma$  por células provenientes de animais inoculados com esta proteína, nem de animais naturalmente infectados com *B. bovis* (Orinda et al., 1992).

A proteína associada à rhoptria (RAP-1) é altamente imunogênica e possui epítomos para células T CD4<sup>+</sup>. Quando essa proteína foi testada experimentalmente para se observar o grau de indução de resposta celular, pode-se notar altos índices de proliferação de células do tipo T CD4<sup>+</sup> (Stich et al., 1999). E, por isso, ela foi considerada um imunógeno de eleição para o desenvolvimento de uma vacina para controlar a babesiose bovina.

## 2.5 Proteína associada à Rhoptria (RAP-1) e peptídeo sintético de RAP-1

A invasão das hemácias pelo parasito é um processo ativo que envolve organelas do complexo apical como rhoptrias, grânulos densos e micronemas, além de corpos esféricos, conóide e anel polar (Sam-Yellowe, 1996). Inicialmente, ocorre o contato entre merozoíto e eritrócito, com orientação do polo apical do merozoíto à superfície da hemácia. Posteriormente, há fusão das membranas e liberação do conteúdo das rhoptrias, invaginação da membrana do eritrócito e entrada do merozoíto que fica dentro do vacúolo parasitóforo.

Nesse contexto, as organelas do complexo apical passaram a ser bastante pesquisadas visando um maior conhecimento das suas estruturas e características imunogênicas para o desenvolvimento de futuras vacinas contra a babesiose bovina.

Dentre essas organelas as rhoptrias, ou melhor, algumas proteínas associadas a elas estão sendo consideradas muito promissoras para o desenvolvimento de vacinas devido a algumas características inerentes a elas, principalmente porque as rhoptrias são importantes para a adesão e invasão do parasito na hemácia (Brown et al., 1996), além da expansão e

manutenção da membrana do vacúolo parasitóforo (Sam-Yellowe, 1996). Segundo Cooper et al. (1991), Figueroa et al. (1991) e Doury et al., (1994) anticorpos produzidos contra proteínas de rhoptrias de *Babesia* e *Plasmodium* inibem *in vitro* a invasão eritrocitária pelo parasito.

A família de genes codificadores das proteínas de 58-60 kDa associadas à rhoptrias (RAP) são consideradas promissoras por serem conservadas entre as espécies de isolados geograficamente diferentes pela conservação de epitopos que induzem células T e B (Suarez et al., 1998a,b). No Brasil, trabalhos de Figueiredo et al. (1997, 1999) com o anticorpo monoclonal anti *B. bovis* (4G2C6) permitiram evidenciar a conservação da proteína de 60 kDa de *B. bovis* (RAP-1) em três isolados de diferentes estados (Rio Grande do Sul, São Paulo, e Mato Grosso). Comparação entre a seqüência das proteínas associadas às rhoptrias entre as espécies de *Babesia* revelou forte similaridade na região amino terminal (Suarez et al., 1991, McElwain et al., 1987, 1991). Foi observado que *B. bovis* e *B. bigemina* possuem 45% de identidade, incluindo uma seqüência de 14 resíduos de aminoácidos com 100% de homologia e 65% de similaridade nos primeiros 300 aminoácidos (Suarez et al., 1991, Machado et al., 1993, Palmer & McElwain, 1995). A resposta sorológica contra proteínas RAP tem indicado a presença de epitopos variáveis e conservados. Animais naturalmente ou experimentalmente infectados com *B. bovis* ou *B. bigemina* desenvolvem anticorpos específicos contra RAP que reconhecem, em imunofluorescência, a superfície do merozoíto (Goff et al., 1988, McElwain et al., 1987, 1991).

Experimentos com frações contendo proteína de *B. bovis* (60 kDa) ou *B. bigemina* (58 kDa) permitiram observar a indução de proteção parcial, determinada pela redução de parasitemia e aumento da sobrevivência dos bovinos desafiados com amostra homóloga do parasito (Holder & Freeman, 1981, Ridley, et al., 1990,

McElwain et al., 1991, Wright et al., 1992, Machado et al., 1999).

Experimentos *in vitro* com o anticorpo monoclonal anti-RAP-1 de *B. bigemina* (C2F3G3) inibiu o crescimento da *B. bigemina* (Figueroa & Buening, 1991).

A proteína RAP-1, responsável pelo estabelecimento do parasitismo intraeritrocitário, tem se revelado como um importante imunógeno para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente a parasitemia, após desafio com amostra virulenta de *B. bovis* (Wright et al., 1992), e é reconhecida por soro de animais imunes à babesiose (Suarez et al., 1993). Além disso, é importante ressaltar que RAP-1 é conservada em vários isolados de espécies geograficamente diferentes e possui epitopos altamente imunogênicos para linfócitos B como também para células T CD4<sup>+</sup> (Palmer et al., 1991, Suarez et al., 1991). Segundo Brown et al., (1995a) os antígenos importantes a serem utilizados em uma vacina contra *B. bovis* não devem ser identificados pelos anticorpos ou pela imunidade humoral que produzam, e sim pelas células T. Provavelmente, os melhores antígenos a serem utilizados em uma vacina sejam aqueles que estimulem uma forte resposta celular e fraca resposta humoral.

Nesse contexto, peptídeos sintéticos foram feitos a partir da estrutura íntegra da proteína RAP-1 de *B. bovis*. A opção por peptídeos sintéticos deve-se às características intrínsecas dessa técnica como à possibilidade de síntese de peptídeos mínimos, com estrutura antigênica bem definida capazes de estimular resposta imune específica e efetiva, além de oferecer vantagens sobre as preparações antigênicas como alto grau de pureza, ausência de contaminantes, alta estabilidade, entre outras (Neurath & Kent, 1986, Ben-Yedidia & Arnon, 1997.). A construção de peptídeos sintéticos é realizada por estudos de predição computacional que se baseiam na estrutura

primária da proteína e nas suas características químicas.

Tendo em vista a importância da proteína RAP-1, o Laboratório de Biologia e Controle de hematozoários - BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa associado ao FIDIC - Fundación Instituto de Immunologia da Colômbia confeccionaram alguns peptídeos sintéticos baseados na estrutura íntegra dessa proteína, entre eles o peptídeo sintético 23290. A escolha de uma seqüência presente numa região não conservada da RAP-1 baseou-se nos estudos de Suarez et al., (1993) que afirmaram que as seqüências conservadas entre as RAP não possuem epítomos indutores de resposta mediada por células B. Um conjunto de dez peptídeos sintéticos baseados na estrutura íntegra da proteína RAP-1 foi testado em ensaios de imunogenicidade. Para essa avaliação utilizaram células mononucleares periféricas de bovinos Holandeses inoculados com amostra atenuada e com exoantígenos de *B. bovis* (BbUFV-1). Essas células (PBMC) foram estimuladas *in vitro* com os peptídeos sintéticos para a identificação dos peptídeos estimuladores da resposta imune celular e/ou humoral. Dos dez peptídeos testados, três estimularam linfócitos T (5084, 5089 e 5087) e outros três estimularam linfócitos B (5081, 5085 e 5088) (Patarroyo et al., 1999).

Sabendo-se que para um peptídeo ser um bom imunógeno é necessária a união de epítomos T e B reativos em sua estrutura, Jackson et al. (2000), construíram peptídeos híbridos por meio de ligações covalentes conhecidos como peptídeos recombinantes ou *multiple antigenic peptide*, ou seja, peptídeos constituídos por seqüências de aminoácidos reconhecidas tanto por células T quanto B. Com base nesse trabalho, os peptídeos 5084 e 5081, que apresentaram maior estímulo para células T e B, respectivamente, foram hibridizados por meio de pontes de Lisina-Glutamina-Lisina (KEK) e originaram o peptídeo 23290. Este peptídeo quanto submetido a testes para avaliação da estimulação da resposta imune induziu

maiores níveis de produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 que o peptídeo 5084, e maiores níveis de IgG1 e 2 que o peptídeo 5081 (Freitas, 2001). Portanto, o peptídeo 23290 parece ser um bom antígeno para ser utilizado em uma vacina contra a babesiose bovina.

## **2.6 Resposta imune contra *Babesia bovis***

### **2.6.1 Resistência do hospedeiro à babesiose bovina**

A necessidade de mais entendimento sobre os mecanismos de imunidade contra *Babesia* deve-se ao fato dos animais serem capazes de desenvolver resposta imune contra espécies de *Babesia*, após episódios de infecção natural ou métodos profiláticos. Porém, em outros momentos, a indução de proteção não acontece. Isso pode ser observado em alguns trabalhos envolvendo testes com vacinas que mostraram que os imunógenos podem falhar na indução de proteção (Bock et al., 1995).

A imunidade para a *Babesia* depende da imunidade inata do hospedeiro e de uma resposta específica aos antígenos do parasito. Esses mecanismos são responsáveis pelo bloqueio da multiplicação dos microorganismos do gênero *Babesia* nos eritrócitos. Fatores genéticos, fisiológicos e bioquímicos também participam na resistência não específica contra a babesiose bovina.

Em relação aos fatores genéticos sabe-se que os animais *Bos taurus* têm maior susceptibilidade que os animais *Bos indicus* (Francis, 1966). Os zebuínos, segundo Kelley, (1943) e Arnold (1948) são resistentes à babesiose, mas provavelmente o que ocorre é que esses animais tenham se tornado imunes devido à presença deles em áreas endêmicas (imunidade adquirida). Essa observação é comprovada por Arnold (1948) que cita que zebuínos adultos levados dos Estados Unidos (área livre de carrapatos e *Babesias*) para a Jamaica (área endêmica para *Babesia*) apresentaram quadros de



babesiose tão agudos quanto animais europeus importados.

Com base nessas observações, o cruzamento entre zebuínos e europeus começou a ocorrer e pôde-se observar que os animais originados desse cruzamento apresentavam susceptibilidade variável, ou seja, poderiam ter infecções mais leves (característica herdada dos zebuínos) ou infecções mais severas (característica herdada dos europeus) (Bock, 1999). Segundo Francis & Little (1964) os animais zebuínos e os originados dos cruzamentos entre europeu e zebuíno são mais resistentes às infestações por carrapatos e conseqüentemente à babesiose.

Outra observação importante foi mostrada no trabalho de Johnston et al., (1978), em que descrevem que os animais zebuínos eliminam a *B. bovis* num período menor que os animais europeus.

Em relação aos fatores fisiológicos, sabe-se que os bezerros são menos susceptíveis que os animais adultos. Essa menor susceptibilidade se dá provavelmente devido a um fator dialisável de peso molecular menor que 14 KDa presente no soro dos animais jovens que inibe a multiplicação da *Babesia* e promove a sua morte no interior dos eritrócitos. Essa observação foi feita por Levy e colaboradores em 1982, que afirmaram que o soro de animais provenientes de área livre de carrapatos e com sorologias negativas para *Babesia* controlava a multiplicação do parasito e poderia promover a sua morte dentro das hemácias. Essa maior resistência dos bezerros foi atribuída também aos anticorpos recebidos da mãe por meio do colostro.

Segundo Francis (1966), os touros, principalmente os mais velhos seguidos pelas vacas matrizes, bois castrados e vacas castradas são, nesta ordem, os primeiros a morrer quando o rebanho é acometido pela babesiose (primo infecção). Nos animais jovens, desde bezerros em amamentação até a idade de um ano, a mortalidade é baixa ou não ocorre. Essa

observação pode ser confirmada pelo trabalho de Trueman & Blight (1978) que descreveram que após inoculação de *B. bovis* em animais de várias faixas etárias, as vacas adultas apresentaram quadros graves da doença, seguidas pelos animais de um a dois anos de idade que apresentaram reações leves a moderadas e por último os animais jovens, bezerros de cinco a seis meses, que não desenvolveram quadro clínico da babesiose provavelmente, devido à resistência inata deles, conforme descrito anteriormente.

## 2.6.2 Imunidade inata

Segundo Hemmer et al. (2000), embora a imunidade humoral adquirida seja importante no controle da infecção por *Babesia*, numa infecção primária as células do sistema imune inato são mais importantes para interromper ou controlar o desenvolvimento dos parasitos. Isso porque na ausência de macrófagos e células NK observa-se um aumento da parasitemia em um curto período de tempo. Esse contexto sugere que os fatores imunes inatos podem estar envolvidos na destruição dos parasitos antecipadamente à produção de anticorpos.

Além desses fatores genéticos, fisiológicos e bioquímicos a imunidade inata tem uma participação importante no controle ou aumento da patogenicidade da babesiose. Segundo Brown & Palmer (1999), os mecanismos relacionados à imunidade inata são importantes na resolução da infecção aguda causada pela *Babesia*, enquanto que a imunidade adquirida é mais importante para a resistência aos desafios com amostra homóloga ou heteróloga de *Babesia*.

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 ocorrência de infecção aguda ou resolução da infecção do hospedeiro, além da magnitude da resposta imune específica (Brown, 2001).

Várias moléculas específicas envolvidas na imunidade inata são descritas como linha de frente na defesa contra a *Babesia*, entre elas estão monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos e células NK (natural killer) (Court et al., 2001).

As células NK estão relacionadas à resistência dos animais para *Babesia*, conforme apresentado no trabalho de Eugui & Allinson (1980) e estas células seriam responsáveis pela proteção dos animais em estágios precoces de infecção com o controle da multiplicação da *Babesia* no pico de parasitemia (James, 1988). Evidências sobre a atividade das células NK também foram obtidas em estudos relacionados à babesiose humana, em que se observou aumento da população de células NK em pacientes com babesiose aguda (Shaio & Lin, 1998). Mas segundo Hemmer et al. (2000), o aumento da população de células NK na fase aguda da babesiose não pode ser correlacionado ao controle da infecção aguda uma vez que outras células também estão envolvidas como, por exemplo, os macrófagos e neutrófilos.

Durante infecção inicial, os monócitos e neutrófilos do sangue periférico são encontrados no local da infecção anteriormente ao aparecimento dos anticorpos específicos cujas funções baseiam-se na fagocitose de materiais estranhos e liberação de radicais oxidativos resultantes de reações oxidativas. Pesquisa realizada por Court et al. (2001) comprova que durante o pico de parasitemia e eliminação do parasito em exposições primárias à *B. bovis* a atividade fagocítica dos neutrófilos e explosão oxidativa promovida pelos monócitos estão aumentadas.

Essas células de defesa responsáveis pela fagocitose e explosão oxidativa também produzem citocinas que atuam como fatores de resistência às infecções por *Babesia* (Johnson et al., 1996, Court et al., 2001). Mas, a produção desregulada de citocinas inflamatórias, inclusive do TNF- $\alpha$  é responsável pelas patologias geradas pela *B. bovis*, principalmente a babesiose

cerebral (Wright et al., 1988). Isso também pode ser visto na malária humana, na qual os sintomas cerebrais estão associados a uma exacerbação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Grau et al., 1989).

Os macrófagos são os responsáveis pela fagocitose das hemácias parasitadas e pela eliminação delas da circulação. Essa atividade fagocítica está diretamente relacionada com a proteção dos animais para a babesiose visto que, estudo com camundongos como modelo experimental mostrou sua capacidade de eliminação de *B. rodhaini* (Saeki & Ishii, 1996) e atuação como elo de ligação entre imunidade inata e adquirida (Brown & Palmer, 1999). Segundo Meeusen et al., (1984) a transferência de macrófagos provenientes de animais imunes promove proteção de camundongos susceptíveis a *B. microti* e essa proteção é melhor que a obtida pela transferência de células T.

Experimentos com bovinos com baço *in situ* e esplenectomizados que receberam corticosteróide, que inibe a reação inflamatória mediada por macrófagos, mostraram que os animais esplenectomizados apresentavam altas parasitemias, sinais clínicos mais precoces e maior incidência de morte em decorrência do edema pulmonar (Wright & Goodger, 1988).

Os macrófagos estimulados também possuem a capacidade de produzir óxido nítrico capaz de inibir o crescimento de *B. bovis in vitro* (Johnson et al., 1996). Além disso, os monócitos são capazes de produzir citocinas que controlam a proliferação e diferenciação das células T e por isso funcionam como células acessórias na ativação dos linfócitos. Outra função importante se refere a atividade anti parasitária contra *B. bovis*, que parece estar relacionada à produção de mediadores pró inflamatórios como TNF  $\alpha$ ,  $\beta$  e IFN- $\gamma$  que aumentam a atividade fagocítica (Montealegre et al., 1985).

Outras funções se referem à apresentação de antígenos para as células T CD4<sup>+</sup> e a produção de citocinas que recrutam outras

células inflamatórias, especialmente neutrófilos. Os neutrófilos são responsáveis por muitos efeitos sistêmicos da inflamação como a febre, além de possuírem receptores para IgG e para proteínas do complemento, fagocitando assim, partículas opsonizadas além de funcionarem como células efetoras da imunidade humoral.

Experimentos *in vitro* com macrófagos incubados na presença de várias preparações antigênicas de *B. bovis* foram realizados e mostraram que frações do merozoíto como membranas e organelas estimulavam preferencialmente a produção de óxido nítrico (NO). Esses resultados foram confirmados com o uso do RT-PCR, pela indução da enzima óxido nítrico sintetase por frações de merozoítos e de hemácias parasitadas, e pela não-indução na presença de hemácias não-parasitadas (Stich et al., 1998). A importância do óxido nítrico na resposta à *B. bovis* foi apresentada em experimentos em que os produtos de macrófagos ativados, com exceção do TNF- $\alpha$  inibiam o crescimento do parasito em sistemas de co-cultivo de macrófagos com eritrócitos infectados ou quando separados fisicamente em cultivo (Johnson et al., 1996). Shoda et al. (2000), também mostrou experimentalmente, que a *B. bovis* cultivada na presença de macrófagos induzia a produção de NO que poderia inibir parcialmente o seu crescimento.

Entretanto, Grau et al., (1989) afirmaram que a superprodução de NO pode estar associada a mecanismos patogênicos de infecção como 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.

Em relação às utilidades das citocinas produzidas pelos macrófagos sabe-se que os animais que sofrem infecção primária ao ativarem macrófagos e outras células como células NK e neutrófilos, produzem NO e citocinas pró-inflamatórias que auxiliam no controle da parasitemia e, portanto, na

recuperação e saída do animal da fase aguda da doença.

Mas, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  fazem com que as células endoteliais vasculares expressem novos receptores de superfície (moléculas de adesão), tornando sua superfície endotelial mais aderente aos leucócitos (neutrófilos inicialmente e posteriormente monócitos e linfócitos), a exacerbação dos níveis dessas citocinas pode favorecer a ocorrência de babesiose cerebral. Todavia, em concentrações não exacerbadas o TNF- $\alpha$  juntamente com o IFN- $\gamma$  protegem os animais da *B. bovis* (fase aguda). Isso pode ser verificado a partir de alguns ensaios de proteção, em que East et al., (1997) comprovaram que as células mononucleares do sangue periférico de bovinos vacinados e protegidos da infecção por *B. bovis* produziam TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em quantidades significativamente maiores que os animais não-protegidos. Portanto, o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  são conhecidos como cofatores para estimular e aumentar os níveis de NO produzidos pelos macrófagos bovinos, apesar de não exibirem atividades babesicidas diretas (Adler et al., 1994, Goff et al., 1998, Stich et al., 1998).

Experimentos realizados por Shoda et al., (2000) mostraram que na fase aguda da infecção, a *B. bovis* induz macrófagos e citocinas regulatórias como IL-1, IL-12 e TNF- $\alpha$  que são importantes na resposta imune tanto inata quanto adaptativa contra o parasito.

### 2.6.3 Resposta imune humoral

Pode-se notar que a imunidade protetora contra a infecção aguda de *Babesia* envolve macrófagos ativados, células NK, neutrófilos, entre outras, mas, o controle da parasitemia durante a infecção persistente ou após infecção por *Babesia* envolve também anticorpos.

Sabe-se que os anticorpos são mais efetivos no controle da babesiose quando os parasitos estão livres, ou seja, antes de penetrar nos eritrócitos. Portanto, a função

protetora dos anticorpos está restrita a um curto período, que vai do momento em que o parasito entra na corrente sanguínea até a invasão dos eritrócitos. Nesse período os anticorpos neutralizam os esporozoítos de *Babesia* ou os merozoítos livres, no estágio extracelular (Abdalla et al., 1978, Hines et al., 1989, Winger et al., 1989).

A imunidade passiva, fornecida pelos anticorpos colostrais, é um fator determinante para o estabelecimento do equilíbrio parasito/hospedeiro. Bezerros são protegidos pelos anticorpos colostrais até mais ou menos os três meses de idade (James et al., 1985). Nesse período, os animais normalmente se tornam infectados com níveis máximos de anticorpos ocorrendo entre os quatro a cinco meses de idade (Mahoney et al., 1973). Avaliação dos níveis de anticorpos para *B. bovis* e *B. bigemina* em bezerros revelou títulos mínimos de anticorpos aos 29,6 dias de idade. A partir dessa faixa etária as primeiras parasitemias e a elevação dos títulos de anticorpos foram detectadas, o que indica imunidade ativa. A totalidade de bezerros soro reagentes ocorreu em média aos 74,6 dias para *B. bigemina* e 87,2 dias para *B. bovis* (Madruga et al., 1987).

Na babesiose, os níveis de anticorpos aumentam na fase aguda da infecção e declinam na fase crônica da doença. Meeusen et al., (1985) observaram que camundongos imunizados com *B. microti* produzem altos níveis de anticorpos da classe IgG, quando comparados a camundongos não-imunizados. Aparentemente, a resposta humoral era dependente da proliferação de células B de memória. Resposta humoral similar também é observada em bovinos pertencentes a áreas endêmicas para babesiose.

Estudos sobre a cinética da produção de anticorpos contra *B. bigemina*, utilizando o teste ELISA, mostraram que a IgM é detectada sete dias após a inoculação do parasito, alcançando níveis máximos no 12º dia com manutenção até o 22º dia e declínio a níveis baixos no 28º dia. A IgG segue a mesma cinética com início de

detecção no sétimo dia e níveis máximos no 12º dia, mas permanece alta por sete semanas (O'Donoghue et al., 1985, Figueroa, 1989).

Segundo Ruiz, et al. (2001) a soroconversão ocorre aos 14 dias após a inoculação dos animais com sangue parasitado com *B. bigemina* ou por infestação com carrapatos positivos. Entretanto, os títulos começam a declinar a partir do 33º dia, mas os animais permaneceram positivos por um período de 124 dias (término dos experimentos).

Em condições naturais, anticorpos anti *B. bigemina* foram detectados por imunofluorescência indireta por 4,5 semanas e anti *B. bovis* por 6,5 semanas após o desafio com carrapatos (Todorovic & Long, 1976).

Animais infectados por *B. bovis* necessitam de anticorpos para que haja proteção, mas, em alguns casos, estes anticorpos não são suficientes para protegê-los de uma nova infecção (Mahoney & Goodger, 1972, Mahoney et al., 1979).

Trabalho realizado por Sacco, (1996) mostrou que a detecção dos primeiros anticorpos específicos ocorreu duas a três semanas após a inoculação dos animais com sangue parasitado por amostra atenuada ou virulenta de *Babesia*, e após três a quatro semanas nos animais inoculados pelos carrapatos.

Apesar de ocorrer declínio dos anticorpos após a infecção aguda, os animais inoculados com *Babesia* desenvolvem baixas parasitemias e permanecem como portadores assintomáticos por quatro anos em média, para *B. bovis* e por até dois anos para *B. bigemina*. Isso revela que nesse período a imunidade do hospedeiro é estimulada constantemente (Mahoney et al., 1973).

A importância dos anticorpos na imunidade protetora contra *B. bovis* foi também verificada pela transferência passiva de soro imune ou misturas de IgG1 e IgG2 para bovinos esplenectomizados, mas

experimentos *in vitro* mostram que o soro hiperimune não afetava a viabilidade dos parasitos dentro dos eritrócitos infectados, o que permitiu inferir que os anticorpos *in vivo* agiam como opsoninas para macrófagos ativados (Mahoney, 1986). Em bovinos tanto a IgG1 quanto a IgG2 fixam complemento, mas a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação a IgG1 (McGuire et al., 1979).

Estudos que avaliam o papel da imunidade humoral em ensaios de imunoprofilaxia mostram que a proteção dos animais por imunoglobulinas é eficaz quando eles são desafiados por amostra homóloga de *Babesia*, mas não por amostra heteróloga. Provavelmente, o mecanismo envolvido nessa proteção homóloga deve-se à opsonização dos eritrócitos infectados ou atuação dos anticorpos junto aos merozoítos livres com posterior fagocitose por macrófagos. Na proteção heteróloga, a proteção também necessita da ativação de macrófagos para a realização da fagocitose, mas é dependente de epítomos T, conservados entre os isolados para que haja ativação de células T CD4<sup>+</sup> e conseqüentemente estimulação de linfócitos B e produção de IgG.

Estudos sobre a cinética da produção de anticorpos específicos (IgM e IgG) para *B. bovis* foram realizados, por intermédio do teste de imunofluorescência indireta, em bovinos foram imunizados com antígenos solúveis de cultura de *B. bovis* e desafiados com amostra virulenta de *Babesia*. 19 dias após o desafio, os animais vacinados possuíam altos títulos de anticorpos da classe G (diluição 1:48710). Os animais controles tinham picos mais baixos comparados aos títulos dos animais vacinados. Os animais vacinados apresentaram aumentos significantes de anticorpos IgG, logo após cada imunização com antígenos solúveis de *Babesia*. Esses valores voltaram ao normal 54 dias após e então, aumentaram novamente no 67º dia (19 dias após o desafio). Antes do desafio, os animais controle possuíam valores constantes, mas esses valores diminuíram seis dias após o desafio, coincidentemente com a parasitemia patente desses animais

(James et al., 1981). Os valores de IgM aumentaram após cada imunização, mas esse aumento foi estatisticamente significativo 19 dias após o desafio. Esse aumento de IgM precedeu a infecção patente de *B. bovis* tanto nos animais vacinados quanto nos animais controle. Baixos valores eram geralmente associados com os picos de parasitemia (James et al., 1981). Portanto, a depressão não-específica de IgG total (controle) e IgM (animais vacinados e controle) foi observada concomitantemente com o pico de parasitemia. Outras imunodepressões têm sido observadas em antígenos heterólogos em camundongos infectados com *B. microti*. A depressão de IgM e de IgG começou três dias depois do pico de parasitemia e permaneceu no máximo por quatro dias. Níveis de anticorpos específicos aumentaram após o período de infecção (Purvis, 1977).

Ross & Lörh (1968) verificaram respostas positivas em imunofluorescência aos sete e até aos quatro dias após a imunização dos animais.

Segundo Callow et al., (1974) e Waltisbuhl et al., (1987) não se deve correlacionar resposta imune humoral (IgG total) com resistência ao desafio, porém uma resposta positiva na sorologia indica que os animais estão infectados. Entretanto, segundo Brown & Palmer (1999), as imunoglobulinas IgG1 e IgG2 indicam uma resistência ao desafio e controlam a infecção por *B. bovis* devido à capacidade opsonizante, além de proteger o animal por longos períodos após o contato com o parasito. Segundo esses autores os linfócitos T CD4<sup>+</sup> induzem a produção de IgG2, e de IFN- $\gamma$ .

#### 2.6.4 Resposta imune celular

A imunidade contra a infecção por *Babesia* requer tanto a resposta imune inata quanto a adquirida, inclusive a resposta humoral e celular. Isso pode ser explicado pelo fato da *Babesia* ser um parasito intraeritrocitário obrigatório e dos eritrócitos não possuírem complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o que revela, portanto, a

importância das células T CD4<sup>+</sup> restritas ao MHC classe II como ligação entre a resposta imune inata e adaptativa e não as células T CD8<sup>+</sup> restritas ao MHC de classe I (Brown & Palmer, 1999, Brown, 2001).

As células T CD4<sup>+</sup> são importantes para coordenar a produção de anticorpos da classe IgG de alta afinidade e para ativar macrófagos por meio da produção de IFN- $\gamma$ . Segundo Kumaratilake & Ferrante, (1992), Fell et al., (1994), Brown & Rice-Fichet, (1994) e Brown et al., (1995b), a imunidade adaptativa é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pois estes possuem papel fundamental na produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que por sua vez contribuem para a estimulação de linfócitos B, com conseqüente produção de imunoglobulinas de alta afinidade (IgG1 e IgG2), e para a ativação de neutrófilos e de macrófagos responsáveis pela fagocitose e também para a produção de intermediários do nitrogênio reativo e de oxigênio que são tóxicos para o parasito.

A importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> também foi verificada nas infecções por *B. microti*, na qual os camundongos BALBc atímicos apresentaram altas parasitemias (30-60%) em relação a camundongos normais (< 0,15%) (Igarashi et al., 1999). Parasitemias altas foram observadas em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti CD4<sup>+</sup> quando comparados aos animais que recebiam anticorpos anti CD8<sup>+</sup>. Mas não foi detectada alteração na produção de imunoglobulinas específicas contra *B. microti* (Igarashi et al., 1999).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> exercem um papel importante no controle da maturação da resposta imune humoral pela síntese seletiva de citocinas que regulam a mudança de subclasses de IgG, durante a infecção. A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina 4 (IL-4) enquanto que o IFN- $\gamma$  estimula a produção de IgG2 (Estes et al., 1995). Esses resultados foram confirmados por Brown et al., (1995b), quando observaram que clones de células T CD4<sup>+</sup> produtores de

IFN- $\gamma$ , específicos para RAP-1 de *B. bigemina*, induziam aumento nos níveis de IgG2 produzidos por linfócitos B e que células T com padrão misto de citocinas do tipo zero, capazes de co-expressar IL-4 e IFN- $\gamma$ , forneciam sinais co-estimuladores necessários para o aumento da síntese de IgG1 e IgG2 por células B.

Esses dados mostram em conjunto que a resposta imune resultante da infecção por *Babesia* é conseqüência de um somatório de múltiplos 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. Além do papel no controle da imunidade humoral, as citocinas desempenham importantes funções imunorreguladoras sobre as células T. A IL-10 tem como função inibir a inflamação imune específica inata e a mediada pelas células T, isso ocorre porque a IL-10 inibe a produção de citocinas pelos macrófagos como IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$ , além da função acessória dos macrófagos na ativação de células T. A função da IL-1 é semelhante ao do TNF- $\alpha$ , ou seja, mediar a resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata, enquanto que a IL-2 estimula o crescimento de células NK facilitando sua ação citolítica, e de células B, agindo como estímulo para a síntese de anticorpos. Experimentos com IL-10 humana recombinante apontam que essa citocina suprimiu a proliferação de linfócitos T bovinos e a produção de IFN- $\gamma$ , sendo esse efeito dependente de macrófagos (Chito-McKown et al., 1995).

Estudos *in vitro* com diversos clones de células T CD4<sup>+</sup>, estimuladas com antígenos de *B. bovis*, objetivando mostrar o efeito da IL-12 e da IL-4 na modulação da expressão de citocinas mostraram que IL-12 é produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas e é capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por clones de células T CD4<sup>+</sup>, mas não aumenta a taxa de proliferação celular ou expressão de RNAm de IL-12 (Manetti et al., 1994, Brown et al., 1996, Tuo et al., 1999). Porém, os autores não puderam definir o efeito da IL-4 sobre

os clones analisados devido à heterogeneidade dos resultados obtidos. Em clones de células T antígeno específicas de bovinos a IL-4 age inibindo, ou aumentando a produção de IFN- $\gamma$ , ou não apresenta efeito algum (Tuo et al., 1999).

A IL-12 além de induzir a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T, também induz a produção pelas células NK. Além disso, essa citocina age como fator de diferenciação sobre as células T CD4<sup>+</sup> para um padrão de resposta do tipo 1 e como potencializador das funções citolíticas das células NK e T CD8<sup>+</sup> ativadas. Portanto, a IL-12 age como um mediador da imunidade inata e da citotoxicidade, porque ela liga a ativação de macrófagos ao desenvolvimento das funções efectoras células NK, ao mesmo tempo em que favorece o desenvolvimento de respostas imunes específicas.

A IL-4 tem como principal função regular as reações imunes mediadas pela IgE e por mastócitos/eosinófilos, mas age como fator de crescimento e diferenciação para células T, em particular células com perfil de citocinas do tipo 2, além de estimular moléculas de adesão como a molécula de adesão vascular do tipo 1 (VCAM-1).

Segundo Brown et al., (1993b, 1994), Brown & Estes, (1997), o nível clonal da resposta imune para *B. bovis* é primariamente do tipo zero, devido ao perfil de citocinas composto de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Entretanto, o perfil do tipo 1 indicado para os clones de células T de *Babesia* se deve aos níveis superiores de INF- $\gamma$  que de IL-4. O perfil misto de resposta do tipo zero, também é observado nas respostas imunes em humanos frente a vários patógenos, o que indica que o dogma descrito inicialmente no modelo murino de resposta do tipo 1 e do tipo 2 não é necessariamente polarizado. Clones de células T do tipo 2 para *Babesia* não têm sido encontrados (Brown, 2001).

Estudos prévios em bovinos já haviam verificado que um dos efeitos biológicos da

IL-4 era aumentar a expressão de marcadores de superfície em linfócitos B, tais como CD23, IgM e MHC II, além de aumentar a produção de IgG1 e IgE (Estes et al., 1995).

Vários estudos têm confirmado a importância do IFN- $\gamma$ , produzido por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, na proteção contra a babesiose bovina. Em 1998, Stich et al., observaram a produção de óxido nítrico em macrófagos bovinos estimulados *in vitro* com antígenos de membrana de *B. bovis* e com sobrenadante de cultura de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas contendo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  endógenos. Esses achados sugerem que o aumento da expressão da iNOS em macrófagos pode ser indicativo do potencial babesicida do óxido nítrico. Todavia, a superprodução de NO também pode estar associada a mecanismos patogênicos da infecção, incluindo a babesiose cerebral (Grau et al., 1989).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

- Analisar o impacto da intervenção vacinal com peptídeo de rhoptria de *Babesia bovis*, no perfil parasitológico e imunológico da infecção experimental por *Babesia bovis*

#### 3.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar o potencial imunogênico de um peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* em bovinos imunizados, considerando:
  - avaliação clínica dos animais;
  - perfil celular do sangue periférico dos animais;
  - estimulação antígeno-específica *in vitro* na linfoproliferação e na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais imunizados e
  - dinâmica de IgG anti-*Babesia bovis* e anti-peptídeo sintético de RAP-1 no soro dos animais imunizados.
2. Avaliar o impacto da imunização com peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*

no perfil parasitológico e imunológico de bovinos, após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis*, considerando:

- avaliação clínica dos animais em estágios recentes e tardios da infecção;
- avaliação parasitológica nos estágios recentes e tardios da infecção por *Babesia bovis*;
- perfil celular do sangue periférico nos estágios recentes e tardios da infecção por *Babesia bovis*;
- estudo do impacto da estimulação antígeno-específica *in vitro* na linfoproliferação e na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico, nos estágios recentes e tardios da infecção por *Babesia bovis* pós-vacinação experimental e
- dinâmica de IgG anti-*Babesia bovis* e anti-peptídeo sintético de RAP-1 nos estágios recentes e tardios da infecção por *Babesia bovis* pós-vacinação experimental.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização do experimento

O trabalho experimental foi realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa e no Laboratório de Doenças de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz.

### 4.2 Animais experimentais

Foram utilizados, nos ensaios de imunização, 15 bovinos *Bos taurus*: nove animais da raça Holandesa, três da raça Suíça e três Hereford, com idades superiores a 12 meses. Os animais Hereford e Suíços foram provenientes do município de Santa Vitória dos Palmares, Rio Grande do Sul, área livre de carrapatos, e foram mantidos em isolamento. Os animais da raça holandesa foram adquiridos de propriedades leiteiras da região de Belo Horizonte, logo após o nascimento e ingestão do colostro. Após

banho carrapaticida os animais foram levados para o isolamento para doenças hemoparasitárias da Universidade Federal de Viçosa onde permaneceram durante todo o experimento. Nos dois primeiros meses cada animal recebeu diariamente seis litros de leite e 250 g de ração. Dos três aos seis meses os animais receberam 426 g de ração (16% de proteína) e 2,664 Kg de matéria seca (feno) e, acima de sete meses receberam 710 g de ração (12% de proteína) e 4,439 Kg de matéria seca (feno). Em todas as fases os animais receberam água *ad libitum*.

Os animais foram considerados livres de hemoparasitoses quando apresentaram dois exames sorológicos negativos para *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*.

### 4.3 Grupos experimentais:

Foram formados três grupos compostos de cinco animais cada, independentes do sexo, mas homogêneos quanto às raças, conforme Tabela 1:

**Tabela 1:** Composição dos grupos experimentais mantidos em isolamento

Grupos	Animal N°	Raça	Sexo
<b>Peptídeo</b>	03	Hereford	Fêmea
	15	Holandesa	Macho
	16	Holandesa	Macho
	18	Holandesa	Macho
	19	Suíça	Macho
<b>Saponina</b>	01	Holandesa	Macho
	11	Hereford	Fêmea
	12	Holandesa	Macho
	13	Suíça	Macho
	17	Holandesa	Macho
<b>Controle</b>	02	Holandesa	Macho
	04	Holandesa	Macho
	07	Holandesa	Macho
	08	Holandesa	Macho
	09	Suíça	Macho

### 4.4 Peptídeo sintético 23290

A origem desse peptídeo se deu a partir de estudos de predição computacional baseados na estrutura íntegra da proteína associada à rhoptrias de *B. bovis* (RAP-1) em que foram desenvolvidos dois peptídeos sintéticos que induziram *in vitro* a



produção de células T e células B (5081 e 5084, respectivamente) (Patarroyo et al., 1999).

O peptídeo sintético 23290 foi desenvolvido e produzido pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários em conjunto com o Instituto Fundación de Immunología da Colômbia de acordo com a metodologia descrita por Merrifield (1963).

#### 4.5 Imunização

A capacidade do peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* (23290) de induzir imunidade protetora em bovinos foi avaliada mediante o ensaio com três grupos de bovinos mantidos em iguais condições ambientais (Tabela 1):

**Grupo Peptídeo** - constituído de cinco animais que receberam, por via subcutânea, dois mg de peptídeo sintético nos dias zero, 30 e 60. O antígeno foi emulsionado em 1,5 mg de adjuvante saponina diluídos em um mL de soro fisiológico.

**Grupo Saponina** - constituído de cinco animais que foram inoculados por via subcutânea, com 1,5 mg de saponina diluídos em um mL de soro fisiológico no mesmo esquema do Grupo Peptídeo.

**Grupo Controle** - constituído de cinco animais inoculados com um mL de soro fisiológico estéril por via subcutânea em três doses no mesmo esquema do Grupo Peptídeo.

#### 4.6 Desafio

Todos os animais experimentais foram inoculados, 30 dias após receberem a última inoculação do ensaio de imunoproteção, por via endovenosa, com dois mL de sangue com  $5 \times 10^8$  hemácias parasitadas com *B. bovis* amostra virulenta (Bbo UFV1, sétima passagem), comprovadamente patogênica, isolada a partir de infecção natural de campo e mantida criopreservada em nitrogênio líquido, no Instituto de Biotecnologia

Aplicado à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa.

#### 4.7 Avaliação parasitológica e imunológica antes e após o desafio

Para a realização do estudo cinético de parâmetros parasitológicos e imunológicos amostras biológicas foram coletadas, em diferentes intervalos durante a realização dos experimentos. Para facilitar a identificação do período da coleta da amostra, foi utilizado o seguinte critério de identificação: o dia do desafio foi considerado como dia zero (D0) e a primeira, segunda e terceira imunizações foram consideradas como os dias D -90, D -60 e D -30, respectivamente. Amostras coletadas após o desafio foram identificadas em ordem seqüencial referente ao dia da coleta. Pequenas variações nessas datas durante a realização dos experimentos ocorreram em função de impedimentos decorrentes do transporte do material biológico de Viçosa para Belo Horizonte ou limitações metodológicas.

##### 4.7.1 Coleta de sangue e soro

Amostras de sangue foram colhidas em tubos vacutainer, por punção da veia jugular sempre no período da manhã.

Para a realização da técnica da Hidroetidina (avaliação parasitológica) e da Imunofenotipagem dos linfócitos circulantes periféricos (avaliação resposta celular no contexto *ex vivo*) amostras de sangue foram colhidas com anticoagulante (EDTA). Para os ensaios de proliferação celular (avaliação resposta celular no contexto *in vitro*) as amostras foram colhidas em tubos com heparina. Para avaliação da resposta humoral, amostras de sangue foram colhidas sem anticoagulante para obtenção de soro.

##### 4.8 Avaliação clínica dos animais

Antes do desafio, os animais mantidos no isolamento foram avaliados diariamente pela observação clínica (alteração no

comportamento), no momento em que se distribuía a alimentação.

Posteriormente ao desafio, os animais foram avaliados também por observação clínica e por determinação do volume globular (técnica de microhematócrito), aferição da temperatura retal e esfregaços sanguíneos de ponta de orelha.

A associação de resultados obtidos nos exames laboratoriais (volume globular e parasitemia) e clínicos (temperatura retal, comportamento e sinais clínicos como anemia, anorexia e sintomatologia nervosa) serviram de parâmetros para avaliar a necessidade de intervenção medicamentosa para cada animal.

Os animais que necessitavam de tratamento, ou seja, apresentavam hematócrito abaixo de 12% e ou início de babesiose cerebral receberam diaceturato de 4,4 diazoaminodibenzamida (Ganaseg<sup>®</sup>) na dosagem de 3,5 mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, em dose única.

#### **4.9. Avaliação parasitológica**

A avaliação parasitológica dos animais, depois do desafio, foi realizada utilizando a técnica de hidroetidina, conforme descrita abaixo (item 4.10.2). Essa avaliação objetivou evidenciar ausência de infecção natural dos animais mantidos em isolamento.

Após o desafio, a avaliação parasitológica foi realizada por meio de esfregaço de ponta de orelha e/ou cauda (item 4.10.1) e pela técnica de hidroetidina. Essa avaliação objetivou avaliar parasitemia dos animais desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*.

##### **4.9.1 Determinação da parasitemia por esfregaço de ponta de orelha e/ou cauda**

Os esfregaços foram preparados de sangue capilar obtido da extremidade da orelha e/ou ponta da cauda, corados com Panótico rápido e examinados em microscópio ótico com objetiva de imersão

para o diagnóstico parasitológico. A parasitemia foi determinada sob microscopia ótica de imersão e pela percentagem de eritrócitos parasitados observados em dez campos microscópicos.

##### **4.9.2 Determinação da parasitemia por citometria de fluxo. Marcação com Hidroetidina**

A parasitemia de *Babesia bovis* no sangue periférico dos animais experimentais foi determinada conforme metodologia descrita por Wyatt et al. (1991) e modificada por Bicalho (2001).

Essa metodologia permite distinguir hemácias parasitadas das hemácias não parasitadas ou que contenham parasitos mortos. Para isso utilizou-se a Hidroetidina, um fluorocromo de DNA, que é incorporado ao DNA do parasito, após sua metabolização e conversão para etídeo pela *Babesia* (Wyatt et al., 1991).

Inicialmente, 200µL do sangue colhido em EDTA foram adicionados a dois mL de solução salina e centrifugados a 2000g, por sete minutos à temperatura ambiente para a remoção do plasma e da papa de leucócitos. A papa de hemácias foi ressuspendida em dois mL de solução salina e novamente lavada por centrifugação conforme já foi descrito. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado com auxílio de pipeta de Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo sendo que cincoµL da papa de hemácias foram adicionados a 500µL de solução salina (suspensão de hemácias) e utilizados para a realização da marcação com hidroetidina.

As reações foram realizadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U. Uma suspensão de hemácias de 50 µL foi adicionada a 150µL de solução de hidroetidina (25µg/mL) e incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 2000g por sete minutos e à temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento foram adicionados 200µL de solução salina

objetivando a homogeneização das hemácias para posterior transferência para tubos de FACs de um mL e leitura imediata no Citômetro de Fluxo FACSCalibur - Becton Dickinson.

#### 4.9.3 Análise das marcações por hidroetidina

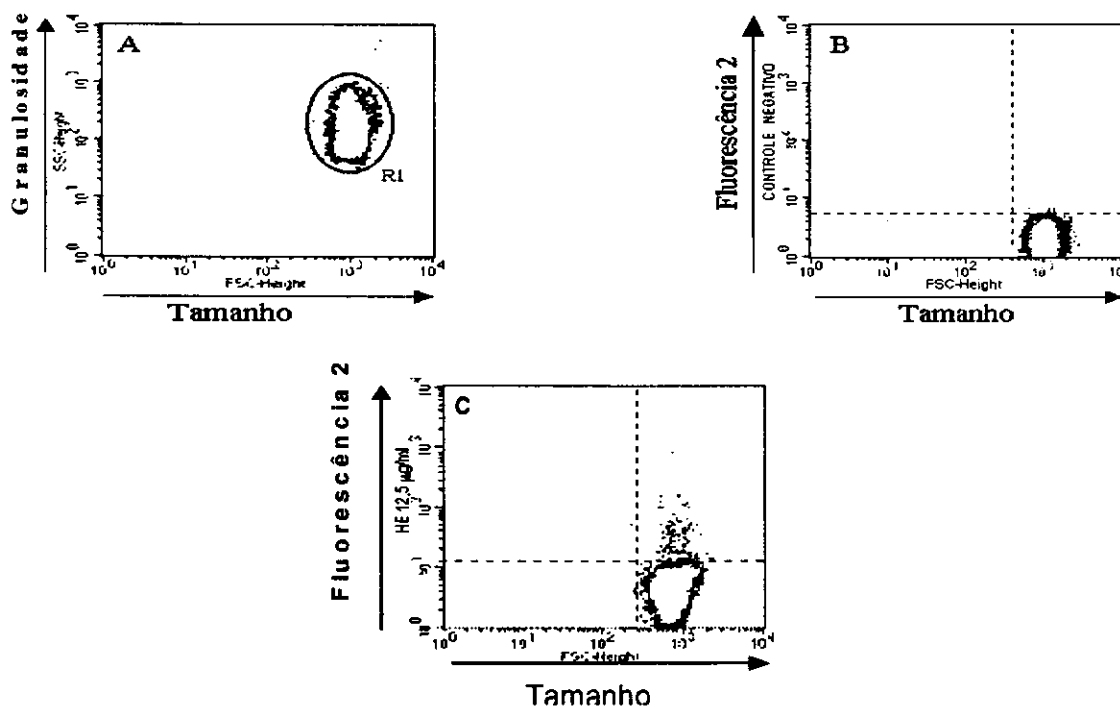
Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson). De cada amostra foram analisadas 30 mil células.

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema ótico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC - Forward Scatter), granulidade ou complexidade interna (SSC - Side Scatter) e fluorescência.

A análise das hemácias foi feita primeiramente pela seleção da população

celular de interesse e depois, pelos gráficos de distribuição pontual de fluorescência em função do número de hemácias. Analisou-se a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada (Figura 1). Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelas hemácias após incubação com hidroetidina foram expressos em percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP).

O PHFP foi determinado para cada amostra por meio de um limiar de negatividade que permitia a separação entre hemácias positivas e negativas em função da intensidade de fluorescência. Para fins de controle de qualidade, após o posicionamento do marcador, seguia-se o critério de se obter um valor de PHFP < 0,09%. Para todas as amostras analisadas realizava-se um controle sem adição de hidroetidina, denominado controle de salina.



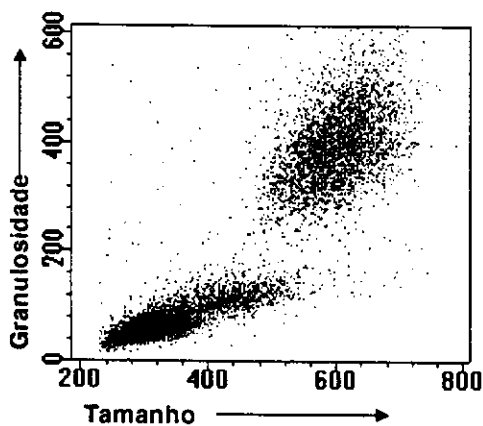
**Figura 1:** Representação esquemática da seqüência das análises dos dados obtidos por citometria de fluxo. Gráficos de fluorescência, representando o percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP). **A:** seleção da população de hemácias, **B:** controle negativo após incubação com hidroetidina e **C:** controle positivo após incubação com hidroetidina.

#### 4.10 Avaliação da resposta imune celular no contexto *ex vivo*

##### 4.10.1 Padronização dos anticorpos monoclonais anti CD4, CD8 e CD21 bovinos utilizados para os ensaios de citometria de fluxo

O início da padronização dos anticorpos monoclonais se deu com a padronização da lise de sangue total de bovino. Para tanto, cinco mL de sangue foram colhidos da jugular de bovino, à vácuo, em tubo contendo EDTA e posteriormente lisado utilizando-se 50  $\mu$ L de sangue total acrescidos de um ou dois mL de solução de lise (FACS™ Lysing Solution).

Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por três, cinco e sete minutos e foram submetidos à centrifugação por sete minutos, à 1800g. Após o descarte do sobrenadante, acrescentou-se dois mL de PBS resfriado e o material foi novamente submetido à centrifugação. As células obtidas após o descarte do sobrenadante foram ressuspensas em 200 $\mu$ L de PBS e levadas ao citômetro de Fluxo FACScalibur para análise da lise. Conforme apresentado na Figura 2 a melhor lise ocorreu com dois mL de FACS™ Lysing Solution e incubação por cinco minutos.



**Figura 2:** Perfil dos leucócitos periféricos bovinos, após a lise do sangue periférico com solução de lise (FACS™ Lysing Solution) e incubação por cinco minutos.

Os anticorpos reveladores anti-bovinos CD4, CD8, e anti-camundongo marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o CD21 anticorpo anti-bovino purificado, utilizados para os ensaios de imunofluorescência foram obtidos comercialmente por intermédio da Serotec e Sigma.

A titulação específica para cada anticorpo foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se quantidades específicas (1,0; 0,5; 0,25; 0,12 $\mu$ L) para cada anticorpo diluído em 15 $\mu$ L de PBS. Os anticorpos diluídos foram adicionados a 30  $\mu$ L de suspensão de sangue total de bovinos e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a lise e lavagem com PBS, os leucócitos foram analisados e pode-se observar que as quantidades de 0,12 $\mu$ L de CD4 0,5 $\mu$ L de CD8 e 1,0 $\mu$ L de CD21 melhor discriminaram populações celulares não-marcadas das marcadas.

##### 4.10.2 Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos

Os ensaios de citometria de fluxo para a imunofenotipagem dos linfócitos periféricos foram realizados conforme o seguinte protocolo desenvolvido especificamente para este estudo: em tubos de cinco mL contendo 15  $\mu$ L de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 bovino marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anticorpo anti-CD21 bovino purificado foram adicionados 30  $\mu$ L de sangue colhido em EDTA. Após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, acrescentou-se 50 $\mu$ L do anticorpo secundário marcado com FITC ao tubo contendo anti-CD21 purificado. Após incubação, todas as preparações celulares foram submetidas à lise de eritrócitos, acrescentando-se dois mL de solução de lise (FACS™ Lysing Solution). Os leucócitos totais foram lavados em PBS, fixados com 200 $\mu$ L de solução fixadora (paraformaldeído 1% em tampão cacodilato de sódio 10g/L, pH 7,2) e analisados no citômetro de Fluxo FACScalibur – BECTON DICKINSON.

#### 4.10.3 Análise da Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos

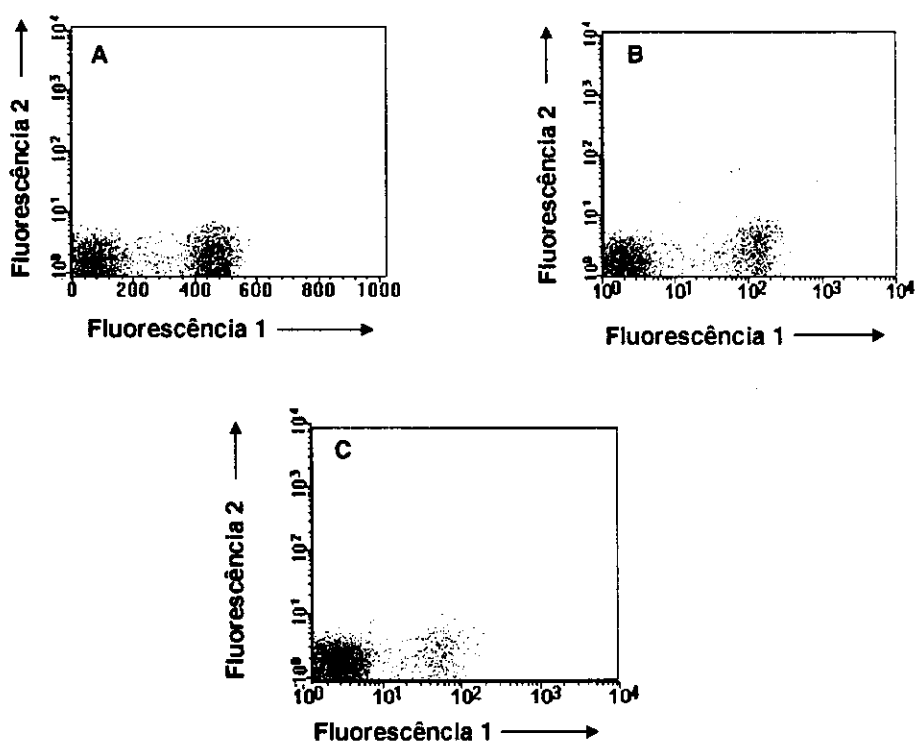
A análise dos leucócitos foi realizada por meio da identificação de populações celulares distintas, baseada em parâmetros de tamanho, granulosidade e marcação da superfície celular com os anticorpos monoclonais que quando excitados emitiam sinais luminosos correspondentes a fluorescência do tipo um (fluorescência verde). Para a análise utilizou-se o programa CellQuest (Becton Dickinson), e de cada amostra foram analisadas dez mil células (Figura 3).

#### 4.11 Avaliação da resposta imune celular no contexto *in vitro*

##### 4.11.1 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As amostras sanguíneas colhidas com anticoagulante foram colocadas lentamente sobre uma mistura de ficoll-hypaque (Sigma), na proporção de 1:1, e, centrifugadas a 1400g, por 40 min a 20°C.

O anel de células mononucleares foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur e transferido para tubo de 50 mL (Falcon) contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio (RPMI incompleto). As células ressuspensas com meio de cultura RPMI foram lavadas três vezes por centrifugação (1400 g, 10min a 4°C) e homogeneizadas com um mL de meio de cultura. Posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para  $10 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI incompleto.



**Figura 3:** Representação gráfica da população de linfócitos bovinos marcada com o anticorpo monoclonal anti CD4 (A), CD8 (B) e CD21 (C), nas quantidades de 0,12 $\mu$ L, 0,5 $\mu$ L e 1,0 $\mu$ L.

#### **4.11.2 Cultivo das células mononucleares do sangue periférico e marcação com timidina tritiada**

O teste de proliferação celular foi realizado em placas de fundo chato de 96 poços (Corning) em triplicatas. O meio de cultura foi constituído de RPMI 1640 suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio, 3mM de L-Glutamina (SIGMA), ácido fólico, arginina e asparagina, 3% de uma mistura de antibióticos e antimicótico (10.000 U/mL de penicilina, dez mg/mL de estreptomina e 25 µL/mL de anfotericina B, SIGMA) e 10% de soro fetal bovino, inativado.

A cada poço foram acrescentados 150µL do meio completo, 25µL da suspensão de células e 25µL do antígeno ou do meio de cultura (controle).

Como antígeno utilizou-se o peptídeo sintético 23290 (2µg/mL) e como mitógeno utilizou-se Concanalina-A (Con-A) (Sigma) na concentração de (2µg/mL).

As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por três dias no caso do mitógeno ou cinco dias nas culturas estimuladas por antígeno. Após esse período de incubação as células foram marcadas com 0,5µCi de timidina tritiada, ([metil-3H]-timidina) por poço, com atividade específica=6,7 Ci/nmol, (NEN Research products, DuPont, Boston, USA) e re-incubadas por mais seis horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram coletadas em papel fibra de vidro (Whatman Inc., Clifton, USA) com auxílio de coletor automático de células (Biomedical Research and Development Lab., Rockville, USA). O papel de fibra de vidro contendo as células foi seco à temperatura ambiente e colocado em frascos de cintilação líquida.

Posteriormente, foram acrescentados 3,5 mL de coquetel de cintilação (333 mL de Triton-X100, SIGMA; 5g de Pop (2,5 Difetiloxazol); 0,1g de POPOP(1,4- bis-[2-(5-fenitoxazolil)]-benzeno), Fisher Scientific Co, Fair Lawn, USA), em 1L de tolueno). A radioatividade foi determinada em cintilador

Beckman. As amostras foram contadas por dois minutos. Cada ensaio foi realizado em triplicata, sendo os resultados expressos em contagens por minuto (cpm) e os dados analisados pelo índice de estimulação (IE), calculado como a média de cpm das culturas estimuladas com antígeno, dividida pela média de cpm das culturas não estimuladas (controle). Foram considerados positivos os IE ≥ 5,0.

#### **4.11.3 Estimulação *in vitro* das células mononucleares de sangue periférico com o peptídeo sintético 23290**

A suspensão celular contendo 10x10<sup>6</sup> células/mL (125µL) foi adicionada em cada poço de controle e antígeno contendo 750µL do meio RPMI completo (3mM de L-Glutamina (SIGMA), ácido fólico, arginina e asparagina, 3% de 10.000 U/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomina, β-mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino).

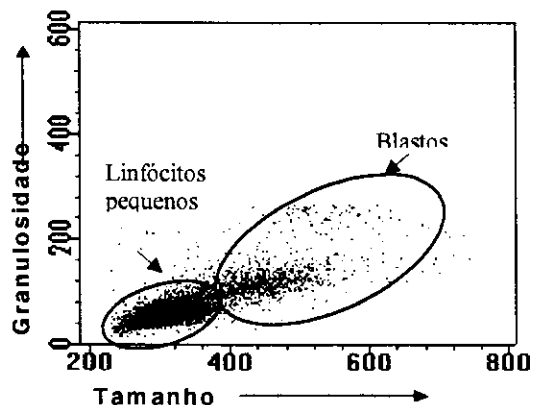
Aos poços do antígeno foram acrescentados 125µL do antígeno (2µg/mL) e aos de controle acrescentou-se 125µL de RPMI incompleto. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por cinco dias.

Após esse período os sobrenadantes de culturas foram armazenados em eppendorfs e congelados a -70°C para posterior análise do perfil de citocinas.

#### **4.11.4 Imunofenotipagem das células mononucleares mantidas em cultivo sob estimulação do peptídeo sintético 23290 e análise por citometria de fluxo**

As células cultivadas sob estímulo do peptídeo sintético foram ressuspendidas com auxílio de pipeta automática, transferidas para tubos de Facs de 5mL contendo meio de cultura incompleto e centrifugadas a 1800g, sete minutos a 4°C. O pellet de células foi ressuspendido em 250µL de PBS e posteriormente, procedeu-se a imunofenotipagem dos linfócitos conforme descrito no item 4.10.2. A análise fenotípica dos linfócitos pequenos e blastos

foi feita conforme descrito no item 4.10.3 (Figura 4).



**Figura 4:** Representação gráfica da população de linfócitos pequenos e blastos de bovinos mantidos em cultura sob estimulação do peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*.

#### 4.12 Avaliação da resposta imune humoral

##### 4.12.1 Teste imunoenzimático ELISA para determinação do perfil de anticorpos (IgG total) anti - *Babesia bovis*.

O teste ELISA foi realizado de acordo com a técnica descrita por Waltisbuhl et al., (1987).

A reação foi executada em microplacas de poliestireno (Hemobag®). O antígeno de *B. bovis* (5µg/well) foi diluído em solução tampão de cobertura carbonato - bicarbonato de sódio pH 9,6 (0,159g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,293g de NaHCO<sub>3</sub>, e água destilada qsp 100mL) e adsorvido à placa. Cada orifício da placa recebeu 100 µl dessa mistura, seguindo-se incubação durante 18 horas a 4°C.

Após a incubação, o excesso da solução antigênica foi removido dos orifícios por uma série de duas lavagens com solução de PBS pH 7,6 (8,5g de NaCl, 1,28g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,16g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e água destilada qsp 1000mL), contendo Tween-20 a 0,05% e procedeu-se um

bloqueio com solução de caseína 2% em PBS pH 7,6 por 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente às lavagens da placa para retirada do tampão de bloqueio à placa foi incubada por duas horas a temperatura ambiente com soros dos bovinos do experimento diluídos 1:100 em tampão de incubação (100mL de PBS pH 7,6, caseína 0,25% e Tween-20 0,05%).

Após lavagens com tampão de lavagem, adicionou-se a cada orifício 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG de bovino (1:20.000) marcado com peroxidase (SIGMA). Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL do substrato composto de 4mg de OPD (θ fenildiaminobenzeno), 2,5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mL de tampão de substrato pH 5,0 (7,19g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,19g de ácido cítrico e água destilada qsp 1000mL) e incubada na ausência de luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 30µL de ácido sulfúrico (1:20) e em seguida a placa foi lida em leitor de microplacas com filtro de comprimento de onda de 492nm (Titertek Multiskan® PLUS). A determinação da absorvância discriminante foi feita através da média dos valores de soros de 50 camundongos negativos, acrescida de dois desvios padrões (Richardson et al., 1983).

##### 4.12.2 Teste imunoenzimático ELISA para determinação do perfil de anticorpos (IgG total) anti-peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*.

O teste ELISA foi realizado conforme descrito no item 4.13.1, porém à placa foi adsorvido o peptídeo sintético de RAP-1 em substituição ao antígeno bruto de *B. bovis*.

#### 4.13 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita por intermédio da análise de variância (ANOVA), seguido de Teste T de Student. Os cálculos estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software Minitab for windows. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente

significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

Considerando o grande número de informações geradas neste estudo e com o objetivo de facilitar a identificação das diferenças estatísticas entre os inúmeros parâmetros avaliados, foi adotado um critério para destacar as variáveis que apresentaram alterações significativas. Dessa forma, nos resultados apresentados em tabelas será adotado o critério em que as informações descartadas em azul representam diferenças significativas. No caso das figuras, a região com predomínio de diferenças significativas encontra-se destacada por um retângulo pontilhado, sendo utilizada uma seta para identificar o dia exato no qual as alterações foram detectadas.

### 5.1 Avaliação do perfil parasitológico e imunológico dos bovinos experimentais.

#### 5.1.1 Avaliação clínica

Os animais do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle, mantidos em isolamento, não apresentaram nenhuma alteração significativa de temperatura retal, volume globular e/ou sintomatologia clínica durante os 90 dias que estavam sendo submetidos ao processo de imunização (dados não apresentados).

#### 5.1.2 Avaliação da ausência de infecção natural por *B. bovis* nos animais experimentais.

Os animais experimentais do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e do Grupo Controle não apresentaram parasitemia detectável por esfregaço sangüíneo ou pela técnica de hidroetidina, durante o período de imunização (90 dias). Pela técnica de hidroetidina o percentual de hemácias fluorescentes positivas (PHFP) apresentou abaixo do nível de negatividade ( $< 0,090$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Percentual de hemácias fluorescentes positivas nos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.

Grupo	Percentual de hemácias fluorescentes		
	D - 90	D - 60	D - 30
Peptídeo	0,09 ( $\pm 0,04$ )	0,04 ( $\pm 0,02$ )	0,05 ( $\pm 0,03$ )
Saponina	0,06 ( $\pm 0,03$ )	0,07 ( $\pm 0,02$ )	0,04 ( $\pm 0,02$ )
Controle	0,06 ( $\pm 0,06$ )	0,12 ( $\pm 0,06$ )	0,07 ( $\pm 0,02$ )

### 5.1.3 Celularidade do sangue periférico dos animais experimentais

#### 5.1.3.1 Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T, B e células não T não B (NTNB)

O percentual de células T totais nos grupos experimentais não variou durante o período, sendo as médias do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle, de  $51,37 \pm 0,58$ ;  $46,29 \pm 0,92$  e  $47,52 \pm 0,77$ , respectivamente. Pode-se observar que os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo possuíam percentagem de linfócitos T totais ( $T CD4^+ + T CD8^+$ ) maior que o Grupo Controle e Grupo Saponina (Tabela 3).

Em relação aos linfócitos B  $CD21^+$  pode-se observar que os animais do Grupo Peptídeo possuíam as menores percentagens de linfócitos B  $CD21^+$  quando comparados ao Grupo Saponina e Grupo Controle. A percentagem de linfócitos B  $CD21^+$  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 ( $x = 19,51 \pm 1,66$ ) conforme pode ser observado na Tabela 3.

Apesar de haver discretas elevações ou quedas das percentagens de células T e B essas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



Entre as células NTNB estão, por exemplo, as células NK e os neutrófilos. Após análise das células NTNB pode-se observar que na primeira imunização o Grupo Saponina possuía o maior percentual dessas células ( $38,25 \pm 7,64$ ) quando comparado ao Grupo Peptídeo ( $34,57 \pm 13,33$ ) e Grupo Controle ( $32,97 \pm 9,47$ ). Essa média superior aos demais grupos permaneceu por todo o período de imunização (Tabela 3).

Na terceira imunização o Grupo Peptídeo apresentou uma diminuição da percentagem das células NTNB ( $30,90 \pm 14,33$ ) enquanto que 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.

**Tabela 3:** Média das percentagens dos linfócitos T totais ( $CD4^+ + CD8^+$ ), B  $CD21^+$  e NTNB no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.

Grupo	Percentagem linfócitos T totais		
	D - 90	D - 60	D - 30
<b>Peptídeo</b>	50,72 ( $\pm 17,55$ )	51,59 ( $\pm 15,77$ )	51,81 ( $\pm 19,08$ )
<b>Saponina</b>	47,28 ( $\pm 8,25$ )	46,11 ( $\pm 7,80$ )	45,47 ( $\pm 5,76$ )
<b>Controle</b>	46,64 ( $\pm 15,40$ )	48,05 ( $\pm 15,75$ )	47,87 ( $\pm 16,48$ )

Grupo	Percentagem linfócitos B $CD21^+$		
	D - 90	D - 60	D - 30
<b>Peptídeo</b>	14,71 ( $\pm 8,93$ )	13,67 ( $\pm 8,30$ )	17,29 ( $\pm 8,71$ )
<b>Saponina</b>	14,46 ( $\pm 4,88$ )	14,60 ( $\pm 5,36$ )	16,02 ( $\pm 5,07$ )
<b>Controle</b>	20,39 ( $\pm 10,11$ )	20,53 ( $\pm 8,53$ )	17,59 ( $\pm 8,64$ )

Grupo	Percentagem células NTNB		
	D - 90	D - 60	D - 30
<b>Peptídeo</b>	34,57 ( $\pm 13,33$ )	34,73 ( $\pm 11,87$ )	30,90 ( $\pm 14,33$ )
<b>Saponina</b>	38,25 ( $\pm 7,64$ )	39,28 ( $\pm 9,97$ )	38,50 ( $\pm 10,15$ )
<b>Controle</b>	32,97 ( $\pm 9,47$ )	31,42 ( $\pm 8,61$ )	34,54 ( $\pm 9,85$ )

### 5.1.3.2 Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos $T CD4^+$ e $T CD8^+$

A avaliação, por citometria de fluxo, da percentagem de linfócitos  $T CD4^+$  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 houve diferença estatística da percentagem de linfócitos  $T CD4^+$  entre os grupos durante as intervenções (Tabela 4).

A percentagem de linfócitos  $T CD8^+$  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. A Tabela 4 apresenta as médias e os desvios padrões.

**Tabela 4:** Média das percentagens dos linfócitos  $T CD4^+$  e  $T CD8^+$  no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle

Grupo	Percentagem linfócitos $T CD4^+$		
	D - 85	D - 55	D - 25
<b>Peptídeo</b>	27,93 ( $\pm 8,18$ )	29,14 ( $\pm 5,68$ )	28,23 ( $\pm 5,64$ )
<b>Saponina</b>	29,04 ( $\pm 5,65$ )	27,77 ( $\pm 4,62$ )	28,64 ( $\pm 4,81$ )
<b>Controle</b>	26,22 ( $\pm 7,40$ )	28,94 ( $\pm 9,27$ )	28,56 ( $\pm 9,16$ )

Grupo	Percentagem linfócitos T CD8 <sup>+</sup>		
	D - 85	D - 55	D - 25
Peptídeo	22,78 (±9,46)	22,44 (±10,24)	23,58 (±13,45)
Saponina	18,24 (±3,69)	18,34 (±3,66)	16,84 (±1,85)
Controle	20,42 (±8,07)	19,10 (±6,92)	19,30 (±8,48)

### 5.1.3.3 Relação dos linfócitos T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

A média da relação T/B foi maior no Grupo Peptídeo durante as duas primeiras imunizações, porém na terceira imunização essa relação diminuiu, mas não significativamente (Tabela 5). O Grupo Controle e Grupo Saponina permaneceram com médias inferiores a do grupo vacinado durante todo o processo de imunização.

O Grupo Peptídeo apresentou a menor relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> desde a primeira imunização. O Grupo Saponina (1,61 ± 0,08) apresentou durante quase todo experimento médias superiores ao Grupo Peptídeo ( $x = 1,36 \pm 0,07$ ) e Grupo Controle (1,49 ± 0,13) (Tabela 5). A relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> não diferiu estatisticamente entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5:** Média da relação das percentagens dos linfócitos T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico dos bovinos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.

Grupo	Linfócitos T/B		
	D - 90	D - 60	D - 30
Peptídeo	4,97 (±4,21)	5,06 (±3,46)	3,96 (±3,16)
Saponina	3,62 (±1,70)	3,42 (±1,24)	3,01 (±0,82)
Controle	2,79 (±1,45)	2,77 (±1,48)	3,31 (±1,64)

Grupo	T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		
	D - 90	D - 60	D - 30
Peptídeo	1,27 (±0,16)	1,41 (±0,35)	1,39 (±0,45)
Saponina	1,61 (±0,33)	1,52 (±0,19)	1,70 (±0,27)
Controle	1,34 (±0,19)	1,54 (±0,32)	1,60 (±0,65)

### 5.1.4 Estimulação antígeno-específica *in vitro* na linfoproliferação de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais

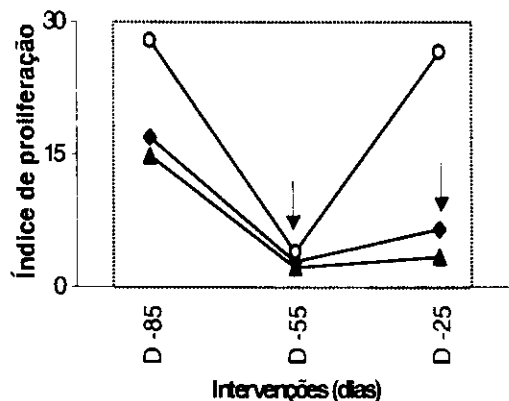
#### 5.1.4.1 Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com mitógeno para células T (Concanavalina-A)

Após a primeira imunização, todas as culturas estimuladas pelo mitógeno (Con-A) proliferaram. O Grupo Controle foi o que apresentou maior proliferação linfocitária, sendo o índice de estimulação de  $27,8 \pm 14,3$ . O Grupo Saponina e o Grupo Peptídeo apresentaram índices de estimulação de  $16,8 \pm 11,6$  e  $14,8 \pm 2,4$ , respectivamente. Não foi observada diferença significativa dos índices de proliferação entre os grupos experimentais.

As culturas não foram estimuladas pelo mitógeno após a segunda imunização, o índice de estimulação de todos os grupos foi inferior a cinco. O índice de estimulação do Grupo Peptídeo foi de  $2,2 \pm 0,9$ , o do Grupo Saponina foi de  $2,8 \pm 1,3,7$  e o do Grupo Controle foi de  $3,9 \pm 4,9$ . Não houve diferença estatística entre os grupos na segunda imunização, mas a inibição de proliferação celular foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à primeira em todos os grupos.

Após a terceira imunização os linfócitos provenientes de células mononucleares do sangue periférico dos animais pertencentes ao Grupo Controle voltaram a proliferar na presença de Con-A, sendo o índice de proliferação de  $26,5 \pm 54,6$ . Entretanto, os linfócitos do Grupo Saponina e Grupo Peptídeo foram discretamente estimulados pelo mitógeno sendo os índices de

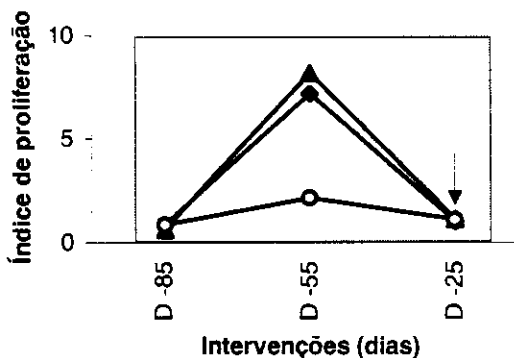
estimulação de  $6,5 \pm 5,9$  e  $3,3 \pm 2,0$ , respectivamente (Figura 5). Apesar de ter ocorrido discreta estimulação dos linfócitos do Grupo Peptídeo, ela diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da primeira imunização.



**Figura 5:** Índice de proliferação celular das culturas de PBMC estimuladas com o mitógeno para células T (Con-A) do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○).

#### 5.1.4.2 Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis* (23290)

Nenhum dos grupos experimentais apresentaram estimulação linfocitária após a primeira imunização (Figura 6). Entretanto, após a segunda imunização as culturas contendo células mononucleares do sangue periférico do Grupo Peptídeo e Grupo Saponina foram estimuladas pelo peptídeo sintético, alcançando índices de proliferação de  $8,2 \pm 15,6$  e  $7,2 \pm 14,1$ , respectivamente. O Grupo Peptídeo, no dia -25 apresentou um discreto aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na proliferação celular antígeno específica em relação ao dia -85. As culturas pertencentes ao Grupo Controle não proliferaram durante todo o período de imunização. Não houve diferença estatística durante todo o período analisado.



**Figura 6:** Índice de proliferação celular das culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético 23290 do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○).

#### 5.1.5 Estimulação antígeno-específica *in vitro* na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais

##### 5.1.5.1 Imunofenotipagem dos linfócitos T totais, B CD21<sup>+</sup> e células NTN B

As células mononucleares do sangue periférico dos animais pertencentes aos três grupos experimentais quando cultivadas na presença do peptídeo sintético apresentaram diferentes perfis de linfócitos T total, B CD21<sup>+</sup> e células NTN B.

Em análise do percentual de células T totais nos linfócitos cultivados (linfócitos pequenos), o Grupo Controle apresentou percentual mais elevado, mas não significativo ( $42,65 \pm 0,88$ ), seguido pelo Grupo Peptídeo ( $38,65 \pm 1,58$ ) e pelo Grupo Saponina ( $35,12 \pm 5,1$ ). A imunofenotipagem dos linfócitos que proliferaram no cultivo (blastos) revelou discreta proliferação no Grupo Controle e Grupo Peptídeo da segunda para a terceira imunização, conforme pode ser observado na (Tabela 6). No Grupo Saponina não se observou diferença entre a segunda e terceira imunização. Em nenhum dos grupos foi observado diferença estatística.

Em relação aos linfócitos B CD21<sup>+</sup> (linfócitos pequenos), o Grupo Peptídeo e Grupo Saponina apresentaram praticamente o mesmo perfil durante o processo de imunização. Na primeira imunização a média de células B no Grupo Peptídeo e Grupo Saponina era de  $2,45 \pm 1,57$  e de  $2,62 \pm 1,93$ , respectivamente. Porém, o Grupo Peptídeo apresentou uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) na segunda imunização do percentual de linfócitos B. Na terceira imunização, tanto o Grupo Peptídeo quanto o Grupo Saponina apresentaram elevação significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual de linfócitos B (Tabela 6).

No Grupo Controle esse perfil de diminuição da percentagem de linfócitos B na segunda imunização com posterior aumento na terceira imunização também pode ser observado. Essa elevação do percentual de linfócitos B não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Na imunofenotipagem dos linfócitos que proliferaram (blastos), pode-se observar que somente o Grupo Peptídeo apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de células B após a terceira ( $16,01 \pm 6,04$ ) imunização. Os demais grupos também apresentaram esse mesmo perfil, mas as diferenças não foram significativas (Tabela 6).

O percentual de células NTNB foi maior no Grupo Saponina ( $62,17 \pm 3,1$ ) do que nos outros grupos experimentais, durante o período de imunização (Tabela 6). As médias do Grupo Peptídeo e Grupo Controle foram de  $58,66 \pm 0,83$  e de  $54,92 \pm 1,78$ , respectivamente. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Em relação às células que proliferaram pode-se notar que os três grupos tiveram um discreto declínio a partir da segunda imunização, porém essa diminuição dos blastos das células NTNB do Grupo Peptídeo não foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). As médias dos grupos foram respectivamente de  $66,42 \pm 17,59$  (Grupo Peptídeo);  $71,57 \pm 10,35$

(Grupo Saponina) e de  $61,76 \pm 16,23$  (Grupo Controle).

**Tabela 6:** Média do percentual de linfócitos T totais, B CD21<sup>+</sup> e células NTNB nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis* do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle

Grupos	Percentagem de linfócitos T totais				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
<b>Peptídeo</b>	38,57	40,28	19,91	37,11	30,01
	$\pm 19,65$	$\pm 14,83$	$\pm 7,85$	$\pm 16,24$	$\pm 12,45$
<b>Saponina</b>	36,04	39,76	18,85	29,56	19,57
	$\pm 16,83$	$\pm 15,65$	$\pm 6,91$	$\pm 19,17$	$\pm 6,49$
<b>Controle</b>	41,90	43,63	22,21	42,44	36,67
	$\pm 15,76$	$\pm 20,02$	$\pm 17,16$	$\pm 18,71$	$\pm 16,36$

Grupos	Percentagem de linfócitos B CD21 <sup>+</sup>				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
<b>Peptídeo</b>	2,45	0,418	1,24	5,17	16,01
	$\pm 1,57$	$\pm 0,10$	$\pm 0,20$	$\pm 2,56$	$\pm 6,05$
<b>Saponina</b>	2,62	0,72	2,26	4,77	16,18
	$\pm 1,93$	$\pm 0,30$	$\pm 1,70$	$\pm 1,26$	$\pm 14,50$
<b>Controle</b>	1,79	0,80	4,54	4,65	13,04
	$\pm 1,03$	$\pm 0,57$	$\pm 5,52$	$\pm 3,10$	$\pm 10,04$

Grupos	Percentagem de células NTNB				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
<b>Peptídeo</b>	58,98	59,30	78,87	57,72	53,98
	$\pm 20,07$	$\pm 14,77$	$\pm 7,80$	$\pm 17,21$	$\pm 18,03$
<b>Saponina</b>	61,34	59,52	78,89	65,67	64,25
	$\pm 18,56$	$\pm 15,95$	$\pm 8,45$	$\pm 19,71$	$\pm 20,97$
<b>Controle</b>	56,31	55,57	73,25	52,91	50,29
	$\pm 15,55$	$\pm 20,48$	$\pm 22,51$	$\pm 20,82$	$\pm 24,50$

### 5.1.5.2 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

As percentagens de linfócitos pequenos T CD4<sup>+</sup> nos grupos experimentais não alteraram durante as imunizações (Tabela 7). As médias no Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle foram de  $19,64 \pm 1,25$ ;  $19,9 \pm 1,81$  e de  $21,04 \pm 1,53$ , respectivamente. Ao analisar os linfócitos que proliferaram notou-se que houve um aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) da percentagem no Grupo Peptídeo e Grupo Controle, após a segunda imunização (Tabela 7).

O perfil de linfócitos pequenos T CD8<sup>+</sup> também não alterou durante as imunizações (Tabela 7). O Grupo Controle manteve maior percentual ( $x = 21,25 \pm 1,57$ ) durante as imunizações, seguido pelo Grupo Peptídeo ( $19 \pm 1,87$ ) e Grupo Saponina ( $15,21 \pm 3,6$ ). Entretanto, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> proliferaram na presença do antígeno específico no Grupo Controle e Grupo Peptídeo, com variações de 12,14 a 22,54 ( $x = 17,33 \pm 7,35$ ) e de 13,55 a 18,67 ( $x = 16,10 \pm 3,62$ ), respectivamente. O Grupo Saponina permaneceu com o percentual de células T CD8<sup>+</sup> praticamente inalterado, variando de 12,61 a 12,01 e média de  $12,31 \pm 0,42$ . O Grupo Controle apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após a terceira imunização (D - 25).

**Tabela 7:** Média do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis* do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle

Grupos	Percentagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup>				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
Peptídeo	21,08	19,18	6,36	18,71	11,33
	$\pm 13,18$	$\pm 9,34$	$\pm 2,87$	$\pm 12,79$	$\pm 4,71$
Saponina	21,11	20,79	6,23	17,82	7,55
	$\pm 13,39$	$\pm 13,67$	$\pm 2,72$	$\pm 13,64$	$\pm 3,54$
Controle	22,24	22,33	10,07	19,63	14,13
	$\pm 13,34$	$\pm 15,70$	$\pm 10,56$	$\pm 11,89$	$\pm 10,32$

Grupos	Percentagem de linfócitos T CD8 <sup>+</sup>				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
Peptídeo	17,49	21,10	13,54	18,40	18,66
	$\pm 7,81$	$\pm 7,04$	$\pm 5,37$	$\pm 5,99$	$\pm 8,81$
Saponina	14,92	18,96	12,61	11,74	12,01
	$\pm 4,01$	$\pm 3,91$	$\pm 4,31$	$\pm 5,71$	$\pm 3,10$
Controle	19,65	21,30	12,13	22,80	22,53
	$\pm 3,34$	$\pm 6,26$	$\pm 6,81$	$\pm 8,50$	$\pm 7,65$

### 5.1.5.3 Relação T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

Na primeira imunização o Grupo Controle apresentava uma alta relação T/B de linfócitos pequenos ( $x = 221,6$ ), enquanto que o Grupo Peptídeo e Grupo Saponina apresentaram médias percentuais de 21,4 e 17,0 respectivamente. Porém na segunda imunização a relação T/B do Grupo

Controle caiu, mas não significativamente e a do Grupo Peptídeo e Grupo Saponina aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ). Na terceira imunização todos os grupos tiveram seus percentuais da relação T/B diminuídos significativamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8).

A análise da relação T/B nos blastos permitiu observar perfil semelhante ao dos linfócitos cultivados, ou seja, na segunda imunização a relação T/B em todos os grupos era relativamente alta, mas na terceira imunização ocorreu uma queda não significativa no Grupo Controle, enquanto que no Grupo Peptídeo e Grupo Saponina a diminuição dessa relação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8).

A relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi semelhante no Grupo Controle e Grupo Peptídeo, ao passo que no Grupo Saponina essa relação foi discretamente mais elevada por todo o período das imunizações (Tabela 8). O Grupo Saponina apresentou um aumento não significativo na terceira imunização, os outros grupos praticamente não alteraram a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Não houve diferença estatística entre os grupos ou mesmo entre as imunizações. A análise dos blastos a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> não variou significativamente em nenhum dos grupos experimentais.

**Tabela 8:** Média da relação de linfócitos T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nas culturas de PBMC estimuladas com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis* do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle.

Grupos	Linfócitos T/B				
	D -85		D -55		D -25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
Peptídeo	21,38	109,38	16,88	8,07	1,88
	$\pm 18,03$	$\pm 70,47$	$\pm 8,11$	$\pm 4,17$	$\pm 0,34$
Saponina	17,02	60,85	10,27	6,23	1,72
	$\pm 8,99$	$\pm 18,73$	$\pm 4,77$	$\pm 3,36$	$\pm 0,88$
Controle	221,60	77,38	9,04	13,12	5,32
	$\pm 453,20$	$\pm 44,11$	$\pm 5,99$	$\pm 7,79$	$\pm 5,34$

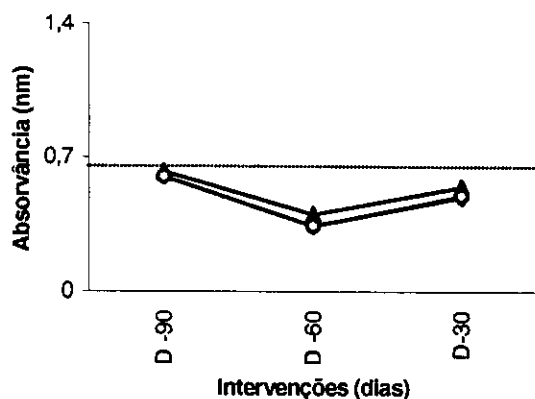
Grupos	Porcentagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>				
	D-85		D-55		D-25
	Linfoc	Linf	Blastos	Linfoc	Blastos
Peptídeo	1,18 ±0,52	0,90 ±0,30	0,47 ±0,12	1,00 ±0,57	0,66 ±0,30
Saponina	1,35 ±0,53	1,08 ±0,58	0,48 ±0,12	1,41 ±0,37	0,61 ±0,13
Controle	1,09 ±0,52	1,00 ±0,51	0,72 ±0,35	0,84 ±0,32	0,59 ±0,31

## 5.1.6 Resposta humoral dos animais experimentais

### 5.1.6.1 Detecção anticorpos anti - *Babesia bovis* (IgG total), por ELISA.

No início dos experimentos (primeira imunização) os animais do Grupo Peptídeo apresentaram média de absorbância discretamente mais elevada ( $x = 0,62 \pm 0,06$ ), mas não significativa, quando comparada com o Grupo Saponina ( $x = 0,59 \pm 0,04$ ) e Grupo Controle ( $x = 0,59 \pm 0,08$ ). Porém todos os grupos estavam negativos para *B. bovis*, visto que o ponto de corte era de 0,64, conforme verifica-se na Figura 7.

Na segunda imunização os grupos apresentaram uma queda não significativa nos valores de absorbância, sendo que a média do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle foi respectivamente de  $0,40 \pm 0,12$ ;  $0,34 \pm 0,01$ ;  $0,34 \pm 0,01$ . Na terceira imunização, o Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle passaram a ter médias de absorbância de  $0,54 \pm 0,17$ ;  $0,49 \pm 0,05$  e  $0,50 \pm 0,03$ , respectivamente.



**Figura 7:** Média das absorbâncias obtidas por ELISA frente a antígeno bruto de *B. bovis*, no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), durante o período de imunização.

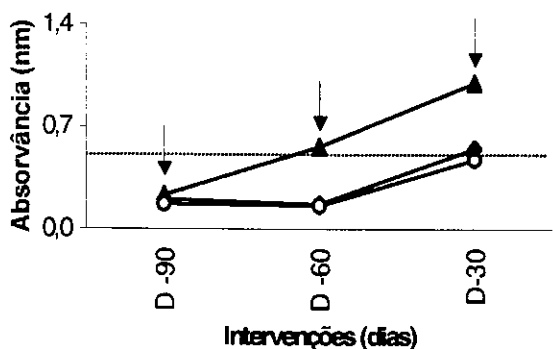
### 5.1.6.2 Detecção anticorpos anti - peptídeo sintético (IgG total), por ELISA.

O Grupo Peptídeo apresentou médias ( $0,60 \pm 0,38$ ) estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) durante as três intervenções com o peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* em relação ao Grupo Saponina ( $0,31 \pm 0,20$ ) e ao Grupo Controle ( $0,2 \pm 0,17$ ). Porém todos os grupos estavam negativos para *B. bovis*, visto que o ponto de corte era de 0,53, conforme apresentado na Figura 8.

Na primeira imunização os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo apresentaram média de IgG anti-peptídeo sintético superior ( $0,23 \pm 0,03$ ) a do Grupo Saponina ( $0,203 \pm 0,04$ ) e a do Grupo Controle ( $0,17 \pm 0,03$ ), sendo que o Grupo Peptídeo diferiu estatisticamente do Grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

Na segunda imunização, o Grupo Peptídeo teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IgG ( $0,56 \pm 0,03$ ), enquanto que o Grupo Saponina e Grupo Controle apresentaram redução não significativa nos valores de absorbância de  $0,17 \pm 0,02$  e de  $0,15 \pm 0,02$ , respectivamente. Na terceira imunização todos os grupos experimentais tiveram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IgG e passaram a ter médias de absorbância de  $1,14 \pm 0,43$ ;  $0,54 \pm 0,21$  e  $0,47 \pm 0,28$ , respectivamente. O Grupo Peptídeo apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao Grupo Saponina e Grupo Controle.

O Grupo Controle e o Grupo Saponina apresentaram o mesmo perfil durante as três imunizações e não diferiram estatisticamente entre si.



**Figura 8:** Média das absorvâncias obtidas por ELISA, frente ao peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*, no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) durante o período de imunização.

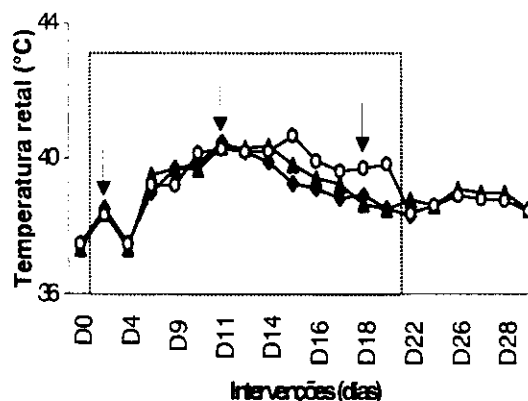
## 5.2 Avaliação do perfil parasitológico e imunológico dos bovinos experimentais mantidos em isolamento após o desafio com amostra virulenta de *Babesia bovis*.

### 5.2.1 Avaliação clínica dos animais experimentais

#### 5.2.1.1 Avaliação da temperatura retal

No dia do desafio os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle apresentavam temperatura retal variando de 37 a 37,7°C.

No segundo dia pós-desafio, os animais tiveram um discreto aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da temperatura retal, como pode ser observado na Figura 9. A partir do oitavo dia constatou elevação significativa da temperatura que se manteve sem variações significativas até o 15º dia. Após esse período pode-se observar uma discreta queda não significativa até o 22º dia no Grupo Controle e Grupo Saponina, a temperatura variou de 39,7 a 38,5. A partir do 22º dia a temperatura se manteve estável entre 38,3 e 38,8°C. O Grupo Peptídeo apresentou queda significativa ( $p < 0,05$ ) da temperatura retal a partir do dia 16 pós-desafio.



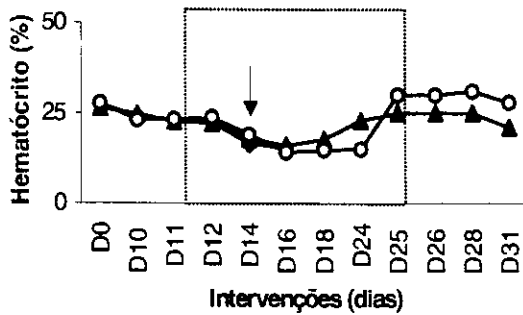
**Figura 9:** Média da temperatura retal dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de *Babesia bovis*.

#### 5.2.1.2 Hematócrito

Após o desafio (D0), os animais do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle, apresentaram percentuais médios de volume globular de  $26,52 \pm 3,93$ ;  $27,6 \pm 6,16$  e de  $27,72 \pm 2,86$ , respectivamente.

Entre os dias 10 e 12 os percentuais dos hematócritos do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle diminuíram significativamente (Figura 10). Entretanto, a partir do 14º dia, os animais do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle, apresentaram queda significativa dos percentuais dos seus hematócritos ( $18,0 \pm 6,96$ ;  $16,5 \pm 7,59$  e  $19,0 \pm 3,6$ ).

Posteriormente a essa queda dos hematócritos, os animais do Grupo Peptídeo tiveram elevação mais rápida da concentração de hemácias (18º dia) quando comparado ao do Grupo Controle (24º dia).



**Figura 10:** Percentagem de volume globular médio dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de *Babesia bovis*.

Com base nesses dados, seis animais (três do Grupo Controle e três do Grupo Saponina), dos 15 utilizados neste experimento, requereram tratamento após o desafio no intuito de prevenir a morte. Um animal do Grupo Peptídeo e dois animais pertencentes ao Grupo Saponina morreram. Os animais submetidos a tratamento foram retirados do experimento.

### 5.2.1.3 Perfil parasitológico dos animais experimentais

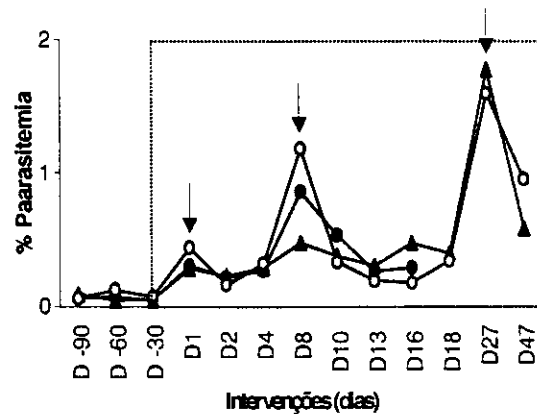
#### 5.2.1.3.1 Esfregaço de ponta de orelha

Os esfregaços de ponta de orelha, feitos em todos os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle, permitiram visualizar o parasito a partir do décimo dia pós-desafio (dados não mostrados). Somente um animal pertencente ao Grupo Controle apresentou parasitemia visível na lâmina no segundo dia, entretanto a visualização do parasito só voltou a ocorrer também no décimo dia.

#### 5.2.1.3.2 Avaliação da parasitemia pela técnica da hidroetidina

A técnica de hidroetidina utilizada para avaliar a parasitemia dos animais permitiu detectar um pico de parasitemia significativo ( $p < 0,05$ ) no segundo dia após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis* (Figura 11). Essa parasitemia, traduzida pela observação de hemácias parasitadas

fluorescentes, no citômetro de fluxo, foi maior no Grupo Controle, mas não diferiu estatisticamente do Grupo Saponina e Grupo Peptídeo. Após o desafio todos os grupos apresentaram PHFP acima da negatividade ( $< 0,090$ ), durante todo o período de observação.



**Figura 11:** Percentagem de hemácias parasitadas fluorescentes após incubação da suspensão de hemácias com hidroetidina (25 µg/mL) dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○) após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis*.

Todos os grupos apresentaram o curso típico da doença, com parasitemia significativa ( $p < 0,05$ ) entre o oitavo-décimo dia pós-desafio. O Grupo Peptídeo também apresentou um pico de parasitemia no segundo dia e manteve a parasitemia até o 18º dia pós-desafio, apresentando picos significativos ( $p < 0,05$ ) nos dias oito e 27. O Grupo Controle e o Grupo Saponina mantiveram parasitemias significativas ( $p < 0,05$ ) por todo o período pós-desafio com picos semelhantes aos do Grupo Peptídeo.

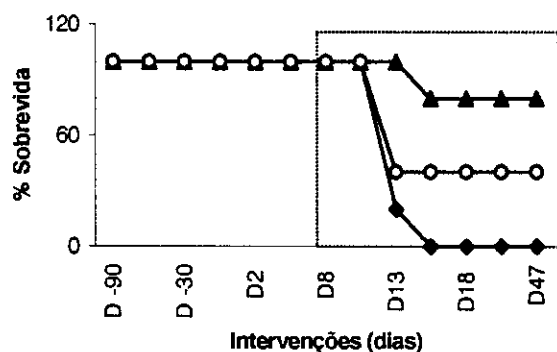
A morte ou a intervenção medicamentosa se deu no 16º dia pós-desafio, uma semana após de ter ocorrido um pico de parasitemia significativo ( $p < 0,05$ ) no Grupo Controle ( $1,85 \pm 0,52$ ) e Grupo Saponina ( $0,85 \pm 0,85$ ). Apesar da parasitemia alta, os animais não apresentaram sintomatologia clínica, dessa



forma, não houve necessidade de intervenção medicamentosa. No 47º dia o percentual de hemácias fluorescentes reduziu para  $0,58 \pm 0,1$  no Grupo Peptídeo e para  $0,95 \pm 0,47$  no Grupo Controle, porém as reduções não foram significativas.

### 5.2.2 Avaliação da eficácia do peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* na imunização experimental contra a *Babesia bovis*.

A avaliação da eficácia do peptídeo sintético 23290 foi realizada com base no número de animais que sobreviveram comparados ao número de animais que morreram ou necessitaram de tratamento, após o desafio com amostra virulenta. Os animais do Grupo Peptídeo apresentaram sobrevivência de 80% e os do Grupo Controle de 40% (Figura 12). Todos os animais do Grupo Saponina morreram entre o 13º e 16º dia.

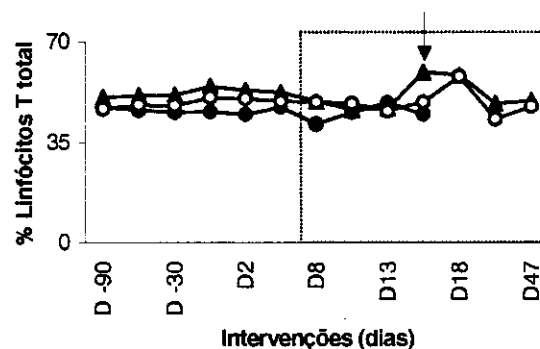


**Figura 12:** Percentagem de sobrevivência dos animais pertencentes ao Grupo Peptídeo ( $\blacktriangle$ ), Grupo Saponina ( $\blacklozenge$ ) e Grupo Controle ( $\circ$ ), após desafio com amostra virulenta de *B. bovis*.

### 5.2.3 Celularidade do sangue periférico nos estágios recentes e tardios da infecção por *Babesia bovis* pós-vacinação experimental

#### 5.2.3.1 Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T, B e células não T não B (NTNB)

A percentagem de linfócitos T totais, no Grupo Peptídeo, foi discretamente maior, por quase todo o experimento. Antes do desafio o Grupo Peptídeo apresentava uma percentagem de linfócitos T totais de  $54,68 (\pm 15,22)$  enquanto que no Grupo Saponina e Grupo Controle os percentuais eram  $45,82 (\pm 4,44)$  e  $50,85 (\pm 15,45)$ , respectivamente. Entre o 13º e 18º dias pode-se observar um aumento da percentagem de linfócitos T totais no Grupo Controle ( $53,8 \pm 1,7$ ) e Grupo Peptídeo ( $59,3 \pm 5,1$ ), sendo esse aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no Grupo Peptídeo (Figura 13). No 27º dia houve uma redução desse percentual tanto no Grupo Peptídeo ( $48,57 \pm 9,07$ ) quanto no Grupo Controle ( $43,02 \pm 14,57$ ), com discreto aumento no 47º dia de  $49,51 \pm 14,09$  (Grupo Peptídeo) e de  $47,59 \pm 15,53$  (Grupo Controle). Essas variações não foram estatisticamente significativas.



**Figura 13:** Percentual de linfócitos T totais no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo ( $\blacktriangle$ ), Grupo Saponina ( $\blacklozenge$ ) e Grupo Controle ( $\circ$ ), desafiados com amostra patogênica de *B. bovis*.

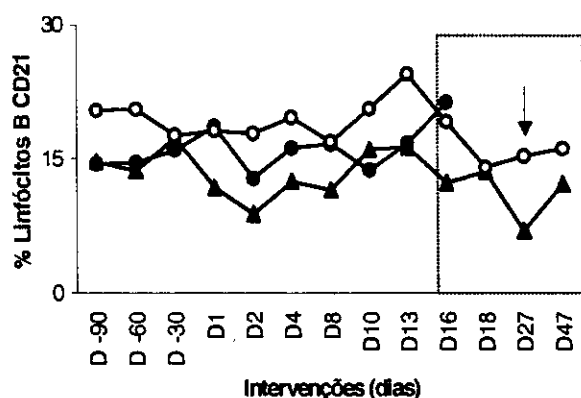
Os linfócitos B CD21<sup>+</sup> não variaram significativamente em nenhum dos grupos experimentais, durante todo o período analisado. No desafio o Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle apresentavam percentuais de células B de  $11,85 \pm 3,08$ ;  $18,62 \pm 5,18$  e de  $18,16 \pm 7,05$ , respectivamente.

O Grupo Peptídeo mostrou os menores percentuais de linfócitos B após o desafio.

No segundo dia pós-desafio, pode-se notar redução no percentual dos linfócitos B para  $8,8 \pm 1,5$  e aumento desse percentual no décimo dia ( $16,05 \pm 8,09$ ). Níveis mais baixos foram observados no 27º dia ( $7,03 \pm 1,68$ ). Comparando o percentual de linfócitos B no dia do desafio e no 27º dia pós-desafio, nota-se uma redução significativa desses linfócitos ( $p < 0,05$ ), porém, quando analisa-se a cinética dos linfócitos B não se observa diferença estatística.

Em relação ao Grupo Saponina o percentual de linfócitos B reduziu no segundo dia pós-desafio ( $12,84 \pm 4,5$ ). No 13º dia ( $16,32 \pm 5,15$ ) e 16º dia ( $21,23$ ), pode-se observar aumento da população celular. Essas alterações não foram estatisticamente significativas.

O Grupo Controle apresentou-se com os maiores percentuais de linfócitos B por todo o período pós-desafio. Entretanto, pode-se observar variações, principalmente no dia 13, onde houve um aumento do percentual para  $24,50 \pm 11,20$  com posterior redução nos dias subsequentes, sendo encontrado percentual mais baixo no 27º dia ( $7,03 \pm 1,68$ ). O Grupo Controle apresentou uma queda dos seus linfócitos B em mais de 50% após o desafio, mas essa redução não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 14).

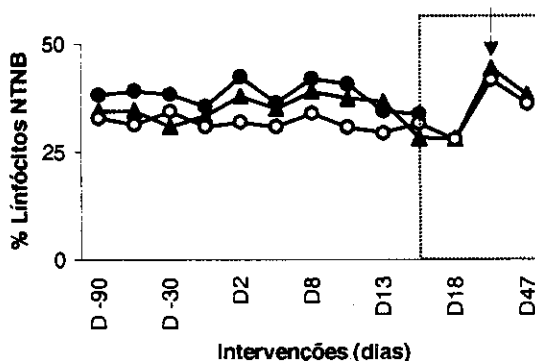


**Figura 14:** Percentual de linfócitos B CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e

Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de *B. bovis*.

O percentual de células NTNB foi maior no Grupo Saponina do que no Grupo Peptídeo e Grupo Controle, por todo o período experimental. No segundo dia pós-desafio o Grupo Peptídeo e Grupo Saponina tiveram aumento do percentual dessas células, com redução no quarto dia, entretanto, essas alterações não foram estatisticamente significativas. Essa cinética se manteve até o dia 27 quando se observou um aumento ( $44,4 \pm 0,89$ ) significativo de células NTNB no Grupo Peptídeo.

O Grupo Controle não variou o percentual celular até o 18º dia, entretanto, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) foi observado no 27º dia ( $41,69 \pm 6,21$ ). No 47º dia o percentual de células NTNB já havia diminuído ( $36,23 \pm 7,51$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Percentual de células NTNB no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de *B. bovis*.

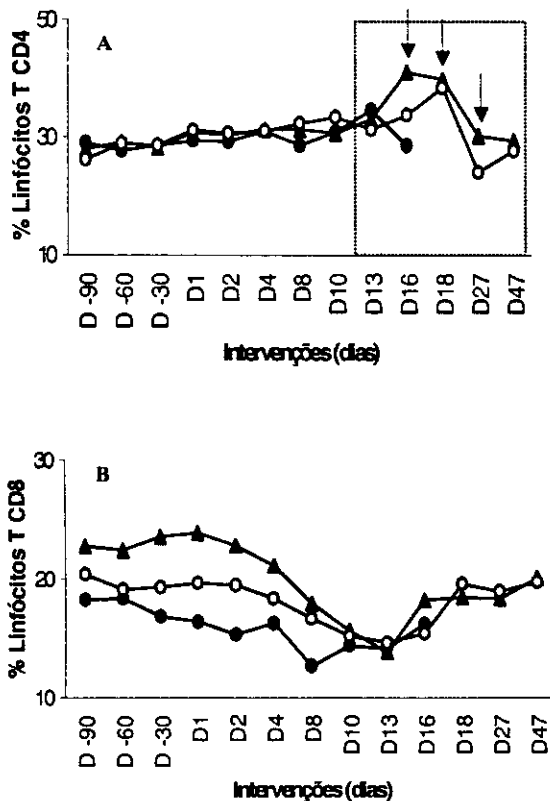
### 5.2.3.2 Imunofenotipagem dos linfócitos periféricos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Ao analisar a cinética de expansão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> verificou-se que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ), nos dias 16 e 18 pós-desafio nos Grupos Peptídeo ( $41,13 \pm 4,92$ ) e Grupo Controle ( $33,76 \pm 8,85$ ) (Figura 16A). No 27º dia tanto o Grupo Peptídeo quanto o Grupo Controle

apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Não houve diferença estatística entre o Grupo Controle e Grupo Peptídeo.

O Grupo Saponina permaneceu inalterado durante todo o experimento (Figura 16A).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> não variaram significativamente em nenhum dos grupos experimentais, durante todo o período analisado. No 13º dia observou-se uma diminuição dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no Grupo Peptídeo ( $13,85 \pm 3,64$ ) e Grupo Controle ( $14,63 \pm 6,35$ ) (Figura 16B). No 47º dia o Grupo Peptídeo e Grupo Controle apresentavam percentuais de T CD8<sup>+</sup> superiores aos do dia 13, esses percentuais eram de  $20,12 \pm 6,5$  (Grupo Peptídeo) e de  $19,8 \pm 8,15$  (Grupo Controle). O Grupo Saponina apresentou redução, dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no oitavo dia ( $12,67 \pm 2,79$ ). Os grupos não diferiram estatisticamente em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 16:** Percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), desafiados com amostra patogênica de *B. bovis*.

### 5.2.3.3 Relação dos linfócitos T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

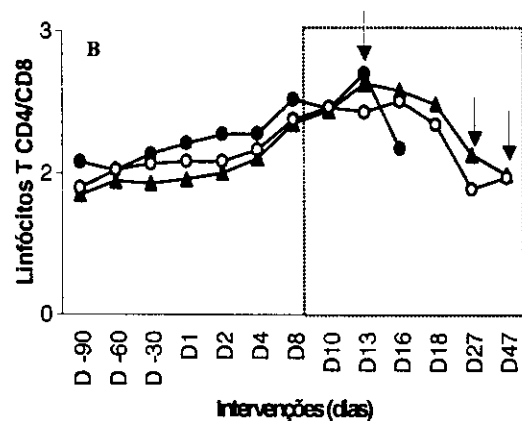
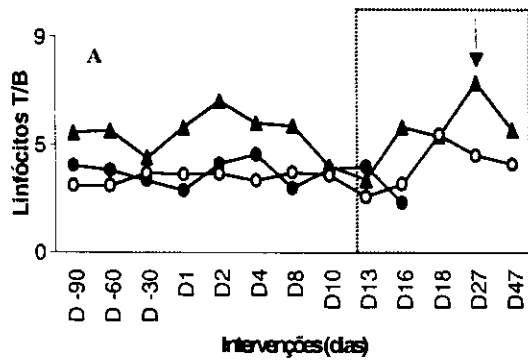
Na avaliação da relação entre os linfócitos T e B (Figura 17A), observou-se que o Grupo Peptídeo, logo após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis* (D2), apresentou aumento dessa relação ( $5,22 \pm 3,24$ ) e manteve esse aumento até o oitavo dia ( $5,29 \pm 3,1$ ). Porém, no 13º dia, observou-se, um declínio ( $3,04 \pm 0,89$ ) não significativo ( $p > 0,05$ ) na percentagem dos linfócitos T/B, e só voltou a elevar significativamente, no 27º dia pós-desafio ( $7,1 \pm 1,66$ ).

No Grupo Saponina e Grupo Controle a relação T/B se manteve baixa, não variando significativamente durante todo o experimento.

A razão dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> após o desafio se manteve mais elevada no Grupo Saponina, não variando significativamente durante todo período experimental.

No Grupo Peptídeo, após o desafio, ocorreu aumento gradativo até alcançar níveis máximos no 13º dia, sendo esse aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Após esse dia começou a diminuir, sendo que nos dias 27 ( $1,69 \pm 0,31$ ) e 47 ( $1,48 \pm 0,2$ ) a redução foi significativa ( $p < 0,05$ ).

A relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no Grupo Controle também apresentou aumento gradativo até o décimo dia pós-desafio, mantendo-se num platô até o 27º dia, quando essa relação reduziu significativamente (Figura 17B). No 47º dia a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> aumentou discretamente, porém não significativamente.



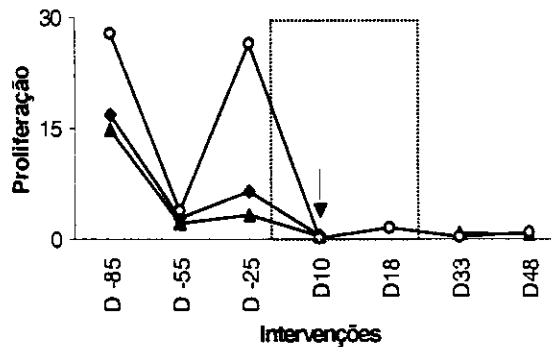
**Figura 17:** Percentual de linfócitos T/B (A) e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (B) no sangue periférico de bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○).

#### 5.2.4 Estimulação antígeno-específica *in vitro* na linfoproliferação de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais

##### 5.2.4.1 Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com mitógeno para células T (Concanavalina-A)

Nos cultivos para observação da linfoproliferação com o mitógeno para células T (Con-A) observou-se que após o desafio o índice de proliferação celular do Grupo Controle diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ), e da mesma forma os do Grupo Peptídeo e Grupo Saponina. Após o desafio houve uma inibição, até o final do experimento, da proliferação dos linfócitos

dos animais pertencentes aos três grupos experimentais (Figura 18).

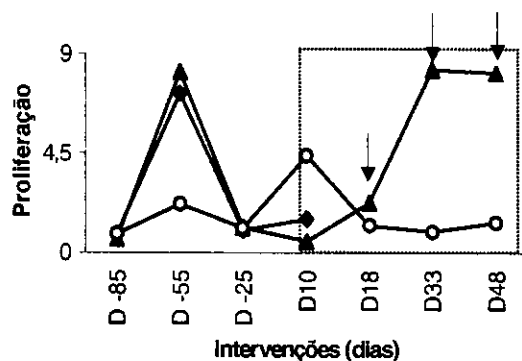


**Figura 18:** Médias de proliferação celular dos linfócitos bovinos do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), estimulados com mitógeno para células T (Con-A).

##### 5.2.4.2 Proliferação dos linfócitos em culturas estimuladas com o peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* (23290)

Ao analisar a estimulação das células mononucleares com o peptídeo sintético observou-se que os linfócitos dos animais do Grupo Saponina e Grupo Controle não proliferaram após o desafio com a amostra virulenta de *B. bovis*, ficando abaixo do cut off ( $>5,0$ ).

Entretanto, os linfócitos dos animais do Grupo Peptídeo, após o desafio, tiveram o seu índice de proliferação diminuído ( $0,49 \pm 0,67$ ). Porém a partir do dia 18 os linfócitos proliferaram (IE =  $2,23 \pm 1,3$ ) significativamente ( $p < 0,05$ ) na presença do peptídeo e alcançaram índices significativos de estimulação no 33º ( $8,3 \pm 11,06$ ) e 48º dia ( $8,16 \pm 6,16$ ). A média do índice de estimulação do Grupo Peptídeo foi de  $6,23 \pm 3,46$  (Figura 19).



**Figura 19:** Médias de proliferação celular dos linfócitos bovinos, dos animais do Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), estimulados com o peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*

### 5.2.5 Estimulação antígeno-específica *in vitro* na celularidade de culturas de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos animais experimentais

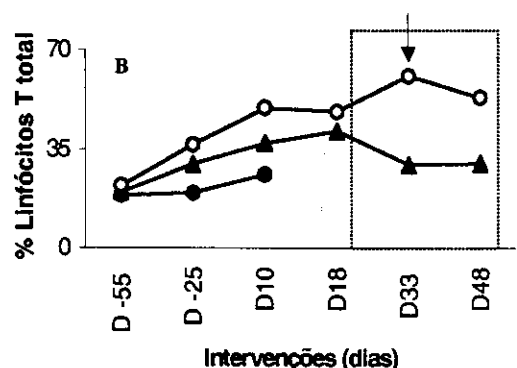
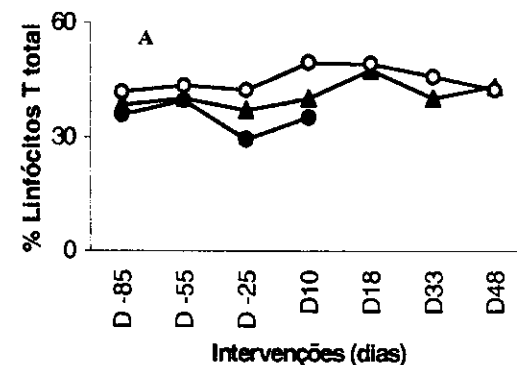
#### 5.2.5.1 Imunofenotipagem dos linfócitos T totais, B CD21<sup>+</sup> e células NTNB

Nas culturas estimuladas com o peptídeo sintético pode-se observar que, após o desafio, a percentagem de linfócitos T totais (linfócitos pequenos) não variou significativamente no Grupo Peptídeo ( $42,90 \pm 3,54$ ). Somente no dia 18 houve um discreto aumento ( $43,73 \pm 17,51$ ), mas não significativo, voltando a diminuir no dia 33 ( $40,22 \pm 10,69$ ). No 48<sup>o</sup> dia a percentagem de linfócitos T aumentou discretamente ( $43,38 \pm 16,62$ ), semelhante ao aumento do dia 18, mas também não foi estatisticamente significativa (Figura 20A).

Na análise dos blastos pode-se notar que no décimo dia pós-desafio, houve um aumento não significativo dos linfócitos T totais ( $37,10 \pm 11,61$ ). Esse aumento foi progressivo até o 18<sup>o</sup> dia ( $41,38 \pm 13,14$ ), porém após essa data, o percentual se manteve num platô, variando de  $29,73 \pm 11,90$  (D 33) a  $30,06 \pm 15,30$  (D 48) (Figura 20B). A percentagem de linfócitos T total não variou significativamente após o desafio.

O Grupo Controle apresentou-se com percentual mais elevado de linfócitos T totais ( $47,99 \pm 3,69$ ) em comparação ao Grupo Peptídeo. Após o desafio, a proliferação foi crescente e significativa ( $p < 0,05$ ) no 33<sup>o</sup> dia ( $x = 55,85 \pm 7,45$ ). No 48<sup>o</sup> dia pode-se observar redução do percentual de linfócitos T.

O percentual de linfócitos T totais que proliferaram em cultivo (blastos) no 33<sup>o</sup> dia foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que no Grupo Peptídeo (Figura 20B).

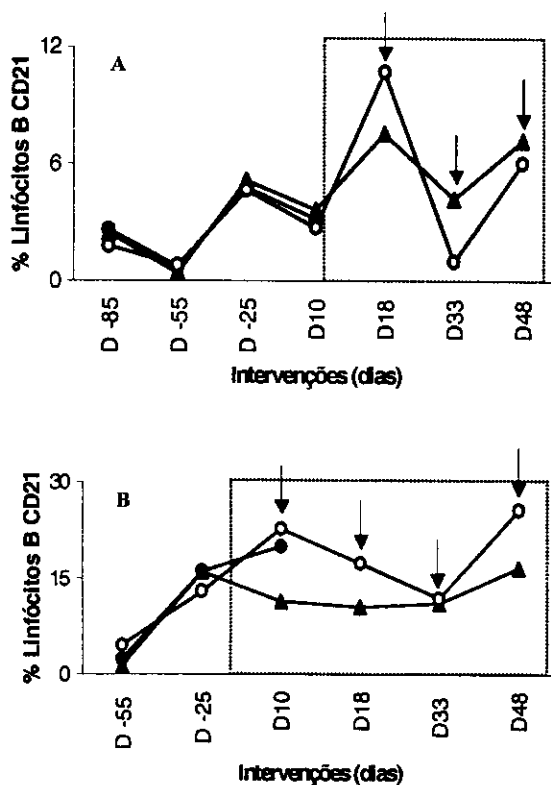


**Figura 20:** Percentual de linfócitos T totais (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*. (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

Em relação aos linfócitos B CD21<sup>+</sup> a cinética, após o desafio, foi semelhante no Grupo Peptídeo e Grupo Controle. Pode-se observar que ocorreu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no 18º dia. No 33º dia, os linfócitos B de linfócitos pequenos reduziram significativamente e voltaram a elevar também significativamente ( $p < 0,05$ ) no 48º dia. A redução no dia 33 foi significativamente maior no Grupo Controle do que no Grupo Peptídeo (Figura 21A).

Analisando-se os blastos notou-se que os linfócitos B proliferaram significativamente ( $p < 0,05$ ) tanto no Grupo Peptídeo quanto no Grupo Controle, em todo o período após o desafio, mas a proliferação foi significativamente maior no Grupo Controle que no Grupo Peptídeo nos dias dez e 18.

O Grupo Saponina também apresentou aumento significativo de células B (blastos) no décimo dia pós-desafio (Figura 21B)

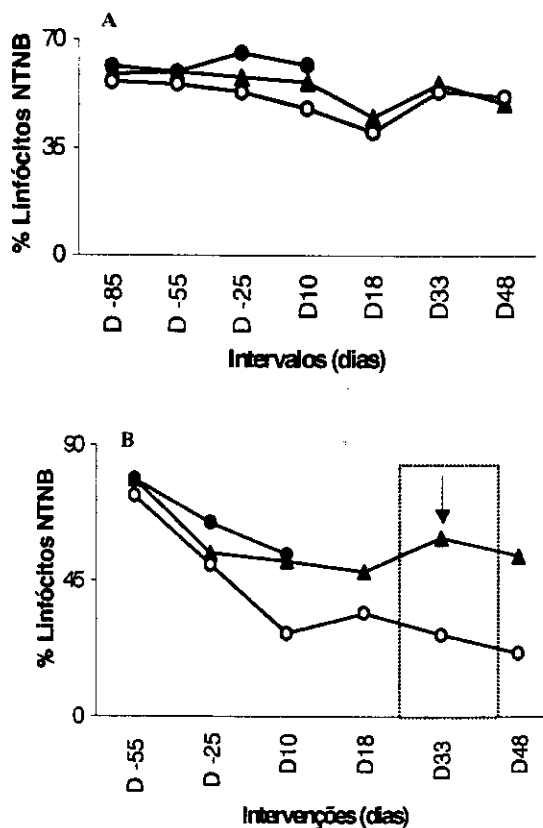


**Figura 21:** Percentual de linfócitos B CD21<sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*.

(▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

A cinética das células NTNB, cultivadas na presença do peptídeo sintético 23290, foi semelhante no Grupo Peptídeo e Grupo Controle. Ambos os grupos apresentaram redução no 18º dia, e elevação no 33º dia (Figura 22A). Essas alterações não foram estatisticamente significativas.

Na análise da blastogênese o Grupo Peptídeo e Grupo Controle mostraram cinéticas semelhantes e não apresentaram variações significativas, durante todo o período experimental após o desafio. Entretanto, o Grupo Peptídeo apresentou percentual celular estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) ao do Grupo Controle no 33º dia pós-desafio (Figura 22B).



**Figura 22:** Percentual de linfócitos NTNB (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*.

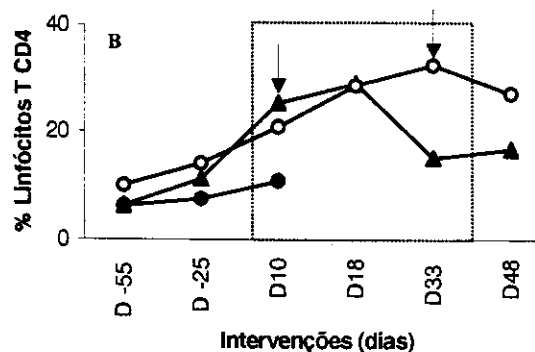
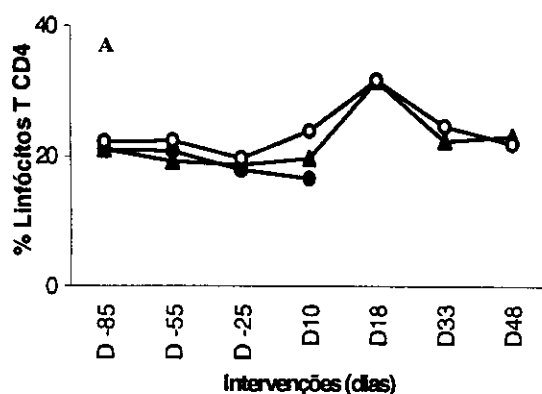
(▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

### 5.2.5.2 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>

Em relação à proliferação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em cultura estimulada com o peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* pode-se observar que o Grupo Peptídeo e Grupo Controle tiveram cinéticas semelhantes (Figura 23A). Um aumento não significativo do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi observado no 18º dia nos dois grupos, sendo que no Grupo Peptídeo o percentual era de  $31,57 \pm 11,34$  e no Grupo Controle era de  $31,63 \pm 11,52$ . A média de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no Grupo Peptídeo e no Grupo Controle, durante os experimentos pós-desafio foi respectivamente, de  $24,19 \pm 5,14$  e de  $26,24 \pm 4,95$ .

Porém na blastogênese observou-se que após o desafio, no Grupo Peptídeo, houve uma proliferação significativa ( $p < 0,05$ ) de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos dias dez e 18. No 33º dia pós-desafio observou-se uma redução não significativa desse percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Mas essa redução foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparada a do Grupo Controle.

O Grupo Controle apresentou um aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no 18º dia pós-desafio e queda significativa desse percentual a partir do dia 33 ( $p < 0,05$ ) (Figura 23B).

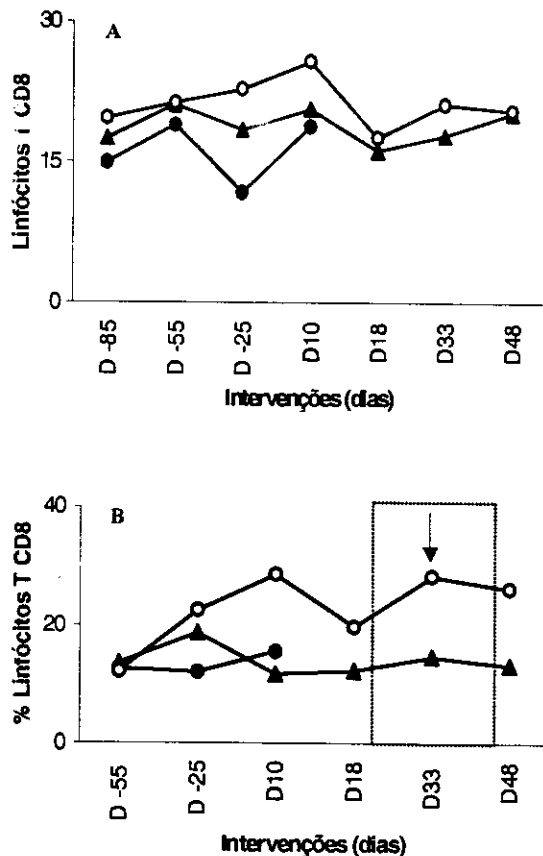


**Figura 23:** Percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*. (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

Ao analisar o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nas culturas observa-se que no Grupo Peptídeo, após o desafio, ocorreram variações, mas não significativas. A cinética de T CD8<sup>+</sup> do Grupo Controle foi semelhante a do Grupo Peptídeo durante todo o experimento, porém com média discretamente superior a do Grupo Peptídeo, mas não estatisticamente significativa (Figura 24A).

Na blastogênese observa-se que o Grupo Peptídeo manteve constante o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante todo o experimento, com média de  $12,96 \pm 1,2$  (Figura 24B).

O Grupo Controle apresentou um aumento do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no décimo dia após o desafio ( $28,67 \pm 8,14$ ) e uma redução, não significativa desse percentual no 18º dia ( $19,65 \pm 10,75$ ). Outro aumento ( $28,3 \pm 10,9$ ) significativo ( $p < 0,05$ ) foi observado no 33º dia. Esse percentual foi reduzido para  $26,21 \pm 7,63$  no 48º dia (Figura 24B).



**Figura 24:** Percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*. (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

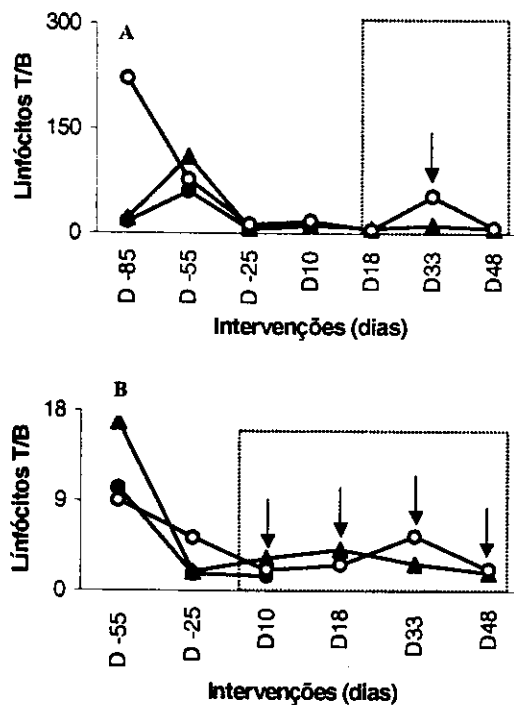
### 5.2.5.3 Relação T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

Após o desafio a relação T/B no Grupo Peptídeo não variou significativamente por período experimental: média de  $9,18 \pm 2,75$ . O Grupo Controle seguiu o mesmo perfil, porém com média superior ( $18,13 \pm 18,0$ ) à do Grupo Peptídeo. No 33<sup>o</sup> dia o Grupo Controle teve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da relação T/B, (Figura 25A).

Ao analisar a blastogênese pode-se notar que o Grupo Peptídeo teve aumento

significativo ( $p < 0,05$ ) da relação T/B, nos dias dez ( $3,26 \pm 0,97$ ) e 18 ( $4,17 \pm 1,97$ ) pós-desafio. Posteriormente, ocorreu redução gradativa até o final do experimento, porém não significativa (Figura 25B).

O Grupo Controle apresentou elevação significativa da relação T/B no 33<sup>o</sup> dia ( $p < 0,05$ ). No 48<sup>o</sup> dia observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) dessa relação.



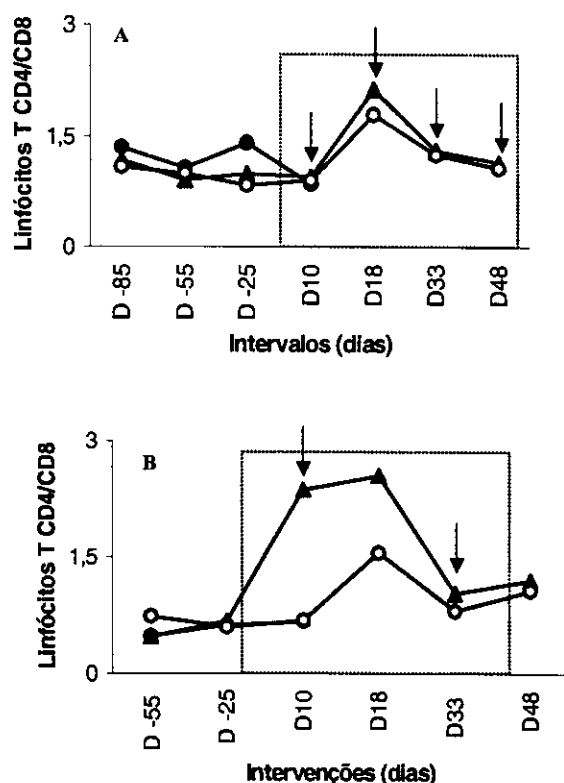
**Figura 25:** Relação entre os linfócitos T e B (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis*. (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

Após o desafio a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> do Grupo Peptídeo, aumentou significativamente no 18<sup>o</sup> dia e, posteriormente, caiu (Figura 26A). A média da relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> do Grupo Peptídeo ( $1,38 \pm 0,51$ ) foi discretamente superior, mas não estatisticamente significativa comparada à do Grupo Controle ( $1,30 \pm 0,42$ ).



O Grupo Controle variou significativamente ( $p < 0,05$ ) a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em todos os períodos analisados após o desafio (Figura 26A).

Na blastogênese a relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> do Grupo Peptídeo ( $x = 1,78 \pm 0,78$ ) foi superior à do Grupo Controle ( $x = 1,03 \pm 0,37$ ). Após o desafio, nos dias dez ( $2,36 \pm 0,91$ ) e 18 ( $2,54 \pm 0,93$ ), o Grupo Peptídeo apresentou relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) ao último dia da inoculação do peptídeo (D - 25). Entretanto no 33º dia houve uma redução significativa dessa relação ( $1,02 \pm 0,37$ ). No 48º dia ocorreu discreta elevação ( $1,19 \pm 0,78$ ) não significativa (Figura 26B). O Grupo Controle apresentou elevação significativa ( $p < 0,05$ ) da relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no 33º dia pós-desafio.



**Figura 26:** Relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (A) e blastos (B), em cultivo celular sob estimulação antígeno específica com o peptídeo sintético de rhoptria de *B.*

*bovis*. (▲) Grupo Peptídeo, (◆) Grupo Saponina e (○) Grupo Controle.

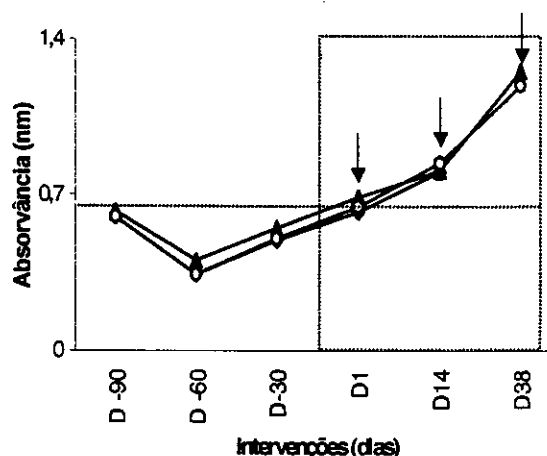
## 5.2.6 Reposta humoral dos animais experimentais

### 5.2.6.1 Detecção anticorpos anti - *Babesia bovis* (IgG total ), por ELISA.

Após o desafio (D1) os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo tiveram um discreto aumento, não significativo, na produção de anticorpos ( $0,68 \pm 0,98$ ), porém no 14º e 38º dia houve uma elevação significativa dos níveis de anticorpos anti - *B. bovis* que passaram respectivamente, para  $0,80 \pm 0,14$  e  $1,31 \pm 0,14$ . A média de anticorpos da classe G após o desafio foi de  $0,92 \pm 0,29$ .

O Grupo Controle teve média de IgG, após o desafio; menor que o Grupo Peptídeo ( $0,89 \pm 0,27$ ), mas a produção de anticorpos foi estatisticamente significativa nos dias 14 e 38, com médias de  $0,84 \pm 0,13$  e de  $1,18 \pm 0,08$ , respectivamente.

O Grupo Saponina também teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de anticorpos IgG tanto no dia um ( $0,62 \pm 0,064$ ) quanto no dia 14 ( $0,80 \pm 0,08$ ) como pode ser observado na Figura 27.



**Figura 27:** Média das absorbâncias obtidas por ELISA, frente a antígeno bruto de *B. bovis*, no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), após

o desafio com amostra virulenta de *Babesia bovis*.

### 5.2.6.2 Detecção de anticorpos anti-peptídeo sintético (IgG total), por ELISA.

Após o desafio (D1) o Grupo Peptídeo apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IgG ( $1,82 \pm 0,20$ ) (Figura 28). Esse aumento diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do Grupo Saponina ( $1,11 \pm 0,44$ ) e do Grupo Controle ( $0,51 \pm 0,07$ ). O aumento de IgG do Grupo Saponina no dia um foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação à terceira imunização (Figura 28).

No 14º dia pode-se observar redução significativa de IgG no Grupo Peptídeo ( $1,72 \pm 0,15$ ) em relação a terceira imunização, enquanto que o Grupo Saponina apresentou discreta redução ( $1,00 \pm 0,40$ ), não significativa e o Grupo Controle aumento ( $0,5531 \pm 0,1800$ ) nos valores de IgG. O Grupo Peptídeo diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do Grupo Controle e Grupo Saponina nesse dia.

No 38º dia pós-desafio o Grupo Peptídeo apresentou redução ( $1,42 \pm 0,24$ ) significativa ( $p < 0,05$ ) de IgG, e o Grupo Controle apresentou aumento ( $1,28 \pm 0,07$ ) significativo ( $p < 0,05$ ), porém não foi observada diferença estatística entre os dois grupos experimentais.

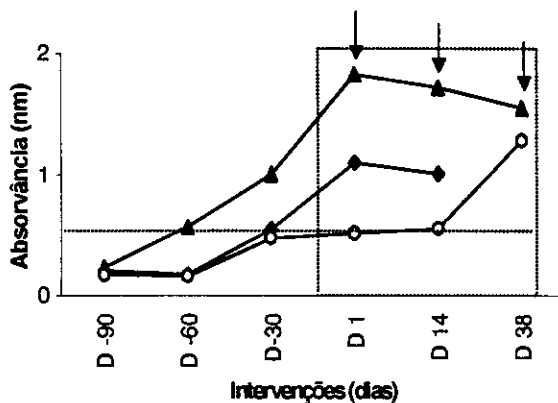


Figura 28: Média das absorbâncias obtidas por ELISA, frente ao peptídeo sintético de

RAP-1 de *B. bovis*, no Grupo Peptídeo (▲), Grupo Saponina (◆) e Grupo Controle (○), após o desafio com amostra virulenta de *Babesia bovis*.

## 6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Devido à complexidade dos resultados obtidos neste estudo, será apresentado, a seguir, um resumo, com as evidências obtidas, após análise estatística dos resultados. Este tipo de abordagem permitirá uma melhor interpretação dos resultados e a elaboração de propostas referentes aos eventos imunológicos desencadeados pela intervenção vacinal e pelo desafio com *B. bovis*.

A análise conjunta dos dados apresentados neste estudo permitiu evidenciar uma série de alterações relevantes em decorrência da infecção de bovinos por *B. bovis*.

### 6.1 Potencial imunogênico da intervenção vacinal

- O Grupo Peptídeo, no dia -25 apresentou inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na proliferação celular antígeno específica em relação ao dia -85.
- O Grupo peptídeo apresentou uma expansão seletiva de linfócitos B, detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo no dia -25.

### 6.2 Diferenças detectadas seletivamente no Grupo Peptídeo

O Grupo Peptídeo apresentou:

- discreta elevação significativa ( $p < 0,05$ ) na proliferação celular com Con-A no dia -25 em relação ao dia -85;
- expansão seletiva de linfócitos B, detectável *in vitro* na população de blastos após a estimulação com peptídeo no dia -25;
- queda significativa ( $p < 0,05$ ), após a segunda imunização (D -55) do percentual de linfócitos B (linfócitos pequenos);

- elevação significativa ( $p < 0,05$ ), após a terceira imunização do percentual de linfócitos B (linfócitos pequenos);
- diminuição dos blastos das células NTNB estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no dia -25;
- aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da relação T/B de linfócitos pequenos, após segunda imunização (D -55), devido ao aumento de linfócitos T;
- queda na razão T/B, detectável *in vitro* na população de blastos após a estimulação com peptídeo no dia -25, devido a um aumento na população de linfócitos B;
- taxa de sobrevivência significativamente maior no dia 13;
- aumento significativo da percentagem de linfócitos T totais circulantes nos dias 13 e 18;
- aumento significativo da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulante no 13º dia após o desafio;
- diminuição significativa da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulante no 27º e 47º dia após o desafio;
- redução significativa de linfócitos B circulantes no 27º dia pós-desafio;
- elevação na razão de linfócitos T/B circulantes no dia 27 em função principalmente de um declínio na população de linfócitos B circulantes;
- elevação no índice de proliferação antígeno específico nos dias 18 e 33 e 48;
- percentual de células NTNB (blastos) superior ao do grupo Controle no 33º dia pós-desafio;
- proliferação significativa ( $p < 0,05$ ) de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Blastos nos dias dez e 18;
- redução significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> comparada a do Grupo Controle no dia 33;
- aumento significativo da razão T/B detectável *in vitro* na população de blastos após a estimulação com peptídeo nos dias dez e 18 em função da expansão da população de linfócitos T, principalmente CD4<sup>+</sup> e a diminuição de linfócitos B;
- aumento significativo da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos após a estimulação

com peptídeo nos dias dez e 18 em função da expansão da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> e

- redução significativa da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo no dia 33, em função da diminuição da população de linfócitos CD4<sup>+</sup>.

### 6.3 Diferenças detectadas seletivamente no Grupo Controle

O Grupo Controle apresentou:

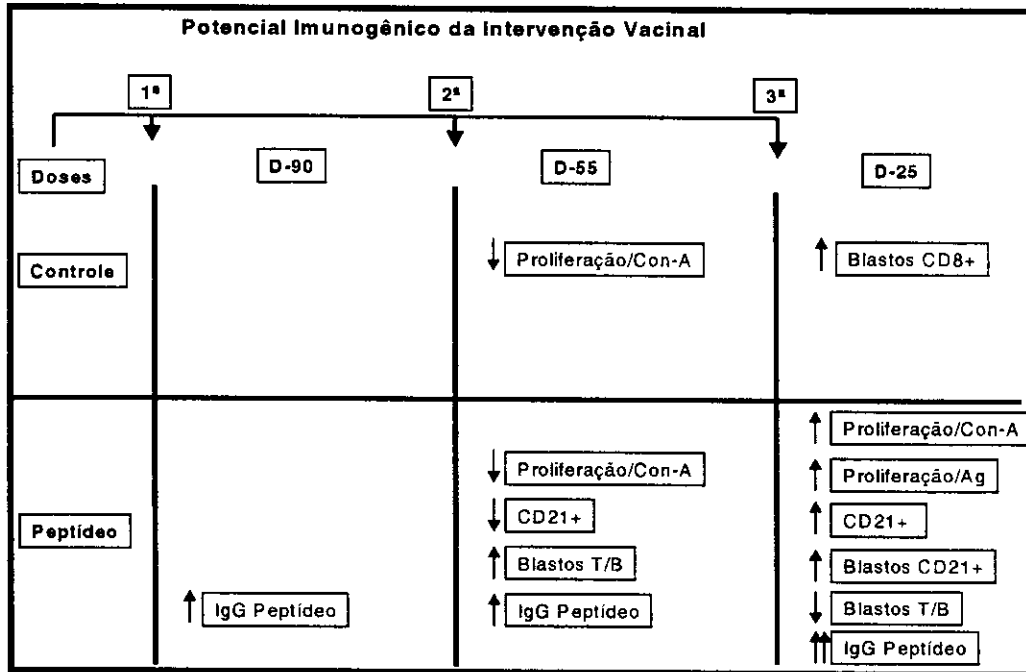
- maior taxa de mortalidade no dia 13;
- diminuição significativa da relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulante no 27º dia pós-desafio;
- aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após a terceira imunização (D - 25) de linfócitos T CD8<sup>+</sup> Blastos na presença do peptídeo sintético;
- aumento significativo de linfócitos T, detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo no dia 33, em função de um aumento na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- redução significativa da população de linfócitos B CD21<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de linfócitos pequenos, após a estimulação com peptídeo no dia 33, superior àquela observada no grupo de animais vacinados;
- aumento significativo da população de linfócitos B CD21<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo nos dias dez e 18;
- queda significativa ( $p > 0,05$ ) do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação no dia 33;
- aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo, no 33º dia;
- aumento significativo da razão T/B detectável *in vitro* na população de linfócitos pequenos, após a estimulação com peptídeo no dia 33 em função da queda na população de linfócitos B;

- aumento significativo da razão T/B detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo no dia 33 em função da queda na população de linfócitos B e o aumento dos linfócitos T, principalmente CD8<sup>+</sup> e
- redução significativa da razão T/B detectável *in vitro* na população de blastos após a estimulação com peptídeo no dia 48.

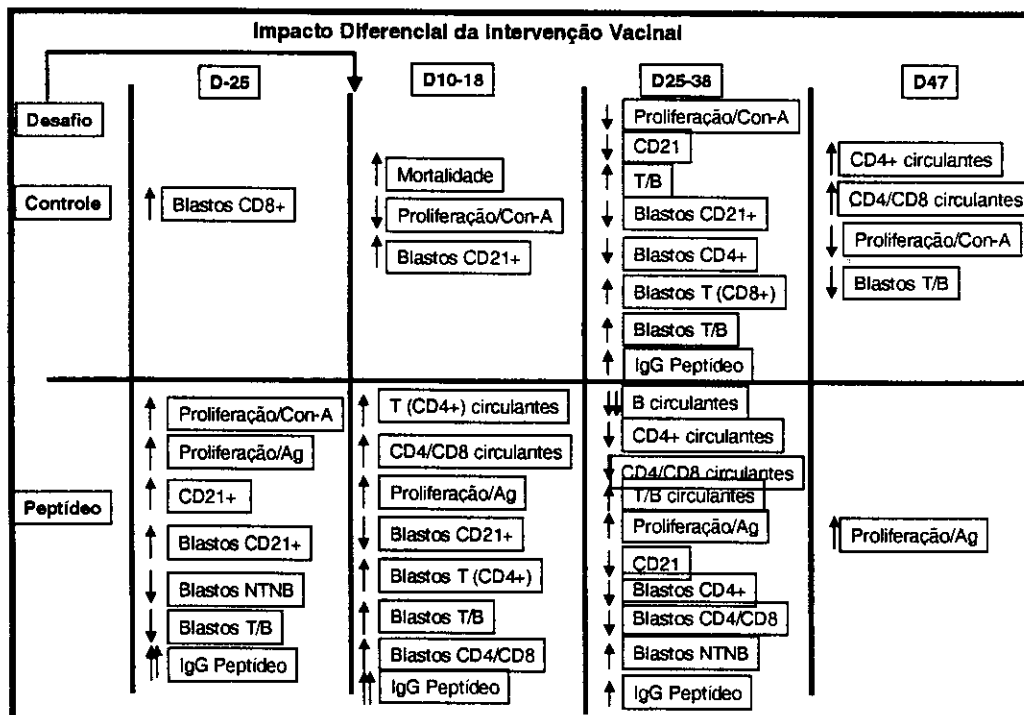
#### 6.4 Diferenças detectadas simultaneamente no Grupo Peptídeo e Grupo Controle

O Grupo Peptídeo e o Grupo Controle apresentaram:

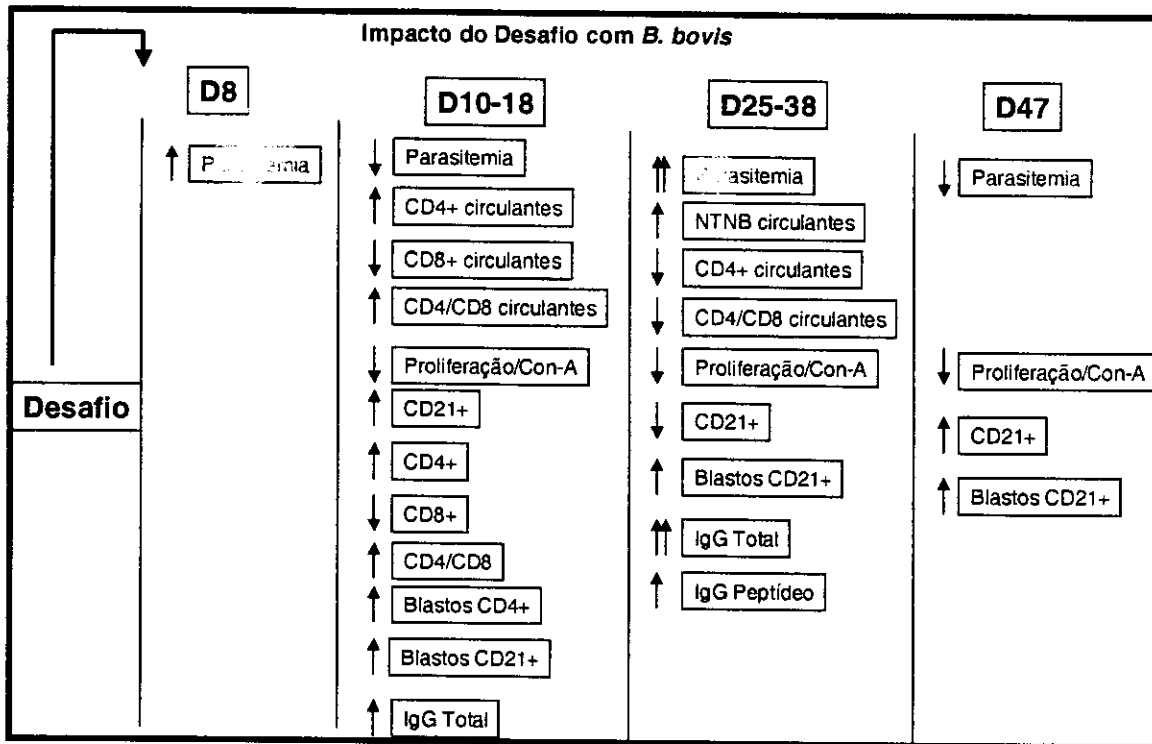
- redução da proliferação induzida por Con-A no dia -55;
- elevação na parasitemia no dia oito, com queda nos dias dez, 13 e 16, elevação no dia 27 e queda no dia 47;
- aumento significativo de células NTNB circulantes no dia 27;
- aumento significativo da população de células T CD4<sup>+</sup> circulantes nos dias 16 e 18;
- aumento na razão de linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulantes no dia dez em função da redução na população de células CD8<sup>+</sup> circulantes.
- declínio na razão de linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulantes no dia 27, em função de uma diminuição na população de células T CD4<sup>+</sup> circulantes;
- redução no índice de proliferação celular induzida por Con-A nos dias dez, 18, 33 e 48;
- elevação significativa da população de linfócitos B CD21<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de linfócitos pequenos, após a estimulação com peptídeo no dia 18;
- redução significativa da população de linfócitos B CD21<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de linfócitos pequenos, após a estimulação com peptídeo no dia 33;
- diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da relação T/B de linfócitos pequenos na terceira imunização (D -25);
- redução significativa na população de linfócitos CD4<sup>+</sup> circulantes no dia 27;
- elevação significativa ( $p < 0,05$ ) de linfócitos B de linfócitos pequenos no 48<sup>o</sup> dia;
- aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de linfócitos B de linfócitos blastos nos dias dez, 18, 33 e 48<sup>o</sup> pós-desafio;
- aumento significativo da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de blastos, após a estimulação com peptídeo no dia 18.
- aumento significativo da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> detectável *in vitro* na população de linfócitos pequenos, após a estimulação com peptídeo, no dia 18 em função da expansão da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> e diminuição da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e
- aumento significativo de IgG total anti-antígeno bruto de *B. bovis* nos dias 14 e 38.



**Figura 29.** Potencial imunogênico da intervenção vacinal com o peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*: principais diferenças detectadas entre os animais do Grupo Peptídeo e do Grupo Controle.



**Figura 30.** Impacto da Intervenção vacinal de RAP-1 de *B. bovis*: principais diferenças detectadas entre os animais do Grupo Peptídeo e do Grupo Controle.



**Figura 31.** Impacto do Desafio com *B. bovis*: principais evidências de mecanismos imunoprotetores detectadas em animais sobreviventes (Grupo Peptídeo x Grupo Controle).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Perfil parasitológico e imunológico dos bovinos imunizados.

O desenvolvimento de vacinas eficazes para infecções parasitárias que causam grandes prejuízos para os produtores rurais constitui um desafio para os pesquisadores. Devido à importância da babesiose, trabalhos têm sido desenvolvidos visando controlar esta enfermidade por meio de métodos mais eficazes como a vacinação com subunidades do hemoparasito, parasitos atenuados, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos (Goodger et al., 1986, Waltisbuhl et al., 1987, Gill et al., 1987, Reduker et al., 1989, Timms & Barry, 1988, Gale et al., 1992, Dalrymple, 1992, Dalrymple et al., 1993b, Freitas, 2001).

Entretanto, a avaliação da eficácia de uma vacina para a babesiose bovina, encontra

um entrave referente às dificuldades de testá-la experimentalmente.

Uma das dificuldades refere-se à obtenção de bovinos livres de hemoparasitoses e/ou manutenção de áreas isoladas de carrapatos para manter os animais, uma vez que este ectoparasito é o principal vetor da doença e encontra condições favoráveis de sobrevivência e desenvolvimento em todas as regiões do país, em todos os meses do ano (Gonzales, 1991).

O isolamento para doenças hemoparasitárias da Universidade Federal de Viçosa possui condições adequadas para a permanência de animais livres de *Babesia*, pois, os animais foram mantidos isolados por vários meses e permaneceram negativos. Esse fato foi comprovado por exames de citometria de fluxo, esfregaços sanguíneos e pesquisa de anticorpos anti-*Babesia*.

Outra dificuldade para a avaliação de uma vacina refere-se aos tipos de exames realizados para avaliar o grau de proteção imunológica. Geralmente as avaliações de proteção são realizadas baseadas principalmente na resposta imune humoral, porém, segundo Wright et al., (1983, 1989), Goodger et al., (1986) e Brown, et al. (1995b), a imunidade protetora para *B. bovis* não deve ser avaliada somente pela resposta humoral, mas também pela resposta celular.

Isso gera um outro problema, pois os animais utilizados nos testes vacinais apesar de serem puros e de uma mesma raça, não são isogênicos. Com isso, as respostas não são uniformes, provavelmente devido à característica polimórfica dos genes que codificam as moléculas do MHC, de fundamental importância na apresentação de antígenos por células especializadas na comunicação bioquímica entre as células do sistema imune e para o reconhecimento de antígenos próprios e não-próprios (Klein et al., 1993, Hughes & Yeager, 1998, Freitas, 2001).

Os grupos experimentais não diferiram estatisticamente entre si em relação às células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e T CD21<sup>+</sup>. Isso constitui uma característica importante para se avaliar a eficácia da resposta imune pela análise das alterações celulares promovidas pelo peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis*. Esses dados comprovam que os grupos experimentais formados nesse trabalho eram adequados para avaliar o impacto da intervenção vacinal com peptídeo sintético de rhoptria de *B. bovis* quanto ao perfil parasitológico e imunológico da infecção experimental por *B. bovis*.

Durante o período de imunização, o peptídeo sintético de RAP-1 não induziu altos níveis de células T CD4<sup>+</sup>, que seriam necessários para proteger os animais contra infecções de *B. bovis* uma vez que, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são o elo de ligação entre resposta imune humoral e celular (Brown et al., 1995a, Brown, 2001). Entretanto possuíam percentuais maiores

de células T totais e maior razão T/B, o que é importante uma vez que a indução de células T é uma característica essencial para o desenvolvimento de imunidade protetora contra parasitos intraeritrocitários (Brown & Palmer, 1999).

Uma outra característica necessária à eficácia de uma vacina é a indução de resposta humoral, porém o peptídeo sintético não induziu altos níveis de células B CD21<sup>+</sup> periféricas durante o processo de imunização. Os anticorpos têm a função de impedir a invasão dos merozoítos nas hemácias e aumentar a fagocitose de parasitos livres e de células infectadas (Taylor-Robinson, 1995). Portanto, como no período de imunização não havia parasitos na corrente sanguínea provavelmente essa indução não foi efetiva.

Trabalhos de Brown & Rice-Ficht, (1994) em bezerros infectados com *B. bovis* mostraram que células T CD4<sup>+</sup> e células B estão envolvidas na resistência aos estágios de infecção intraeritrocitário. Ao avaliar as culturas estimuladas com o peptídeo sintético de RAP-1 e com o mitógeno (Con-A) pode-se observar que na primeira imunização (D -85) houve uma estimulação na presença do mitógeno, o que não ocorreu na presença do peptídeo. Isso pode ser explicado pelo fato dos animais estarem em contato com antígenos de *B. bovis* pela primeira vez e pelo fato do mitógeno induzir uma proliferação inespecífica de células T. A inversão de proliferação pode ser vista na segunda imunização (D -55), na qual os linfócitos de animais do Grupo Peptídeo e Grupo Saponina proliferam na presença do peptídeo sintético. Essa proliferação é tida como específica, uma vez que a segunda imunização age como *booster* para o desenvolvimento da resposta imune. Os linfócitos do Grupo Saponina também proliferaram, o que confirmou que esta estimulação ocorreu devido ao adjuvante saponina ser um estimulador de células T.

Nesse contexto o esperado seria que após a terceira imunização o perfil de proliferação fosse semelhante ao da

segunda imunização, mas somente o Grupo Peptídeo proliferou significativamente. Esse perfil de proliferação celular foi semelhante ao perfil obtido por Brown et al. (1991).

Segundo Brown et al., (1991), a proliferação dos linfócitos em resposta aos antígenos de *Babesia* é muito complexa e está relacionada aos níveis de monócitos presentes na cultura. Os monócitos servem como células acessórias ou células apresentadoras de antígeno, mas podem também inibir a proliferação celular por intermédio da produção de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>). Ruebush et al., (1986) mostraram que camundongos infectados com *B. microti* apresentavam aumento da síntese de PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos e este aumento resultava na supressão celular em resposta aos antígenos do parasito.

Na análise fenotípica dos linfócitos pequenos mantidos em cultivo, durante o período que antecedeu o desafio, pode-se notar perfil semelhante ao obtido na análise dos linfócitos periféricos. Não se observou aumento significativo de células T, nem alterações significativas da percentagem de linfócitos T totais e da razão T/B, porém ocorreu aumento significativo de linfócitos B CD21<sup>+</sup> no Grupo Peptídeo.

É importante mencionar que, na blastogênese, os linfócitos B CD21<sup>+</sup> aumentaram significativamente no Grupo Saponina e também no Grupo Peptídeo, o que confirma a capacidade do peptídeo sintético de RAP-1 de induzir uma resposta imune humoral. Essa característica também foi apresentada por Freitas (2001), Suarez et al. (1993) e Brown et al., (1996) que utilizaram a proteína RAP-1 em processos de imunização com indução tanto de resposta imune humoral quanto celular.

A análise desses dados sugere que os animais do Grupo Peptídeo, após serem desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*, controlaram a multiplicação dos parasitos na corrente sanguínea devido à capacidade de ativar células B CD21<sup>+</sup> (linfócitos pequenos e blastos)

precocemente, em comparação aos outros grupos experimentais.

Na blastogênese do Grupo Peptídeo também foi possível detectar diminuição da relação T/B provavelmente devido ao aumento de linfócitos B CD21<sup>+</sup> e redução das células NTNB. As células NTNB, como monócitos, neutrófilos e células NK, que fazem parte da imunidade inata, são importantes na resolução da infecção aguda causada pela *Babesia*. Segundo James (1988), essas células seriam responsáveis pela proteção dos animais em estágios precoces de infecção, por controlarem a multiplicação da *Babesia* no pico de parasitemia. Portanto, a redução dessas células no presente estudo está relacionada, provavelmente, à ausência de infecção por *B. bovis*.

Na análise da blastogênese do Grupo Controle foi observado aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mas isso não é uma característica importante no desenvolvimento de imunidade protetora. As hemácias são isentas de moléculas do MHC e a apresentação de antígenos de parasitos intraeritrocitários fica restrita à categoria de células especializadas como macrófagos, células B, células dendríticas ou células T ativadas. Assim, a resposta imune desenvolvida para *B. bovis* deve envolver células T CD4<sup>+</sup> ligadas ao MHC de classe II, que são hábeis na resposta aos antígenos de natureza exógena, pelo fato da *Babesia* ser um parasito intraeritrocitário, e não restritas ao MHC de classe I (T CD8<sup>+</sup>) que são hábeis no desenvolvimento de resposta a antígenos de natureza endógena (Brown & Palmer, 1999, Brown, 2001).

Ressalta-se que na avaliação da resposta humoral pode-se observar que todos os grupos experimentais apresentavam níveis de IgG anti-*B. bovis* abaixo do *cut-off*. Mas na avaliação dos níveis de IgG frente ao peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* o Grupo Peptídeo apresentou níveis elevados de anticorpos durante todo o período de imunização. Esses dados apontam que os animais mantidos no isolamento não tiveram contato com o



parasito, e sugerem que o peptídeo sintético de RAP-1 induz a produção de anticorpos provavelmente devido à conservação de epítomos para células B.

## **7.2 Perfil parasitológico e imunológico de bovinos imunizados após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis*.**

Segundo Brown et al. (1995) um dos maiores entraves para obtenção de uma vacina eficaz refere-se à dificuldade de se encontrar proteínas imunodominantes e simultaneamente imunogênicas, que sejam bons indutores de resposta celular, uma vez que uma vacina eficiente tem que estimular resposta celular e humoral.

Portanto, a avaliação da eficácia de uma vacina deve ser feita com base na resposta imune celular e humoral além de análises concomitantes das alterações da parasitemia, temperatura retal, hematócrito, e sinais clínicos dos animais.

Após o desafio, os animais experimentais foram acompanhados diariamente e pode-se observar elevação da temperatura retal concomitante ao aumento da parasitemia. Essa elevação foi significativa a partir do segundo dia pós-desafio nos três grupos experimentais. O aumento da temperatura em função da parasitemia ocorre devido à multiplicação do parasito dentro das hemácias, com posterior rompimento e liberação de antígenos solúveis pirogênicos (Losos, 1986, Ristic, 1988). A febre também pode dever-se à resposta inflamatória gerada em função da anóxia tecidual resultante da obstrução dos vasos que acarreta necrose e liberação local de fatores pró-inflamatórios que induzem a quimiotaxia e diapedese de leucócitos (Wright et al., 1989).

Os volumes globulares apresentaram uma queda nos três Grupos a partir do segundo dia, devido à multiplicação dos parasitos com ruptura das hemácias e ao aumento da atividade monocítica fagocitária do baço e fígado (Mahoney & Mirre, 1977). Mas segundo Schetters et al., (1998) os baixos valores de hematócrito podem ser explicados pela hipotensão induzida

durante a fase aguda da infecção que acarreta extravasamento de fluido do interstício para a circulação.

As reduções dos volumes globulares foram mais significativas a partir do 14º dia sendo, portanto, um dos fatores responsáveis pela morte ou necessidade de tratamento de alguns animais.

Porém, no Grupo Peptídeo o volume globular começou a aumentar a partir do 18º dia enquanto que o Grupo Controle o aumento só foi significativo a partir do 24º dia. Esse aumento rápido e significativo não pode ser explicado somente pela redução da destruição de hemácia ou simplesmente por uma eritropoiese eficaz. Esse fato está relacionado com redução da hipotensão e conseqüente diminuição do extravasamento de fluido do interstício para a circulação (Schetters & Montenegro-James, 1995, Schetters et al., 1998).

Merozoítos de *B. bovis* puderam ser observados pelo exame direto de esfregaços sanguíneos no segundo dia pós-desafio, semelhantemente à técnica de hidroetidina, mas somente em um animal. Apesar da simplicidade de execução e da boa especificidade, o esfregaço de ponta de orelha mostrou ser pouco sensível, visto que a detecção efetiva dos parasitos ocorreu no décimo dia pós-desafio, permanecendo detectável até o 15 ou 18º dia, somente em alguns animais. Segundo Ristic (1988), a detecção dos parasitos por esfregaço de ponta de orelha se dá principalmente na fase aguda da doença, pois as parasitemias são mais elevadas. Na fase crônica essa observação de parasitos é mais difícil, uma vez que ocorre o seqüestro de hemácias parasitadas e não parasitadas (Mahoney & Mirre, 1977).

A detecção de *B. bovis* no segundo dia pós-desafio no esfregaço de ponta de orelha, não indica uma alta sensibilidade da técnica, uma vez que o parasito não foi detectável nos outros dias. Pelo esfregaço de ponta de orelha as variações da parasitemia não são bem detectadas como pela citometria de fluxo.

A citometria de fluxo já vem sendo utilizada para a identificação de *Plasmodium* pois, segundo Janse et al. (1994), é uma técnica rápida, sensível e com boa aplicabilidade e reprodutibilidade nos testes interlaboratoriais.

Esta técnica de análise automatizada, baseada em laser, permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido. O raio laser atinge as células individualmente, o que ocasiona ocorrência de dois fenômenos físicos: dispersão da luz, devido aos aspectos morfológicos e estruturais das células e fluorescência, quando esta é marcada com um fluorocromo.

A hidroetidina é um marcador vital, específico de DNA, sendo incorporada por células vivas, após metabolização e conversão em etídeo, um fluorocromo que pode ser excitado por laser e emitir fluorescência (Gallop et al., 1984). A intercalação do fluorocromo ao DNA de parasitos viáveis permite o uso da citometria de fluxo para distinguir hemácias infectadas, que contêm parasitos viáveis, daquelas que não contenham parasitos ou que contenham parasitos mortos (Wyatt et al., 1991).

A hidroetidina tem sido utilizada em citometria de fluxo e em alguns trabalhos relacionados a *Babesia*. Davis et al., (1992) com essa técnica, avaliaram, *in vitro*, o efeito de drogas em *B. bovis*, utilizando hidroetidina e analisaram o efeito de vários componentes da resposta imune como citocinas, monócitos, anticorpos entre outros, sobre o crescimento e a viabilidade de parasitos intraeritrocitários.

Fukata et al., (1996) pesquisaram, pela técnica de citometria de fluxo, hemácias parasitadas com *B. gibsoni*, utilizando hidroetidina. Wyatt et al., (1991) também detectaram hemácias infectadas com *B. bovis* com o uso da hidroetidina. Como se pode observar a citometria de fluxo é uma técnica sensível podendo ser utilizada para detecção de *B. bovis*.

Após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis*, o perfil da parasitemia observado, por citometria de fluxo, seguiu o curso típico da doença, com parasitemia entre o oitavo e décimo dia pós-desafio (Friedhoff, 1988), porém os animais do Grupo Peptídeo apresentaram parasitemias mais discretas. Trabalho realizado por Wright et al., (1992) também mostrou redução da parasitemia em animais imunizados com a proteína RAP-1 e desafiados com amostra de *B. bovis*.

A redução dessa parasitemia se deve provavelmente à expansão precoce de células B CD21<sup>+</sup> na população de linfócitos pequenos e blastos, durante o período de imunização. No Grupo Saponina e Grupo Controle a parasitemia foi relativamente superior a do Grupo Peptídeo e nesses grupos não se observou expansão de células B CD21<sup>+</sup>.

Uma outra explicação para a baixa detecção de hemácias fluorescentes, no Grupo Peptídeo, está relacionada com a fisiopatogenia do parasito, em que se pode observar a retirada das hemácias parasitadas e não parasitadas pelo aumento da atividade fagocítica monocitária do baço e fígado (Mahoney & Mirre, 1977).

A presença do agente não é indispensável para a indução de imunidade, pois antígenos como frações de eritrócitos parasitados, sobrenadantes de cultivos celulares e proteínas naturais ou recombinantes são capazes de induzir imunidade. Entretanto, a imunidade induzida por antígenos vivos e infectivos de *Babesia* é mais eficaz (Mahoney et al., 1981, Smith et al., 1981, Kuttler et al., 1983, Montenegro-James et al., 1987, Montenegro-James, 1989, Patarroyo, 1990, McElwain et al., 1991, Mishra et al., 1991, Suarez et al., 1991, Timmis et al., 1983, 1984, Wright, 1991).

Nesse contexto, a redução da parasitemia é importante para potencializar a resposta imune contra hemoparasitos (Mangold et al., 1990, Guglielmone et al., 1991, Aguirre et al 1991), uma vez que a presença

constante do parasito serve como estímulo para o desenvolvimento de resposta imune protetora (Mahoney & Mirre., 1979).

Ao se comparar a parasitemia e o hematócrito, observa-se que no 16º dia após o desafio, alguns animais do Grupo Peptídeo, Grupo Saponina e Grupo Controle morreram, ou necessitaram de intervenção medicamentosa. Nesse período os animais apresentavam baixa parasitemia, porém com redução significativa do volume globular. Esses dados sugerem que a morte dos animais ou a intervenção medicamentosa se deu devido à redução significativa do hematócrito, traduzida e provocada pela estase sanguínea e hipotensão, e também pela anemia que dificultou o suprimento de oxigênio nos tecidos (Losos, 1986).

A redução da parasitemia foi observada somente no sangue venoso, uma vez que, nos órgãos como baço, fígado e cérebro, dos animais necropsiados a parasitemia, detectada por citometria de fluxo, era alta (dados não mostrados). Essa parasitemia alta nos órgãos deve-se à hipercoagulação que é potencializada pela hipotensão, que promove maior adesão das hemácias aos microcapilares endoteliais.

Em relação aos sinais clínicos, pode-se notar que a amostra virulenta de *B. bovis* provocou quadro clínico de babesiose, em um animal do Grupo Peptídeo, em cinco animais do Grupo Saponina e em três do Grupo Controle, principalmente problemas neurológicos, o que levou os animais à morte ou à necessidade de tratamento. Segundo Mahoney & Mirre, (1977), animais infectados por *B. bovis* podem apresentar problemas neurológicos, traduzidos por ataxia, crises convulsivas, coma e morte.

Esses resultados mostram que a intervenção vacinal com o peptídeo sintético 23290, derivado de RAP-1 de *B. bovis*, reduziu a taxa de mortalidade em relação ao Grupo Peptídeo em comparação ao Grupo Saponina e Grupo Controle.

Sabendo-se da importância da resposta celular e humoral no processo de proteção

dos animais contra a *B. bovis* torna-se necessário elucidar as alterações ocorridas nos experimentos, principalmente no Grupo Peptídeo e Grupo Controle, para melhor entender o impacto da intervenção vacinal e do desafio com *B. bovis*. A investigação dessas alterações permitirá avaliar o uso do peptídeo sintético de RAP-1 de *B. bovis* como potencial imunógeno.

Ao observar que somente um animal do Grupo Peptídeo morreu um após o pico de parasitemia ocorrido entre o oitavo e décimo dia pós-desafio e que neste período havia aumento significativo de linfócitos T totais circulantes e da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, pode-se supor que a alta taxa de sobrevivência observada nesse grupo está associada ao aumento da resposta imune celular.

Neste período (D10-D16) pode-se observar aumento significativo de IgG anti-*B. bovis*, e do anti-peptídeo sintético, sendo que os níveis de IgG anti-peptídeo foram superiores aos níveis de IgG anti-*B. bovis*. Este aumento também foi observado por O'Donoghue et al., (1985), e Figueroa (1989), que detectaram níveis máximos de IgG no 12º dia por intermédio do teste imunoenzimático ELISA.

A análise desse aumento de anticorpos IgG sugere que os níveis de anticorpos não foram suficientes para controlar a infecção e que a resposta celular é mais importante nos estágios agudos da babesiose que a resposta humoral, sendo esta mais importante nos estágios tardios (Brown & Palmer, 1999, Brown, 2001).

Ao analisar os cultivos celulares do Grupo Peptídeo pode-se observar uma supressão da resposta linfoproliferativa *in vitro* na presença do mitógeno (Con-A). Brown et al., (1991) também observaram supressão da resposta linfoproliferativa frente a mitógenos. Entretanto, pode-se observar alta proliferação celular antígeno-específica após o 14º dia do desafio com amostra virulenta de *B. bovis*, além do aumento de linfócitos T totais, razão T/B e T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> na população de blastos devido ao aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e redução significativa de células B CD21<sup>+</sup>. Portanto

esses resultados revelam uma maior importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o controle da infecção do que as células B CD21<sup>+</sup>.

Após o pico de parasitemia, o Grupo Controle apresentou aumento significativo de linfócitos B CD21<sup>+</sup> na população de blastos das culturas estimuladas com o peptídeo sintético de RAP-1. Apesar disso, pode-se observar alta taxa de mortalidade, o que mostra que o controle da infecção aguda por *B. bovis* é dependente de linfócitos T e não de linfócitos B.

A morte dos animais do Grupo Controle, e a necessidade de intervenção medicamentosa ocorreram, provavelmente, devido à incapacidade dos animais de montar uma resposta antígeno específica envolvendo células T CD4<sup>+</sup>. Segundo Taylor-Robinson (1995), as células T CD4<sup>+</sup> antígeno específicas quando transferidas para roedores infectados com *Plasmodium* sp conferem imunidade para esse animal contra o estágio sanguíneo do parasito.

A importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> também foi verificada nas infecções por *B. microti*, em que camundongos BALBc atímicos apresentaram altas parasitemias (30-60%) em relação a camundongos normais (< 0,15%) (Igarashi et al., 1999). Parasitemias mais elevadas também foram observadas em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-CD4<sup>+</sup> quando comparadas às parasitemias dos animais que receberam anticorpos anti-CD8<sup>+</sup> (Igarashi et al., 1999).

No Grupo Saponina todos os animais morreram após o pico de parasitemia. Segundo a literatura, as altas parasitemias e a redução significativa do volume globular podem matar o animal, porém esse grupo apresentou parasitemia inferior a do Grupo Controle, e no dia da morte dos animais ou da intervenção medicamentosa, a parasitemia era também inferior à do Grupo Peptídeo.

Sabendo-se da importância dos linfócitos T e B no controle da infecção por *B. bovis*, observou-se que o Grupo Saponina

apresentou durante todo o período experimental os percentuais mais baixos de linfócitos T totais e T CD4<sup>+</sup>, percentual intermediário de células B CD21<sup>+</sup> e maior percentual de células NTNB em relação ao Grupo Peptídeo e Grupo Controle.

As células NTNB, como os neutrófilos, monócitos e células NK, envolvidas na imunidade inata, são descritas como linha de frente na defesa do hospedeiro contra a *Babesia* (Court et al., 2001). Essas células, ao entrarem em contato com o parasito, promovem sua fagocitose e a produção e liberação de citocinas, óxido nítrico e intermediários de oxigênio que atuam como fatores de resistência às infecções por *Babesia* (Johnson et al., 1996, Court et al., 2001).

Contudo, segundo Brown & Palmer (1999), apesar da resolução da infecção aguda causada pela *Babesia* estar diretamente relacionada à imunidade inata, uma resposta imune exacerbada com a produção de óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  pode promover, no hospedeiro, sintomas graves da doença, inclusive morte (Brown, 2001). A participação dessas citocinas inflamatórias nas patologias geradas pela *B. bovis*, já foi verificada, principalmente na babesiose cerebral (Wright e Jacobsen, 1988).

Segundo Grau et al., (1989) a superprodução de óxido nítrico pode estar associada a mecanismos patogênicos de infecção como a babesiose cerebral, visto que várias disfunções orgânicas observadas durante a evolução da babesiose foram mediadas pela produção exacerbada de óxido nítrico.

Como pode ser observado na análise das células NTNB, o maior percentual dessas células no Grupo Saponina comparado aos do Grupo Peptídeo e Grupo Controle sugere que a morte dos animais ou a necessidade de intervenção medicamentosa, ocorreu devido a uma resposta imune exacerbada, principalmente de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e intermediários do oxigênio, além dos baixos percentuais de células T e B.

Posteriormente ao período de infecção aguda e morte de alguns animais ou intervenção medicamentosa, os animais sobreviventes apresentaram outro pico de parasitemia (Grupo Peptídeo e Grupo Controle) no 27º dia pós-desafio, porém todos os animais recuperaram-se da infecção sem necessidade de tratamento.

A elevação da parasitemia no Grupo Peptídeo se deu devido à redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes, além da relação T CD4/CD8<sup>+</sup> e de células B CD21<sup>+</sup>, comprovando assim, a importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Nesse período houve também aumento de IgG anti-*B. bovis* porém, não suficiente para controlar a infecção.

Na análise do cultivo celular das células mononucleares do sangue periférico dos animais do Grupo Peptídeo pode-se observar proliferação celular na presença do peptídeo sintético de RAP-1, entretanto, houve redução significativa de células B CD21<sup>+</sup> da população de linfócitos pequenos, e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> pertencentes à população de blastos. O único aumento significativo observado foi o de células NTNB da população de blastos.

Segundo Kumaratilake & Ferrante, (1992), Fell et al., (1994), Brown & Rice-Ficht, (1994) e Brown et al., (1995), a imunidade adaptativa é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que possuem papel fundamental na produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Assim, contribuem para a ativação neutrófilos e de macrófagos responsáveis pela fagocitose e a produção de intermediários do nitrogênio reativo e de oxigênio que são tóxicos para o parasito.

Desse modo, os resultados sugerem que, durante o período em que os animais possuíam percentuais elevados de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células do sistema imune inato foram ativadas, conseguindo controlar a infecção por *B. bovis*. Segundo James, (1988) essas células são responsáveis pela proteção dos animais por intermédio do controle da multiplicação da *Babesia* no pico de parasitemia. Pesquisa realizada por

Court et al. (2001) comprovou que, durante o pico de parasitemia e eliminação do parasito em exposições primárias à *B. bovis*, a atividade fagocítica dos neutrófilos e explosão oxidativa promovida pelos monócitos estão aumentadas.

As células T CD4<sup>+</sup> também são importantes para regular a produção de anticorpos da classe IgG (Brown & Rice-Fichet, 1994, Brown et al., 1995b). Segundo Brown & Palmer (1999) as imunoglobulinas indicam resistência ao desafio, porque são importantes no controle da infecção contra *B. bovis* devido à sua capacidade opsonizante, além de proteger o animal por longos períodos após o contato com o parasito.

Durante o pico de parasitemia (D 27) pode-se notar elevação nos níveis de IgG específica anti-*B. bovis*. Assim, o aumento de IgG e a expansão da população de linfócitos NTNB parecem ser eventos importantes para o controle da parasitemia tardia (D47), provavelmente, por meio de mecanismos de citotoxicidade mediada por anticorpos, numa interface entre a imunidade inata e humoral adquirida.

A redução de células CD21<sup>+</sup> circulantes ou na população de blastos pode ser explicada pela migração seletiva dessa população celular para os órgãos linfóides onde estariam sofrendo diferenciação em plasmócitos com conseqüente produção de anticorpos.

Após esse período (D 27) pode-se observar queda no percentual de linfócitos T totais e T CD4<sup>+</sup>, mas elevação no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, entretanto os animais apresentavam-se bem e sem nenhum sinal clínico de babesiose provavelmente devido ao aumento dos níveis de anticorpos anti-*B. bovis*. Brown & Palmer, (1999) também citam que a proteção na fase inicial da doença envolve imunidade celular, mas o controle da parasitemia durante a infecção persistente ou após infecção por *Babesia* envolve também anticorpos.

Esses dados sugerem que o peptídeo sintético de RAP-1 é um bom imunógeno,

pois possui epítomos conservados para células T e B, e estimulou tanto a resposta celular quanto a humoral, e conseqüentemente foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade do Grupo Peptídeo (20%) em relação à taxa de mortalidade do Grupo Controle (60%).

Outro dado importante diz respeito ao aumento significativo da proliferação das células mononucleares dos animais do Grupo Peptídeo, a partir do 18º dia pós-desafio. Essa proliferação provavelmente ocorreu devido à atuação de linfócitos B e células NTNB como células apresentadoras de antígeno profissionais para os linfócitos T.

O Grupo Controle também apresentou aumento da parasitemia no 27º dia pós-desafio, porém algumas semelhanças e diferenças foram observadas em relação ao Grupo Peptídeo.

O Grupo Controle apresentou redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na população de blastos, como de células CD21<sup>+</sup> na população de linfócitos pequenos e blastos. Porém teve aumento da razão T/B devido à elevação da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, na população de blastos. Esses dados associados aos dados da literatura confirmam a importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, além de apontarem que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> não tiveram capacidade de impedir o aparecimento da parasitemia. A resolução da parasitemia nesse grupo provavelmente deveu-se ao aumento da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> causada pelo aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes.

Esses dados referentes à percentagem de linfócitos T totais, razão T/B, razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e células NTNB, ao serem analisados comparativamente com a parasitemia observada nos animais distribuídos por grupos experimentais, possibilitaram a observação de alguns pontos interessantes. Os animais do Grupo Peptídeo não tiveram parasitemias elevadas por quase todo o experimento, quando comparados aos do Grupo Saponina e Grupo Controle (Figura 11). O controle da parasitemia, no Grupo

Peptídeo, como pode ser observado no 13º dia pós-desafio, provavelmente ocorreu devido à resposta imune caracterizada por uma maior relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e maior percentagem de linfócitos B CD21<sup>+</sup> e menor relação T/B (Figuras 17, 14, 17A). Nesse sentido, observa-se que o aumento de linfócitos T e B auxiliou na diminuição da parasitemia, sendo portanto, a parasitemia inversamente proporcional aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Este fato pode ser comprovado ao analisar-se o 27º dia após o desafio, em que se observa elevação da parasitemia além da elevação da razão T/B, mas diminuição da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e B CD21<sup>+</sup>, além da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figuras 17A, 16, 14, 17B). A elevação da razão T/B ocorreu devido ao aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e diminuição dos linfócitos B CD21<sup>+</sup>.

O mecanismo da imunidade protetora para *Babesia bovis* não é totalmente conhecido, e neste estudo a sobrevivência de dois animais do Grupo Controle, após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis* chama a atenção sobre os mecanismos que estariam envolvidos na proteção desses animais. Portanto, ao analisar os animais pertencentes ao Grupo Peptídeo e Grupo Controle pode-se observar que todos os animais apresentaram parasitemia a partir do oitavo dia pós-desafio, com posterior resolução, provavelmente, devido ao aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes e queda de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, com conseqüentemente aumento da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

Nos cultivos celulares pode-se observar aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, queda de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, e aumento de células B CD21<sup>+</sup>, na população de linfócitos pequenos. Esses fatores propiciaram o aumento da relação T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Na blastogênese também foi observado aumento de linfócito T CD4<sup>+</sup> e células B CD21<sup>+</sup>.

A elevação dos níveis de anticorpos anti-*B. bovis* foi estatisticamente significativa. Alguns experimentos apresentam a importância dos anticorpos em proteger os animais contra a *Babesia*. Mahoney et al.,

(1979) apontaram que a transferência passiva de anticorpos protegia contra amostra homóloga de *Babesia*, mas não era capaz de proteger contra desafios com amostra heteróloga. Em 1995, Hines et al., afirmaram que anticorpos para o antígeno de superfície de *Babesia bovis* (MSP-1) bloqueava, *in vitro*, a invasão do parasito nas hemácias, porém não protegia as hemácias da invasão pelo parasito *in vivo*. A partir dessas observações pode-se concluir que a imunidade para *B. bovis* requer também células B (Wright et al., 1989).

Desse modo, esses dados confirmam a importância da resposta celular como ligação para o desenvolvimento da resposta imune humoral e conseqüentemente para o controle da infecção por *B. bovis*. Segundo Brown & Rice-Ficht (1994), as células T CD4<sup>+</sup> e as células B estão envolvidas na resistência de bezerros à infecção com *B. bovis*.

Após a resolução dessa parasitemia todos os animais tiveram novo aumento da parasitemia coincidindo com a queda de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da razão T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> circulantes, além de queda de células B CD21<sup>+</sup> na população de blastos. A resolução da parasitemia aconteceu provavelmente devido ao aumento de células B CD21<sup>+</sup>, de IgG e de células NK circulantes.

Portanto, é importante salientar que o estudo da resposta imune celular apontou evidências do envolvimento das células T CD4<sup>+</sup> nos mecanismos de proteção da infecção por *B. bovis*, uma vez que os animais sobreviventes foram capazes de recrutar células T CD4<sup>+</sup> restritas ao MHC de classe II e conseqüentemente ativar células B para a produção de anticorpos específicos anti-*B. bovis* e células da imunidade inata.

Em suma, a análise conjunta dos resultados, permitiram a elaboração de uma série de conclusões, que certamente contribuirão para o entendimento dos eventos imunológicos humorais e celulares desencadeados pela intervenção vacinal

proposta neste estudo para o controle da babesiose bovina. Além disso, a oportunidade de avaliar o estado imune de animais que foram capazes de sobreviver ao desafio com *B. bovis* fornece informações adicionais relacionadas à cinética da resposta imune durante os estágios iniciais da infecção.

## 8 CONCLUSÕES

1. A técnica de citometria de fluxo utilizando a hidroetidina permite o acompanhamento da parasitemia de animais infectados com *B. bovis*.
2. A intervenção vacinal com o peptídeo sintético 23290, derivado de RAP-1 de *B. bovis* reduz a taxa de mortalidade de animais imunizados, após o desafio com amostra patogênica.
3. A eficácia da vacinação, empregando o peptídeo 23290, está associada ao desenvolvimento precoce da habilidade de desenvolver uma resposta antígeno específica envolvendo células B e linfócitos T CD4<sup>+</sup>.
4. Animais não vacinados montam uma resposta antígeno específica pós-desafio envolvendo células B, mas não apresentam habilidade de recrutar células T CD4<sup>+</sup>.
5. Animais sobreviventes ao desafio com *B. bovis*, desenvolvem mecanismos de imunidade protetora que controlam a parasitemia. Estes eventos imunoprotetores são caracterizados pela expansão de células B, produção de IgG específica anti-*B. bovis*, elevação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e queda da população de células T CD8<sup>+</sup>.
6. Animais sobreviventes ao desafio com *B. bovis* apresentam pico de parasitemia tardia devido ao desaparecimento do padrão de imunidade protetora. Essa parasitemia é controlada pela elevação dos níveis de IgG específica anti-*B. bovis* e expansão da população de linfócitos NTNB, que promovem citotoxicidade mediada por anticorpos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, H. S.; HUSSEIN, H. S.; KREIER, J. P. *Babesia rodhaini*: passive protection of mice with immune serum. *Tropenmed. Parasitol.*, v. 29, p. 295-306, 1978.
- ADLER, H. et al. Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 198, p. 510-515, 1994.
- AGUIRRE, D. H. et al. Respuesta clínica y evolución del peso corporal en terneras (*Bos taurus*) vacunada simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. *Med. Vet.*, v. 8, p. 95-101, 1991.
- ARNOLD, R. M. Resistance to tick-borne disease. *Vet. Record.*, v. 60, p. 426, 1948.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie du bouef. *C. R. Acad. Sci.*, v. 107, p. 692-694, 1888.
- BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Design of peptide and polypeptide vaccines. *Cur. Opin. Biotechnol.*, v. 8, p. 442-448, 1997.
- BICALHO, K. A. *Uso da citometria de fluxo para detecção de Babesia canis*. 2001. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2001.
- BOCK, R. E. et al. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. *Aust. Vet. J.*, v. 72, p. 296-300, 1995.
- BOCK RE, KINGSTON TG, STANDFAST NF, DE VOS AJ. Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.*, v. 77, p. 465-466, 1999.
- BROWN, W. C.; et al. Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 2418-2426, 1991.
- BROWN, W. C. et al. *Babesia bovis*: characterization of the T helper cell response against the 42 kDa merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. *Exp. Parasitol.*, v. 77, p. 97-110, 1993a.
- BROWN, W. C. et al. Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis* immune cattle. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 3273-3281, 1993b.
- BROWN, W. C. et al. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unselected parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 4697-4708, 1994.
- BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A.C. Use of a helper T cells to identify potentially protective antigens of *Babesia bovis*. *Parasitol. Today*, v. 10, p. 145-149, 1994.
- BROWN, W. C. et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous-flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper T cell clones derived from *B. bovis* immune cattle. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 3106-3116, 1995a.
- BROWN, W. C. et al. Identification of candidate vaccine antigens of bovine hemoparasites *Theileria parva* and *Babesia bovis* by use of helper T cell clones. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p.189-203, 1995b.



- BROWN, W. C. et al. Characterisation of helper T cell responses against rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) of *Babesia* parasites. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 271, p. 128-135, 1996.
- BROWN, W. C.; ESTES, D. M. Type I and type II responses in cattle and their regulation. In: *CYTOKINES in veterinary medicine*. Wallingford: CAB International, 1997. p. 33.
- BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today*, v. 15, p. 275-281, 1999.
- BROWN, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.*, v. 101, p. 233-248, 2001.
- CALLOW, L. L.; MELLORS, L. J. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. *Aust. Vet. J.*, v. 42, p. 464-465, 1966.
- CALLOW, L. L. et al. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. *Aust. Vet. J.*, v. 50, p. 12-15, 1974.
- CHITO-McKOWN, C. G. et al. Interleukin-10 down regulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 and interferon- $\gamma$  but not interleukin-2 or interleukin-4 by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. *J. Interf. Cytok. Res.*, v. 15, p. 915-922, 1995.
- COMMINS, M. A.; GOODGER, B. V.; WRIGHT, I. G. Proteinases in the lysate of bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis*: initial vaccination studies. *Internat. J. Parasitol.*, v.15, p.491-495, 1985.
- COMMINS, M. A. et al. *Babesia bovis* studies of parameters influencing microvascular stasis of infected erythrocytes. *Res. Vet. Sci.*, v. 44, p. 226-228, 1988.
- COOPER, J. A. et al. The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum* consists of discrete polypeptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 29, p. 251-260, 1991.
- COURT RA, SITTE K, OPDEBEECK JP, EAST IJ. Mapping the T cell epitopes of the *Babesia bovis* antigen 12D3: implications for vaccine design. *Parasite Immunol.*, v. 20 p., 1-8, 1998.
- COURT RA, JACKSON LA, LEE RP. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. *Int J Parasitol.*, v. 31, p. 29-37, 2001.
- DALRYMPLE, B. P. Diversity and selection in *Babesia bovis* and their impact on vaccine use. *Parasitol. Today*, v. 8, p.21-23, 1992.
- DALRYMPLE, B. P. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop.*, v. 53, p.227-238, 1993a.
- DALRYMPLE, B. P. et al. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry proteins homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.57, p.181-192, 1993b.

- DAVIS, W. C. A rapid, reliable method of evaluating growth and viability of intraerythrocytic protozoan hemoparasites using fluorescence flow cytometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, Suplem. 3, p. 235-239, 1992.
- DIMMOCK C. K.; BELL K. Haemolytic disease of the newborn in calves. *Aust. Vet. J.*, v. 46, p. 44-47, 1970.
- DOURY, J.C. et al. Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of *Plasmodium falciparum* using monoclonal antibodies. *Parasitol.*, v.108, p. 269-280, 1994.
- EAST I.J. et al. Vaccination against *Babesia bovis*: T cells from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. *Int. J. Parasitol.*, v. 27, p. 1537-1545, 1997.
- ESTES D. M. et al.. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. *Cell. Immunol.*, v. 163, p. 268-279, 1995.
- ERP, E. E. et al. Growth of *Babesia bovis* in erythrocyte cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 27, p.1061-1064, 1978.
- EUGUI E. M.; ALLISON A. C. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. *Parasite Immunol.*, v. 2, p. 277-292, 1980.
- FELL A. H.; CURRIER J.; GOOD M. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth *in vitro* by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunol.*, v. 16, p. 579-86, 1994.
- FIGUEIREDO, J. F. *Produção e caracterização de painel de anticorpos monoclonais e identificação de antígenos de Babesia bovis*. 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.
- FIGUEIREDO, J. F. et al. Conservação da proteína de 60 kDa (RAP-1) em isolados de *Babesia bovis* de diferentes localidades geográficas do Brasil. *XI Seminário de Parasitologia Veterinária. II Seminário de Parasitologia do Mercosul e I Simpósio de Controle Integrado de Carrapatos do Brasil*. 24-28 de outubro de 1999, Salvador, Ba.
- FIGUEROA, J.V. et al. Evaluation of the serologic response of calves experimentally infected with *Babesia bigemina* by ELISA and immunoblotting techniques. In: *NATIONAL Veterinary Haemoparasite Disease Conference*, 18. ed. St Louis : MO. Proceeding St Louis, 1989, p. 377-394.
- FIGUEROA, J.V.; BUENING, G. M. *In vitro* inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, p. 997-1003, 1991
- FIGUEROA, J.V. et al. Identification of common surface antigens among *Babesia bigemina* isolates using monoclonal antibodies. *Parasitol.*, v. 100, p.161-175, 1991.
- FRANCIS, J.; LITTLE, D. A. Resistance of drought master cattle to tick infestation and babesiosis. *Aust. Vet. J.* v. 40, p. 247-253, 1964.
- FRANCIS, J. Resistance of zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. *Brit. Vet. J.*, v. 122, p. 301-307, 1966.

- FREITAS, C. M. B. *Resposta imune induzida por Babesia bovis (Starcovicci, 1983): reconhecimento e ativação ex vivo de peptídeos sintéticos e eventos celulares em linfonodos de bovinos*. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap 2., p. 23-52.
- FUKATA, T. et al. Detection of canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni* by flow cytometry. *J. Parasitol.*, v. 82, p. 641-642, 1996.
- GALE, K. R. et al. Vaccination against *Babesia bovis* using antigens produced by recombinant DNA technology. In: *RECENT development in the control of anaplasmosis, babesiosis and cowdriosis: proceedings of a workshop held at ILRAD*. Nairobi: Dolan, T.T. ILRAD, 1992 p. 113-120.
- GALLOP, P. et al. Dynamic approaches to the delivery of reporter reagents into living cells. *Bio Tech.*, v. 1, p. 32, 1984.
- GILL, A.; TIMMS, P.; KEMP, D. J. cDNA clone encoding a high molecular weight antigen of *Babesia bovis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 22, p. 195-202, 1987.
- GOFF, W.L. et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, v. 56, p. 2363-2368, 1988.
- GOFF, W.L. ; JOHNSON W. C.; CLUFF C. W. *Babesia bovis* immunity. *In vitro* and *in vivo* evidence for IL-10 regulation of IFN-gamma and iNOS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 849, p. 61-80, 1998.
- GOFF, W.L. et al. 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.*, v. 23, p. 463-471, 2001.
- GONZALES, J. C. O carrapato *Boophilus microplus* livre de *Babesia* spp em Santa Vitória do Palmar: RS: Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERI-NÁRIA, 7 : simpósio sobre a mosca dos chifres *Haematobia irritans*, 2. 1991, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n], 1991. p. 64.
- GOODGER B.V.; WRIGHT I. G. *Babesia bovis* (argentina): analysis of fibrinogen-like proteins during infection. *Z. Parasitenk.*, v. 60, p. 211-20, 1979.
- GOODGER B.V. et al. *Babesia bovis*: vaccination trial with a dominant immunodiffusion antigen in splenectomized calves. *Z. Parasitenk.*, v. 72, p. 715-722, 1986.
- GRAU G. E. et al. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol. Rev.*, v. 112, p. 49-70., 1989.
- GUGLIELMONE, A.A. et al. Vacunas congeladas contra la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos: viabilidad luego de la descongelación. *Rev. Cubana Cienc. Vet.*, v. 22, p. 233-240, 1991.
- HEMMER R. M., FERRICK D. A., CONRAD P. A. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFRp55-/- mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. *J. Parasitol.*, v. 86, p. 736-742, 2000.

- HINES A. S. et al. Molecular characterisation of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 37, p. 1-9, 1989.
- HINES A. S. et al. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 349-52, 1995.
- HOLDER, A. A., FREEMAN, R. R. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified antigens. *Nature*, v. 294, p. 361-364, 1981.
- HUGHES A. L., YEAGER M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu. Rev. Genet.*, v. 32, p. 415-435, 1998.
- IGARASHI I. et al. Roles of CD4(+) T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 4143-4148, 1999.
- IRVIN, A.D.; BROCKLESBY, D.W.; PURNELL, R. E. Radiation and isotopic techniques in the study and control of piroplasms of cattle: a review. *Vet. Parasitol.*, v. 5, p.17-30, 1979.
- JAMES, M. A. et al. Antibody kinetics in response to vaccination against *Babesia bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 42, p. 1999-2001, 1981.
- JAMES, M. A. Immunology of babesiosis. In: RISITC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 4, p.119-130.
- JAMES, M. A. et al. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 17, p. 9-18, 1985.
- JANSE C. J. et al. Plasmodium species: flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. *Exp. Parasitol.*, v. 64, p. 88-94, 1994.
- JOHNSON W. C. et al. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesicidal *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 23, p. 136-147, 1996.
- JOHNSTON, L. A. Y.; LEATCH, G.; JONES, P. N. The duration of latent infection and functional immunity in drought master and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.*, v.54, p. 14-18, 1978.
- JOHNSTON, L. A. Y.; HAYDOCK, K.P.; LEATCH, G. The effect of two systems of cattle tick (*Boophilus microplus*) control on tick populations, transmission of *Babesia* spp and *Anaplasma* spp and production of Brahman crossbred cattle in the dry tropics. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, v. 21, p. 256-267, 1981.
- JORGENSEN, W. K. et al. Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol. Res.*, v. 78, p. 423-426, 1992.
- KELLEY, R. B. Zebu-cross cattle in Northern Australia: an ecological experiment. *Council Sci. Indust. Res.*, Melbourne, 1943. (Bulletin n° 172) 96p.
- KLEIN J.; TAKAHATA N.; AYALA F. J. MHC polymorphism and human origins. *Sci. Am.*, v. 269, p. 78-83, 1993.

- KUMARATILAKE, L. M.; FERRANTE, A. IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* "in vitro". A possible parasite-immune evasion mechanism. *J. Immunol.*, v. 149, p.194-199, 1992.
- KUTTLER, K. L. et al. Efficacy of a nonviable culture-derived *Babesia bovis* vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 43, p. 281-184, 1982.
- KUTTLER, K. L.; LEVY M.G., RISTIC M. Cell culture-derived *Babesia bovis* vaccine: sequential challenge exposure of protective immunity during a 6-month post vaccination period. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 1456-1459, 1983.
- KUTTLER, K. L. Word wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 3, p. 2-22.
- LEVY, M.G.; RISTIC, M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilus stationary phase culture. *Science*, v. 207, p. 1218-1220, 1980.
- LEVY, M.G.; CLABAUGH, G.; RISTIC, M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.*, v. 37, p. 1127-1131, 1982.
- LOSOS, G. J. *Infectious tropical diseases of domestics animals*. Canada: Logman Scientific and Technical, 1986.
- MACHADO, R. Z. et al. *Babesia bigemina*: isolation and characterization of merozoite rhoptries. *Exp. Parasitol.*, v. 77, p. 315-325, 1993.
- MACHADO, R. Z. et al. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. *Exp. Parasitol.*, v. 93, p. 105-108, 1999.
- MADRUGA, C. R. et al. *Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no estado de Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião*. [S.l.]: Fundação Cargil, 1986. 40 p.(Circular técnica, n 18).
- MADRUGA, C. R. et al. *Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul*. Campo Grande EMBRAPA-CNPGC, 1987.
- MAHONEY D. F. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. *Ann Trop. Med. Parasitol.*, v. 63, p. 1-14, 1969.
- MAHONEY D. F.; GOODGER, B.V. *Babesia argentina*: immunogenicity of plasma from infected animals. *Exp. Parasitol.*, v. 32, p. 71-85, 1972.
- MAHONEY D. F.; WRIGHT I. G.; MIRRE G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*; v. 67, p. 197-203, 1973.
- Mahoney D. F., Mirre G. B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn *B. argentina*). *Res Vet Sci.*, v. 23, p.126-127, 1977.
- MAHONEY D. F.; et al. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. *Int. J. Parasitol.*, v. 9, p. 297-306, 1979.
- MAHONEY D. F.; MIRRE G. B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus*

*microplus*. *Res. Vet. Sci.*, v. 26, p. 253-254, 1979.

MAHONEY D. F.; GOODGER, B.V. The isolation of *Babesia argentina*: immunisation of cattle with a killed antigen against infection with heterologous strain. *Vet. Parasitol.*, v. 2, p. 273-278, 1981.

MAHONEY D. F. In: MORRISON, W. I. *The ruminant immune system in health and disease*. [S.I]: Cambridge University Press, 1986. p. 539-545.

MANETTI R. et al. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.*, v. 179, p. 1273-1283, 1994.

MANGOLD A. J. ; AGUIRRE D. H.; GUGLIELMONE A. Post-thawing viability of vaccines for bovine babesiosis and anaplasmosis cryopreserved with glycerol. *Vet. Parasitol.*, v. 37, p. 301-306, 1990.

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

McELWAIN, T. F. et al. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J. Immunol.*, v. 138, p. 2298-2304, 1987.

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

McGUIRE T. C.; MUSOKE A. J.; KURTTI T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunol.*, v. 38, p. 49-56, 1979.

MEEUSEN E.; LLOYD S.; SOULSBY E. J. *Babesia microti* in mice. Adoptive transfer of immunity with serum and cells. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v. 62, p. 551-566, 1984.

MEEUSEN E.; LLOYD S.; SOULSBY E. J. Antibody levels in adaptively immunized mice after infection with *Babesia microti* or injection with antigen fractions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v. 63, p. 261-272, 1985.

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

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis I: the synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 85, p. 21-49, 1963.

MISHRA, V. S. et al. Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p 58: a neutralization-sensitive, antigenically conserved *Babesia bigemina* merozoite surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 47, p. 207-212, 1991.

MONTEALEGRE F. et al. Growth inhibition of *Babesia bovis* in culture by secretions from bovine mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.*, v. 50, p. 523-526, 1985.

MONTENEGRO-JAMES, S. Immunoprophylactic control of bovine babesiosis: role of exo-antigens of *Babesia*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 85-94, 1989.

MONTENEGRO-JAMES, S. et al. Bovine babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. *Parasitol. Res.*, v. 74, p. 142-150, 1987.

MONTENEGRO-JAMES, S. et al. Heterologous strain immunity in bovine babesiosis using a culture-derived soluble *Babesia bovis* immunogen. *Vet. Parasitol.*, v.18, p.321-337, 1985.

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

NEURATH, A.R.; KENT, S. B. Requirements of successful synthetic peptide vaccines. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, v. 137, p. 513-514, 1986.

O'DONOGHUE, P. J. et al. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. *Vet. Parasitol.*, v. 18, p. 1-12, 1985.

ORINDA G. O. et al. Bovine babesiosis: failure to induce interferon gamma production in response to *Babesia bovis* antigens in cattle. *Int. J. Parasitol.*, v. 22, p. 395-398, 1992.

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

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

PATARROYO, J. H. S. *Babesia bovis* caracterização, identificação e purificação

de exo-antígenos obtidos de culturas in vitro: vacinação experimental de bovinos. 1990. 217 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.

PATARROYO, J. H. S. et al. Mapeamento de epítomos T reativos da proteína Bv60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1999. Salvador. *Anais ...* Salvador: [s.n], 1999. p. 197.

POUND, C. J. Notes on the inoculation of bulls as a preventative against tick fever at Rat Downey and Rosedale. *Queensl. Agric. J.*, v. 18, p. 281, 1897.

PURVIS A. C. Immunodepression in *Babesia microti* infections. *Parasitol.*, v. 75, p.197-205, 1977.

REDUKER, D. W. et al. A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicits antibodies that react with live merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.35, p.239-248, 1989.

RICHARDSON, M. D. et al. Computer-assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. *J. Immunol. Meth.*, v. 9, p. 557-562, 1983.

RIDLEY, R.G. et al. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in Saimiri monkeys. *Parasitol.*, v. 101, p. 187-192, 1990.

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

ROSS, J. P. J.; LÖRH, K. F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.*, v. 9, p. 557-562, 1968.

- RUEBUSH M. J.; TROUTMAN E. H.; KENNEDY D. A. Delayed-type hypersensitivity to *Babesia microti*-infected erythrocytes in mice. *Cell Immunol.*, v. 98, p. 289-299, 1986.
- RUIZ, P. M. G. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 237-240, 2001.
- SACCO, A. M. S. *Babesiose bovina: avaliação de diferentes imunógenos no processo de imunização de bovinos e da resposta humoral produzida, através da RIFI e ELISA*. 1996. 239 f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.
- SAEKI H.; ISHII T. Effect of silica treatment on resistance to *Babesia rodhaini* infection in immunized mice. *Vet. Parasitol.*, v. 61, p. 201-210, 1996.
- SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today*, v. 12, p. 308-315, 1996.
- SCHETTERS, T. P. M.; MONTENEGRO-JAMES, J. Vaccines against babesioses using soluble parasite antigens. *Parasitol. Today*, v. 11, p. 456-462, 1995.
- SCHETTERS, T. P. M. et al. Parasites localization and dissemination in the *Babesia* - infected host. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 92, p. 513-519, 1998.
- SHAIO, M. F.; LIN, P. R. A case study cytokine profiles in acute human babesiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58, p. 335-337, 1998.
- SIBINOVIC, K. H. et al. Immunogenic properties of *Babesia* serum antigens. *J. Parasitol.*, v.53, p.1121-1124, 1967.
- SMITH, R. D. et al. Bovine babesiosis: protection of cattle with culture derived soluble *Babesia bovis* antigen. *Science*, v. 212, p. 335-338, 1981.
- SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. *USDA Bur. Anim. Ind. Bull.*, v. 1, p. 7-269, 1893.
- SMITH, T. et al. Bovine babesiosis: vaccination against tick-borne challenge exposure with culture-derived *Babesia bovis* immunogens. *Am. J. Vet. Res.*, v. 40, p. 1678-1682, 1979.
- SODA, L. K. M. et al. *Babesia bovis* stimulated macrophages express interleukin-1b, inter-leukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide and inhibit parasite replication *in vitro*. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 5139-5145, 2000.
- SOLARI, M. A. A.; NARI, A.; CARDOZO, H. Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, on the production of beef cattle in Uruguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, suplement III, p. 143-149, 1992.
- SPÄTH, E. J. A.; MANGOLD, A. J. Algunas características de producción y sanidad de rodos de Ganado bovino de carne en el Sudeste de Salta y norte de Tucuman. *Rev. Arg. Prod. Ani.*, v. 6, p. 101-112, 1986.
- STICH R.W. et al. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 4130-4136, 1998.



- STICH R.W. et al. *Babesia bovis*: common protein fractions recognized by oligoclonal *B. bovis*-specific CD4<sup>+</sup> T cell lines from genetically diverse cattle. *Exp. Parasitol.*, v.91, p.40-51, 1999.
- 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.*, v.46, p.45-52, 1991.
- SUAREZ, C. E. et al. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 3511-3517, 1993.
- SUAREZ, C. E. et al. Sequence and functional analysis of the intergenic regions separating *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 (rap-1) genes. *Exp. Parasitol.*, v. 90, p. 189-194, 1998a.
- SUAREZ, C. E. et al. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 93, p. 215-224, 1998b.
- TAYLOR, S. M. *Babesia* vaccines attenuated by blood passage and irradiation. In: WRIGHT, I.G. *Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 43-59.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol. Today*, v. 11, p. 334-342, 1995.
- TIMMS, P. et al. *Babesia bovis*: comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. *Aust. Vet. J.*, v. 60, p. 75-77, 1983.
- TIMMS, P. et al. Immune responses of cattle following vaccination with living and non-living *Babesia bovis* antigens. *Vet. Parasitol.*, v. 16, p. 243-251, 1984.
- TIMMS, P.; BARRY, D. N. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. *Res. Vet. Sci.*, v. 45, p. 267-269, 1988.
- TIMMS, P. Development of Babesial vaccines. *Transc. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 73-79, 1989.
- TODOROVIC, R. A.; GONZALES, E.F.; ADAMS, L.G. Bovine babesiosis: sterile immunity to *Babesia bigemina* and *Babesia argentina* infections. *Trop. Anim. Health Product.*, v. 5, p. 234-245, 1973.
- TODOROVIC, R. A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp infections in Colombian cattle. *Tropenmed Parasitol.*, v. 27, p. 169-81, 1976.
- TRUEMAN, K. F.; BLIGHT, G. W. 1978. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aust. Vet. J.*, v. 54, p. 301-305, 1978.
- TUO, W.; ESTES, D. M.; BROWN, W. C. Comparative effects of interleukin-12 and interleukin-4 on cytokine responses by antigen-stimulated memory CD4<sup>+</sup> T cells of cattle: IL-12 enhances IFN- $\gamma$  production, whereas IL-4 has marginal effects on cytokine expression. *J. Interf. Cyt. Res.*, v. 19, p., 741-749, 1999.
- WAHLGREN, M. et al. Why do *Plasmodium falciparum* : infected erythrocytes form spontaneous severe immunodeficiency mouse model for

cerebral malaria. *J. Exp. Med.*, v. 182, p. 643-645, 1995

WALTISBUHL, D. J. et al. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.*, v. 73, p. 126-131, 1987a.

WALTISBUHL, D. J. et al. *Babesia bovis*: vaccination studies with three groups of high molecular weight antigens from lysate of infected erythrocytes. *Parasitol. Res.*, v. 73, p. 319-323, 1987b.

WINGER, C. M.; CANNING, E. U.; CULVERHOUSE, J. D. A monoclonal antibody-derived antigen of *Babesia divergens*: characterisation and investigation of its ability to protect gerbils against virulent homologous challenge. *Parasitol.*, v. 3, p. 341-348, 1989.

WRIGHT, I. G. et al. The irradiation of *Babesia bovis*: II the immunogenicity of irradiated blood parasites for intact cattle and splenectomised calves. *Vet. Immunol. Immunophat.*, v. 3, p. 591-601, 1982.

WRIGHT, I. G. et al. *Babesia bovis*: isolation of a protective antigen by using monoclonal antibodies. *Infect. Immunol.*, v. 41, p. 244-250, 1983.

WRIGHT, I. G. et al. Protective vaccination against virulent *Babesia bovis* with a low molecular weight antigen. *Infect. Immunol.*, v. 48, p. 109-113, 1985.

WRIGHT, I. G.; GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. In: RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 99-118.

WRIGHT, I. G.; GOODGER, B.V.; CLARK, I. A. Immunopathology of *Babesia bovis*

and *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitol. Today*, 1988.

WRIGHT, I. G. et al. Immunopathophysiology of *Babesia* infections. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 11-13, 1989.

WRIGHT, I. G. Towards a synthetic *Babesia* vaccine. *Internat. J. Parasitol.*, v. 21, p. 155-159, 1991.

WYATT, C. R.; GOFF, W.; DAVIS, W. C. A flow cytometry method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *J. Immunol. Meth.*, v. 140, p. 23-30, 1991.

WRIGHT, I. G. et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Parasitol.*, v. 44, p. 3-13, 1992.

