

BRÁULIA COSTA CAETANO

**ESTUDOS DE CITOADERÊNCIA “IN VITRO” DE ERITRÓCITOS
DE BOVINOS INOCULADOS COM *Babesia bovis* (STARCOVICI,
1893) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA BOVINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

BRÁULIA COSTA CAETANO

**ESTUDOS DE CITOADERÊNCIA “IN VITRO” DE ERITRÓCITOS
DE BOVINOS INOCULADOS COM *Babesia bovis* (STARCOVICI,
1893) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA BOVINA**

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

APROVADA: 16 de março de 2001.

Prof.^a Marlene I. Vargas Vilória
(Conselheira)

Dra. Gerda U. Kilger

Prof. Múcio Flávio B. Ribeiro

Prof. Carlos Luiz Massard

Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo
(Orientador)

Aos meus pais Romualdo Luiz Caetano e Maria das Dores Costa Caetano.

Aos meus irmãos Wandinho, Néia, Marci e Alex.

Pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTO

A DEUS por todas as graças concedidas.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pelo estímulo de incursão na vida acadêmica e científica, pela orientação que tornou este trabalho possível e pelos anos de amizade.

À professora Marlene I. Vargas Vilória, pela amizade e os constantes debates que enriqueceram não só este trabalho, mas também meu conhecimento técnico e científico.

À Dra. Gerda Kilger, pela amizade, pelo treinamento e os conhecimentos que foram essenciais para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

A Aline Alencar Prates, pela amizade, paciência e ajuda incondicionais, que se estenderam muito além do ambiente de trabalho.

A Márcio Mendes pela amizade e grandes idéias que sempre ajudaram a resolver os complicados problemas técnicos no laboratório.

Aos colegas de laboratório Carla, Jorge, Daniela, Sidimar, Márcio Antônio e Ricardo Portela pelo auxílio incansável e irrestrito no trabalho e, principalmente, pela grande amizade.

Aos colegas de mestrado Ana Elisa, Daniele, Eduardo, Nara, Nivaldo, Tereza, Waneska, Juan Carlos, Leonardo, Roberto, Flávia, Francismar e Mayra pelo convívio e amizade.

A Cauzinho e Zé Carlos pelo trato cuidadoso com os animais do isolamento.

A Selma, Walkyria, Alba e Fátima, que transformaram uma república numa casa.

Aos meus grandes amigos Scheila, Nino, Viviana, Raquel e Karlaine cujo carinho, apoio e paciência estão além de qualquer palavra de agradecimento.

Aos professores do curso de pós graduação em Medicina Veterinária pelos conhecimentos e experiências transmitidas.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de suporte financeiro para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

BRÁULIA COSTA CAETANO, filha de Romualdo Luiz Caetano e Maria das Dores Costa Caetano, nascida em 14 de março de 1975, na cidade de Alvinópolis-MG.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-MG em 1994. Durante a graduação participou do programa de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do convênio do Conselho de Pesquisa da UFV/CNPq, realizando projetos na área de Parasitologia Veterinária no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Departamento de Veterinária/BIOAGRO – UFV.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa em abril de 1999.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Ciclo de vida da <i>Babesia bovis</i> no bovino.....	7
2.2 Fisiopatologia da babesiose bovina.....	8
2.3 Moléculas envolvidas no desenvolvimento de adesão.....	13
2.3.1 Moléculas expressas na superfície das hemácias parasitadas.....	13
2.3.2 Receptores endoteliais para as moléculas dos parasitas expressas no eritrócito.....	15
2.4 Citoaderência como mecanismo de escape imunológico de hemoparasitas.....	17
2.5 Modelos “in vitro” para estudo da citoaderência.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Animais.....	25
4.2 Amostras de <i>Babesia bovis</i>	25
4.3 Cultivos celulares.....	26
4.4 Delineamento experimental.....	28
4.5 Teste de adesão de eritrócitos em células endoteliais.....	29
4.6 Imunofluorescência de eritrócitos fixados para detecção de exoantígenos de <i>Babesia bovis</i>	30
4.7 Sensibilização de hemácias com exoantígenos de <i>Babesia bovis</i> e testes de hemaglutinação passiva.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Estabelecimento dos cultivos primários de célula endoteliais de aorta bovina.....	33

5.2 Experimento com amostra patogênica BbovUFV1 7 ^a passagem	33
5.3 Experimento com amostra atenuada BbovUFV1 26 ^a passagem..	39
5.4 Experimento com amostra patogênica Jaboticabal 7 ^a passagem..	47
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	65
7.1 Perspectivas futuras.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADCC – Citotoxicidade Celular Mediada por Anticorpos
- BAECs – Células Endoteliais de Aorta Bovina
- BbovUFV1 – amostra de *Babesia bovis* UFV1
- CD – “Cluster of Differentiation”
- DAF – Fator Acelerador do Decaimento Funcional
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- HPR – Proteína Rica em Histidina
- ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular 1
- IFN γ – Interferon Gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL-1 – Interleucina 1
- LFA-1 – Antígeno de Função Leucocitária 1
- MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
- PfEMP1 – Proteína de Membrana Eritrocitária 1 do *Plasmodium falciparum*
- TNF – Fator de Necrose Tumoral
- TSP – Trombospondina
- VCAM-1 – Molécula Vascular de Adesão Celular 1
- VESA 1 – Antígeno Variável de Superfície Eritrocitária 1 da *Babesia bovis*
- VLA-4 – Antígeno Leucocitário Tardio 4

RESUMO

CAETANO, Bráulia Costa M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Citoaderência “in vitro” de eritrócitos de bovinos inoculados com *Babesia bovis* (Starcovici, 1893) em células endoteliais de aorta bovina.** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e João Carlos Pereira da Silva.

Eritrócitos de bovinos inoculados com amostras de *Babesia bovis* (BbovUFV1 7^a passagem e Jaboticabal 7^a passagem, patogênicas e BbovUFV1 26^a passagem, atenuada) foram testados quanto à sua capacidade de aderir em células endoteliais de aorta bovina (BAECs) “in vitro”. Paralelamente, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta com amostra de sangue periférico dos animais para detecção da presença de eritrócitos portando antígenos de *B. bovis* em sua superfície e testes de hemaglutinação passiva para detecção de antígenos livres de *B. bovis* nos soros dos mesmos. Houve aumento significativo no número de eritrócitos não parasitados aderidos dos animais inoculados com amostra patogênica BbovUFV1 7^a passagem, que se associou ao aparecimento de antígenos livres de *B. bovis* no soro e de eritrócitos não parasitados marcados com antígenos do parasita no sangue periférico. Estes resultados não foram observados nos testes com amostras dos animais inoculados com BbovUFV1 26^a passagem atenuada. Eritrócitos obtidos dos animais inoculados com amostra patogênica Jaboticabal 7^a passagem não se mostraram aderentes às BAECs a despeito dos animais terem apresentado eritrócitos não parasitados modificados com

antígenos de *B. bovis* em sua superfície e níveis transitórios de antígenos livres no soro. Os dados sugerem que a modificação da superfície de eritrócitos não parasitados por antígenos de *B. bovis* presentes no soro dos animais inoculados pode levar a adesão eritrocitária “in vitro”. Porém as modificações não culminam sempre em desenvolvimento de adesão, visto que os antígenos de *B. bovis* que marcam os eritrócitos não parasitados podem variar em sua estrutura e capacidade de ligação em receptores endoteliais.

ABSTRACT

CAETANO, Bráulia Costa M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001. **“In vitro”cytoadherence of erythrocytes from cattle infected with *Babesia bovis* to bovine aortic endothelial cells.** Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilória and João Carlos Pereira da Silva.

Erythrocytes from cattle infected with *Babesia bovis* strains BbovUFV1 7th passage and Jaboticabal 7th passage, both pathogenic, and BbovUFV1 26th passage, attenuated strain, were assayed for binding to bovine aortic endothelial cells (BAECs) “in vitro”. In parallel, peripheral blood samples were assayed in an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) to detect erythrocytes bearing *B. bovis* antigens on its surface and serum samples were used in haemagglutination tests for detection of free soluble *B. bovis* antigens. A significant increase in the number of adherent erythrocytes was observed for erythrocytes from animals infected with the pathogenic strain BbovUFV1 7th passage, which was associated to the appearance of *B. bovis* antigens released in the serum, as well as to the appearance of non-parasitised erythrocytes marked with parasite’s antigens. These results were not observed in tests with serum and blood samples of animals inoculated with the attenuated strain BbovUFV1 26th passage. Erythrocytes obtained from animals inoculated with pathogenic strain Jaboticabal 7th passage did not adhere to BAECs, despite the presence of non-parasitized erythrocytes modified with *B. bovis* in blood and transient levels of free antigens in serum of inoculated animals. The data

suggests that surface modifications on non-parasitized erythrocytes by *B. bovis* antigens in the serum of the inoculated animals could lead to erythrocytic adhesion “in vitro”. However, these modifications do not always lead to adhesion, because the *B. bovis* antigens which mark the non-parasitised erythrocytes can vary in structure and endothelial receptors binding properties.

1. INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é uma doença causada por hemoparasitas do gênero *Babesia*, que se caracteriza por febre, anemia e icterícia. Os animais que se recuperam da fase aguda podem desenvolver infecções crônicas inaparentes de longa duração. Esta parasitose afeta bovinos criados em áreas de clima tropical e subtropical, sendo responsável por perdas econômicas para a pecuária de leite e de corte. Dentre as espécies de *Babesia* que afetam os bovinos, a mais patogênica é a *Babesia bovis*, sendo transmitida aos animais por meio de picada de carrapatos do gênero *Boophilus*.

Após ser inoculada na corrente sanguínea, a *B. bovis* penetra em eritrócitos, dentro dos quais se multiplica. Durante seu desenvolvimento, o parasita libera enzimas proteolíticas que, no plasma, ativam as cascatas de coagulação, cininas e complemento, gerando substâncias que ativam a resposta inflamatória. A *B. bovis* também produz alteração da composição lipídica e protéica dos eritrócitos. Estas modificações reduzem a plasticidade e resistência da membrana, facilitando o processo de ruptura do eritrócito para liberação de formas parasitárias jovens que irão infectar novos eritrócitos. Por outro lado, os eritrócitos parasitados que sofreram alterações de membrana aderem às células

endoteliais e se agregam a eritrócitos não parasitados. Isto traz como conseqüências a retenção de eritrócitos na microcirculação e a obstrução de capilares e vênulas pós capilares do cérebro, pulmões, epicárdio, mesentério, rins, entre outros.

A obstrução circulatória dificulta a perfusão de oxigênio nos tecidos e potencializam a resposta inflamatória gerada pelas substâncias induzidas pela *B. bovis*. Pode-se também observar o acúmulo de leucócitos nos tecidos inflamados, principalmente nos pulmões, os quais aumentam o grau de injúria.

Na malária humana, provocada pelo *Plasmodium falciparum*, também ocorre adesão e seqüestro de eritrócitos na microcirculação, com conseqüências patológicas similares às descritas para a babesiose. Na malária, a citoaderência é resultado da interação entre proteínas do *P. falciparum* expostas na membrana dos eritrócitos e receptores na superfície das células endoteliais. Os antígenos de *P. falciparum* também mediam a agregação de eritrócitos não parasitados em torno dos eritrócitos parasitados, formando rosetas. Acredita-se que mecanismos semelhantes produzam adesão e agregação eritrocitária nas infecções por *B. bovis*.

A resposta imune adaptativa do hospedeiro à *B. bovis* ou ao *P. falciparum* consiste no reconhecimento de antígenos destes parasitas na superfície de merozoítos livres e eritrócitos parasitados e fagocitose dos mesmos pelas células do sistema monocítico-fagocitário do baço ou fagócitos periféricos. Ao aderirem no endotélio, os eritrócitos parasitados evitam o contato com as células do sistema imune. As rosetas permitem que os merozoítos passem diretamente de um eritrócito a outro, sem o risco da ocorrência de fagocitose. Dentro das rosetas, os eritrócitos parasitados também ficam protegidos de células do sistema imune. A produção de anticorpos bloqueadores contra as moléculas de adesão seria uma alternativa para o hospedeiro anular estes mecanismos de escape imunológico dos parasitas, porém as proteínas envolvidas na adesão sofrem variação constante em sua estrutura e antigenicidade. Isto faz com que os anticorpos produzidos contra uma molécula de adesão tenham eficácia por um tempo limitado.

O estudo da dinâmica do processo de citoaderência, bem como a caracterização das moléculas expressas pelo parasita e seus ligantes, abrem uma nova perspectiva para o desenvolvimento de formas de controle e prevenção da babesiose bovina. Podem-se produzir peptídeos baseados na estrutura dos antígenos responsáveis pela adesão, que compitam pelos receptores endoteliais, evitem a adesão de eritrócitos e impeçam o desenvolvimento de lesões associadas à adesão. Alternativamente, há a possibilidade de identificar epítomos imunogênicos conservados entre as isoformas de uma proteína de adesão e, a partir daí, desenvolver vacinas capazes de induzir anticorpos bloqueadores eficazes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As babesioses constituem um grupo de doenças infecciosas causadas por parasitas intraeritrocitários do gênero *Babesia*, que afetam mamíferos domésticos e selvagens. Elas podem se apresentar na forma aguda - na qual os principais sinais são anemia, icterícia e febre - ou crônica/inaparente. A gravidade do quadro clínico e os níveis de mortalidade dependem da espécie e amostra do parasita e do grau de imunidade dos hospedeiros (RISTIC & KREIER, 1981).

BABES (1888), na Romênia, foi o primeiro a caracterizar as babesias, as quais ele observou em eritrócitos de bovinos com sinais de hemoglobinúria enzoótica e denominou *Hematococcus bovis*. Em 1893, SMITH e KILBORNE descreveram microorganismos similares em eritrócitos de bovinos acometidos de Febre do Texas, uma doença comum no sudoeste dos Estados Unidos. No mesmo ano, estes dois pesquisadores determinaram que a transmissão do agente da Febre, então denominado *Pyrosoma bigeminum*, era feita pelo carrapato *Boophilus annulatus*. STARCOVICI (1893), revisando os trabalhos de Babes (1888) e de Smith & Kilborne (1893), concluiu que se tratavam de duas espécies de parasitas intimamente relacionadas, cujos nomes foram alterados para *Babesia*

bovis (*Hematococcus bovis*) e *Babesia bigemina* (*Pyrosoma bigeminum*) (KUTTLER, 1988).

O primeiro relato completo da presença de *Babesia* na Argentina foi feito por LIGNIERES em 1903. Na época, o pesquisador assinalou a ocorrência de duas amostras de *Babesia bigemina* com morfologia distinta. A menor delas, difícil de observar em esfregaços sangüíneos, porém facilmente encontrada nos capilares dos rins e meninges, recebeu o nome *Pyroplasma argentinum* e, mais tarde, *Babesia argentina* (KUTTLER, 1988).

A primeira descrição de *Babesia* no Brasil se deve a FAJARDO em 1901, em sangue de bovinos importados para os estados do Rio de Janeiro. CARINI (1906), em uma análise dos parasitas causadores da “tristeza” no estado de São Paulo, relatou uma espécie semelhante a *Babesia argentina* (SIQUEIRA, 1991).

Por volta de 1930, várias espécies de *Babesia* já haviam sido descritas em seus respectivos hospedeiros, assim como as doenças a elas associadas, sua distribuição geográfica e vetores. As divergências entre os estudiosos quanto à classificação e nomenclatura do gênero se deveram, em parte, às variações morfológicas entre os parasitas isolados por diferentes pesquisadores. Vários nomes foram propostos, na medida em que eram descobertas as “grandes babesias” (*Pyroplasma*), “pequenas babesias” (*Microbabesia*, *Babesiella*), ou ainda, aquelas que produziam 4 merozoítos por eritrócito (*Nutallia*). Na década de 70, houve a uniformização da classificação, graças ao desenvolvimento de métodos imunológicos e de microscopia eletrônica e do estudo mais aprofundado do ciclo de vida do parasita (MAHONEY, 1977).

Atualmente os agentes causadores das babesioses são classificados dentro do subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Piroplasmorida, família Babesiidae e gênero *Babesia* (LEVINE, 1988). As espécies de babesia que afetam os bovinos são *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. jakimovi*, *B. occultans* e *B. ovata* (KUTTLER, 1988). No Brasil, foram identificadas apenas as duas primeiras, sendo a mais comum a *B. bovis* (PATARROYO et al., 1982).

A *B. bigemina* é uma espécie considerada pouco patogênica, normalmente associada a anemia não complicada. Já a *B. bovis* é altamente patogênica, capaz de causar complicações inflamatórias generalizadas e obstrução da microcirculação por eritrócitos parasitados em órgãos como cérebro e pulmões, levando à disfunção dos mesmos (MAHONEY, 1977).

A transmissão da *Babesia bovis* aos bovinos se dá pela picada de carrapatos da família Ixodidae, que não são apenas carreadores mecânicos, mas se comportam como vetores biológicos, na medida em que o protozoário completa a fase de reprodução sexuada do seu ciclo dentro do organismo daqueles artrópodes. Em geral, a transmissão de *B. bovis* em uma área está associada a um único vetor, mas a associação pode mudar de uma região para outra. Assim, na Austrália e na América do Sul a *B. bovis* é transmitida pelo *Boophilus microplus*, na África pelo *Boophilus annulatus* e na Europa pelo *Rhipicephalus bursa* (FRIEDHOFF, 1988).

A babesiose bovina é uma parasitose que ocorre em países tropicais e subtropicais localizados em regiões a 32°S e 40°N de latitude. Essa distribuição é definida pela ecologia dos vetores, que encontram plenas condições de desenvolvimento naquele tipo de clima. Assim, a babesiose pode ser identificada em grande parte da África, sul da Europa, sul da Ásia, América Central e do Sul e ilhas do Caribe (KUTTLER, 1988).

Tanto bovinos quanto bubalinos podem sofrer infecções por *B. bovis* (PURNELL, 1981). Dentre os bovinos, as raças provenientes de clima tropical são mais resistentes ao desenvolvimento de babesiose que as raças taurinas. Isso foi comprovado nos experimentos de BOCK et al. (1999), que expuseram animais não imunes de raça índica e seus cruzamentos a pastagens infestadas com *Boophilus microplus* infectado com amostra patogênica de *B. bovis*. Eles observaram que no grupo dos índicos apenas 1% dos animais desenvolveram sinais clínicos de babesiose. No grupo dos taurinos 19% dos animais testados desenvolveram sinais graves da doença. Ao buscar as causas da maior susceptibilidade destes animais, os autores concluíram que ela se deve, em parte, à menor resistência destas raças à infestação por carrapatos. Ao desenvolverem

maior carga de ectoparasitas, os taurinos também recebem maior inoculação de *B. bovis*.

A babesiose provoca perdas econômicas para a bovinocultura. A mortalidade de animais é a consequência mais evidente da babesiose. Os maiores índices ocorrem entre animais *Bos taurus*, principalmente entre os não imunes recém introduzidos em áreas endêmicas. Este fato tem se constituído num dos maiores problemas para as estratégias de melhoramento de produtividade dos rebanhos em países de clima tropical, que são baseadas na introdução de raças de clima temperado em substituição às raças nativas, que têm menor capacidade produtiva (YIN et al., 1996). A estratégia alternativa – produção de cruzamentos entre zebuínos e taurinos – não têm gerado resultados satisfatórios, pois os híbridos não guardam características de resistência e produtividade que tornem sua utilização vantajosa perante os animais puros (BOCK et al., 1999).

As perdas de produção também devem ser consideradas ao se medir o impacto da babesiose na bovinocultura. Tais perdas incluem diminuição na produção de carne e leite, abortos e infertilidade temporária nos machos devida a febre alta. Por fim, ainda devem ser lembrados os gastos com os animais doentes, incluindo aplicação de medicamentos (McCOSKER, 1981).

2.1 Ciclo de vida da *Babesia bovis* no bovino

A infecção dos bovinos tem início com a inoculação na corrente sangüínea das formas infectantes da *Babesia bovis* - os esporozoítos - presentes na saliva dos carrapatos. Os esporozoítos penetram nas hemácias e se diferenciam em trofozoítos, que se multiplicam assexualmente pelo processo de divisão binária simples ou múltipla. A divisão dos trofozoítos dá origem a dois merozoítos que saem para infectar outras hemácias. O ciclo se repete, com a diferenciação dos merozoítos em trofozoítos e divisão, a cada oito horas. Após alguns ciclos de replicação, parte dos merozoítos pode se desenvolver a gametócitos masculinos ou femininos que continuarão o ciclo da *B. bovis* no organismo do carrapato (MELHORN & SCHEIN, 1984).

Os merozoítos são os estágios evolutivos da *B. bovis* normalmente observados nos esfregaços de sangue periférico de animais infectados. Os merozoítos podem ser arredondados ou piriformes, com 1 a 2,5µm de diâmetro e se apresentam únicos ou em pares dentro da hemácia. A análise da ultraestrutura mostra que o merozoíto é circundado por uma película formada de duas membranas e uma camada de microtúbulos. Numa das extremidades da célula encontra-se o complexo apical formado de diversas organelas especializadas: as roptrias, micronemas, anel polar e conóide (RUDZINSKA, 1981). Os merozoítos livres apresentam ainda uma capa formada de fibrilas protéicas perpendiculares à membrana plasmática. Essa capa e as organelas do complexo apical são importantes no processo de invasão da célula hospedeira (IGARASHI et al., 1988).

A penetração do merozoíto no eritrócito se dá inicialmente com a fixação do mesmo sobre a célula. Esta é uma interação extremamente específica e a *B. bovis* não invade outro tipo celular. Isto implica que existe(m) receptor(es) no eritrócito que reconhece(m) molécula(s) complementar(es) no parasita, provavelmente presentes na capa externa do merozoíto (BUSHELL et al., 1991).

Logo após a ligação, há uma reorientação do merozoíto sobre a superfície do eritrócito, de maneira que o complexo apical entre em contato com a membrana plasmática. O conteúdo das roptrias e micronemas é liberado sobre a membrana eritrocitária, induzindo à formação de um vacúolo e internalização do merozoíto. No interior da célula hospedeira, a membrana do vacúolo é destruída e o merozoíto fica em contato com o citoplasma (JACK & WARD, 1981).

2.2 Fisiopatologia da babesiose bovina

A fisiopatologia da babesiose é similar, em muitos aspectos, à da malária provocada pelo *Plasmodium falciparum*. Em ambas infecções, a proliferação dos patógenos no organismo é acompanhada de três eventos responsáveis pelo desenvolvimento de lesões: a) destruição de hemácias; b) liberação de mediadores químicos farmacologicamente ativos que produzem alterações

circulatórias e c) seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação (WRIGHT, et al. 1988). O grau de lesão provocada e os sinais clínicos resultantes dependem da patogenicidade da amostra de *Babesia bovis* e *Plasmodium falciparum* e da susceptibilidade do hospedeiro (WRIGHT & GOODGER, 1988).

A anemia manifestada na babesiose e na malária é resultado direto da ruptura dos eritrócitos pela saída de merozoítos. Na babesiose, o aumento da atividade fagocitária do sistema monocítico-fagocitário do baço e do fígado, para retirada de células parasitadas da circulação, também eleva a taxa de retirada de eritrócitos normais e contribui para a anemia (MAHONEY, 1977).

A *B. bovis* produz esterases capazes de converter a pré calicreína plasmática em calicreína ativada (WRIGHT & GOODGER, 1973). Esta última desencadeia a cascata de produção de bradicinina. A calicreína e a bradicinina são potentes vasodilatadores e causam estase sangüínea e hipotensão (WRIGHT & KERR, 1977). Além disso, elas atuam em conjunto na ativação da coagulação pela via do fator de Hageman. Ao contrário do que inicialmente se pensava, a ativação da coagulação não leva à formação de trombos, mas a um profundo distúrbio no metabolismo do fibrinogênio, representado pelo acúmulo de intermediários solúveis da conversão de fibrinogênio em fibrina. Os mais importantes são monômeros de fibrina ou fibrina complexada com fibrinogênio (WRIGHT, 1981). No sangue, estes complexos podem aumentar a viscosidade do plasma e agravar os problemas de circulação iniciados pela calicreína/bradicinina (WRIGHT & GOODGER, 1988).

Outros mediadores também citados como causadores de distúrbios circulatórios na babesiose são as aminas biogênicas histamina e 5-hidroxitriptamina (WRIGHT, 1978) e as anafilotoxinas C5a e C3a. As duas últimas são liberadas na via alternativa do complemento, desencadeada por proteases da *B. bovis* (WRIGHT & GOODGER, 1988).

A estase sangüínea causada pelas substâncias vasoativas e a anemia dificultam a perfusão de oxigênio nos tecidos. Processos degenerativos e necróticos resultantes de anóxia tecidual ativam resposta inflamatória, cujos

mediadores contribuem para manifestação de febre e desequilíbrio eletrolítico. (LOSOS, 1986).

Na malária, foi identificado um mediador – o glicofosfatidilinositol (GPI) – que tem sido apontado como responsável pela ativação da resposta inflamatória sistêmica (SCHOFIELD et al., 1996). O GPI atua sobre macrófagos e células endoteliais induzindo a síntese de interleucina 1 (IL-1), interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF). Estas substâncias são responsáveis pela febre, desequilíbrios metabólicos e caquexia associados à malária. Elas também induzem a liberação de óxido nítrico que leva à vasodilatação periférica, estase sangüínea e lesão tecidual (CLARK & SCHOFIELD, 2000).

Um evento muito importante na fisiopatologia da babesiose e da malária é o seqüestro de eritrócitos parasitados no interior dos capilares e vênulas pós capilares, que resulta da adesão entre a membrana dos eritrócitos parasitados e das células endoteliais. Isso ocorre porque os parasitas produzem modificações estruturais e antigênicas na superfície eritrocitária que se constituem em sítios de ligação para receptores expressos em células endoteliais (AIKAWA, 1988; AIKAWA et al., 1990 e 1992; PONGPONRATN et al., 1991; MACPHERSON et al., 1985). Na babesiose, a ligação de fibrina à superfície das hemácias e à superfície endotelial pode levar ao estabelecimento de “pontes” de fibrina, que proporcionariam a adesão de eritrócitos parasitados e não parasitados (WRIGHT, 1972).

Durante seu desenvolvimento a trofozoíto, o *P. falciparum* induz a reorganização de partículas protéicas dentro da bicamada lipídica da membrana eritrocitária e a formação de projeções superficiais cônicas denominadas de botões eritrocitários. Estruturas correspondentes foram observadas em hemácias parasitadas com trofozoítos de *B. bovis*, tendo porém um formato de projeções espiculares. Estas protrusões constituem os pontos onde a membrana do eritrócito entra em contato com a superfície da célula endotelial e onde provavelmente ocorre a interação entre as moléculas de adesão (AIKAWA et al., 1985). Proteínas do *P. falciparum*, como a Proteína de Membrana Eritrocitária 1 (PfEMP1), são inseridas na superfície dos botões eritrocitários e se ligam a

receptores endoteliais como ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular 1), VCAM-1 (Molécula Vascular de Adesão Celular 1) e CD36 (HOWARD et al., 1988; SCHRAVENDIJK et al., 1991). Nas projeções espiculares dos eritrócitos parasitados com *B. bovis* foi identificada a proteína VESA 1 (Antígeno Variável de Superfície Eritrocitária 1) que se acredita ser responsável pela adesão, apesar de ainda não serem conhecidos seus ligantes endoteliais (O'CONNOR & ALLRED, 2000).

Alterações na composição lipídica da membrana do eritrócito também podem favorecer a adesão. Hemácias parasitadas com *B. bovis* e *P. falciparum* apresentam um aumento da concentração total de lipídeos, especialmente fosfatidilcolina, e exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2000). A peroxidação destes lipídeos torna a superfície da hemácia susceptível a ligação de proteínas, inclusive antígenos livres de *B. bovis* e *P. falciparum*, que por sua vez poderiam se ligar a receptores endoteliais (WRIGHT et al., 1989).

A vasodilatação provocada por mediadores liberados na fase aguda da malária e da babesiose e as alterações de membrana, com redução na deformabilidade dos eritrócitos parasitados, favorecem a adesão na medida em que diminuem a velocidade do fluxo sangüíneo nos leitos vasculares e aumentam a interação entre a superfície dos eritrócitos parasitados e células endoteliais (SCHETTERS & EILING, 2000).

A conseqüência patológica da adesão é a obstrução da microcirculação por eritrócitos parasitados. Segundo WRIGHT et al. (1989) a anóxia tecidual resultante da obstrução vascular leva a necrose e liberação local de fatores pró inflamatórios que induzem a quimiotaxia e diapedese de leucócitos. Os neutrófilos infiltrados desgranulam enzimas proteolíticas, intensificando as lesões iniciadas pela anóxia. Macrófagos também são atraídos aos sítios inflamatórios, e secretam fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (IFN γ) e interleucina 1 (IL-1), que estimulam o endotélio a expressar moléculas de adesão envolvidas na infiltração leucocitária, potencializando o processo de infiltração destas células.

Foi observado que receptores endoteliais que mediam a infiltração leucocitária, como ICAM-1, também servem de ligantes para PfEMP1, a principal proteína de adesão do *P. falciparum*. Assim, na malária, a estimulação do endotélio pelos mediadores inflamatórios também favorece a adesão (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

Na malária, além da adesão dos eritrócitos parasitados ao endotélio, também observa-se a agregação de eritrócitos não parasitados em torno de eritrócitos parasitados. Esta adesão é mediada pela mesma proteína (PfEMP1) que provoca a adesão dos eritrócitos parasitados em células endoteliais (HANDUNNETTI et al., 1992; ROWE et al., 1997). Na babesiose, acredita-se que a liberação em grande quantidade de monômeros de fibrina possa levar à mesma agregação, visto que a fibrina tem afinidade pela superfície dos eritrócitos (SCHETTERS & EILING, 2000). A agregação de eritrócitos forma estruturas chamadas de rosetas, que pelo seu tamanho, ficam retidas nos pequenos vasos. Na roseta, a proximidade dos eritrócitos permite que os merozoítos passem diretamente de uma célula a outra, facilitando a proliferação destes parasitas (WAHLGREN et al., 1989).

O seqüestro de eritrócitos na malária e na babesiose é mais acentuado nas vênulas e capilares do sistema nervoso central - especialmente do encéfalo. As lesões resultantes levam ao desenvolvimento de sintomatologia nervosa, caracterizando os quadros de babesiose e malária cerebral, fatais na maioria dos casos (AIKAWA et al., 1992). A participação de leucócitos no desenvolvimento das lesões neurológicas parece ser de menor importância, visto que estas células são raramente observadas em estudos histopatológicos de cérebros de pacientes afetados de babesiose ou malária cerebral (AIKAWA, 1988; MACPHERSON et al., 1985).

Outros órgãos que apresentam acúmulo de eritrócitos na microcirculação são o coração, pulmões e mucosa intestinal. Nesses órgãos, a porcentagem de vasos obstruídos é menor que no cérebro, porém a infiltração leucocitária é mais extensa. O pulmão é o órgão mais amplamente afetado, apresentando edema e espessamento dos septos alveolares (PONGPONRATN et al., 1991). O edema

alveolar traz sérias alterações respiratórias, que são possivelmente as maiores causas de morte na babesiose bovina (WRIGHT et al., 1989).

2.3 Moléculas envolvidas no desenvolvimento de adesão

2.3.1 Moléculas expressas na superfície das hemácias parasitadas.

O *P. falciparum* expressa um grupo de proteínas de alta massa molecular (200-350 kDa) que são inseridas nos botões da membrana eritrocitária. Quatro proteínas já foram identificadas: as Proteínas Ricas em Histidina 1 e 2 (HRP1 e HRP2) e as Proteínas de Membrana Eritrocitária 1 e 2 (PfEMP1 e PfEMP2). As HRP e PfEMP2 participam da formação dos botões e a PfEMP1 é a responsável pelo processo de citoaderência (AIKAWA, 1988).

A PfEMP1, na verdade, é uma família de proteínas transmembrana, cujas porções extracelulares são altamente variáveis nas suas seqüências de aminoácidos, enquanto que as regiões transmembrana e citoplasmática são conservadas. A seqüência e estrutura do segmento extracelular dão a cada PfEMP1 uma característica antigênica e uma propriedade adesiva (afinidade pelos vários receptores) diferenciada. Cada indivíduo expressa apenas uma forma de PfEMP1, porém indivíduos diferentes dentro da mesma população podem expressar formas diferentes (SU et al., 1995).

A PfEMP1 é responsável pela diferença entre os isolados de *P. falciparum* quanto à sua capacidade de produzir adesão e induzir alterações patológicas do sistema nervoso central. Os diferentes isolados de *P. falciparum* possuem um conjunto próprio de PfEMP1 que são diferentes de outros isolados. A ocorrência de malária cerebral depende da emergência de variantes relativamente raras do parasita que expressem PfEMP1 com alta afinidade pelos receptores presentes no endotélio venular do cérebro (BIGGS et al., 1992).

Existe pouca informação a respeito das proteínas envolvidas no processo de adesão causada por *B. bovis*. ALLRED et al. (1993 e 1994) apontaram a presença de proteínas variáveis produzidas por merozoítos de *B. bovis* e

expressas na superfície de eritrócitos parasitados, levantando a possibilidade das mesmas estarem envolvidas no processo de adesão eritrocitária. Em 1997, O'CONNOR et al. descreveram características químicas de tais proteínas, denominando-as VESA 1 (Antígenos Variáveis de Superfície Eritrocitária). Essas moléculas são funcionalmente relacionadas com as proteínas PfEMP1 do *P. falciparum*. Estudos de imunoeletromicroscopia mostraram que os antígenos VESA 1 estão localizados na superfície das protruções espiculares de membrana (O'CONNOR & ALLRED, 2000). Esta localização é consistente com o possível envolvimento de VESA 1 na adesão e seqüestro de hemácias, porém não existe evidência direta desse papel.

Um trabalho de O'CONNOR et al. (1999) mostrou que clones de *B. bovis* positivos para VESA 1 são capazes de produzir adesão de eritrócitos em células endoteliais de capilares de cérebro de bovino "in vitro". Usando uma variação deste mesmo modelo experimental, O'CONNOR & ALLRED (2000) conseguiram demonstrar que vários soros capazes de bloquear e reverter a adesão também podem ser usados para precipitar VESA 1 da superfície de eritrócitos parasitados. Todos esses achados abrem a possibilidade de VESA 1 ser uma molécula de adesão.

VESA 1 constitui um conjunto de proteínas diméricas, cuja estrutura apresenta regiões de variabilidade. As duas cadeias (VESA 1a e VESA 1b) têm pesos diferentes e estão ligadas covalentemente entre si, mas não se definiu ainda como elas ficam ancoradas na membrana do eritrócito (O'CONNOR et al., 1997).

ALLRED et al. (1993) demonstraram que VESA 1 é uma das proteínas responsáveis pela diferença de antigenicidade entre isolados geográficos de *B. bovis*. Entretanto, não está claro se a variação em VESA 1 afetaria também a capacidade adesiva e a patogenicidade de amostras de *B. bovis*, como a PfEMP1 em *P. falciparum*.

A *B. bovis* produz exoantígenos solúveis que se ligam à membrana de hemácias. Estes exoantígenos também foram identificados, por meio de imunofluorescência, nas células endoteliais de cortes histológicos de cérebro de

animais acometidos de babesiose cerebral. A afinidade pela superfície tanto de eritrócitos como de células endoteliais indica que os exoantígenos podem servir de “ponte” entre os eritrócitos e o endotélio e provocar adesão (RISTIC & KAKOMA, 1988).

2.3.2 Receptores endoteliais para as moléculas dos parasitas expressas no eritrócito.

Várias moléculas presentes em células endoteliais foram demonstradas como capazes de sustentar a adesão de eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* em experimentos “in vitro”. As principais são a Trombospondina (TSP), CD36 e ICAM-1. Algumas linhagens de *P. falciparum* também são capazes de se ligar a E-selectina e a VCAM-1 (XIAO et al., 1996).

A TSP é uma glicoproteína formada por três cadeias de 150 kDa ligadas por pontes dissulfeto. Ela é produzida e secretada no plasma por plaquetas, macrófagos e células endoteliais e pode-se associar a glicoproteínas de superfície das plaquetas e células endoteliais, ao colágeno, a heparina e a fibronectina. A função da TSP é mediar aglutinação e adesão plaquetária na ativação da coagulação e inflamação (LAHAV, 1993). A ligação da TSP com a PfEMP1 é capaz de provocar imobilização de eritrócitos parasitados, porém essa interação tem baixa afinidade e dura pouco tempo (COOKE et al., 1994).

A glicoproteína CD36 é um componente integral da membrana de monócitos, plaquetas e células endoteliais capaz de se ligar ao colágeno. Ela é um monômero de 88 kDa, cuja função normal é gerar sinais que determinam a degranulação plaquetária e explosão respiratória em macrófagos em processos inflamatórios (GREENWALT et al., 1991). A ligação de CD36 pode ser estabelecida com proteínas localizadas ou não na superfície dos botões eritrocitários, o que indica que ela pode atuar como ligante para alguma proteína além da PfEMP1 (NAKAMURA et al., 1992). A CD36 é capaz de provocar a imobilização de eritrócitos sem a necessidade de participação de outros receptores (COOKE et al., 1994). CD36 também está presente na superfície de

eritrócitos normais e pode levar à formação de rosetas, ao se ligar a PfEMP1 em eritrócitos parasitados (HANDUNNETTI et al., 1992).

A Molécula de Adesão Intercelular 1 ou ICAM-1 é uma glicoproteína de 100 kDa presente na superfície de linfócitos, macrófagos e do endotélio vascular pertencente à superfamília das Imunoglobulinas. ICAM-1 se liga à integrina LFA-1 (Antígeno de função Leucocitária 1) da superfície de leucócitos, para permitir a infiltração dos mesmos através do endotélio em sítios de inflamação e de resposta imune (CARLOS & HARLAN, 1994). ICAM-1 se liga a PfEMP1 em um sítio diferente daquele de interação com LFA-1 (WILLIMANN et al., 1995). A afinidade de ICAM-1 pela PfEMP1 é menor que a da CD36 e TSP. Sob condições de fluxo, nas quais existem forças contrárias às de fixação de hemácias, tal ligação de baixa afinidade promove adesão com rolamento. ICAM-1 diminui a velocidade de passagem das hemácias, facilitando a interação de CD36 e TSP com seus ligantes (COOKE et al., 1994).

Durante as infecções pelo *P. falciparum* ocorre ativação da resposta inflamatória por substâncias liberadas pelo parasita, como o glicofosfatidilinositol. A ativação de macrófagos por estas substâncias leva à síntese de IL-1 e IFN γ . Estas duas citocinas agem sobre o endotélio e elevam a expressão de ICAM-1 e, conseqüentemente, potencializam a adesão (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

Outras glicoproteínas também foram identificadas como mediadores de adesão, porém suas participações aparentemente são menos importantes, provocando a adesão de apenas algumas linhagens de *P. falciparum*. São elas a VCAM-1 (Molécula Vascular de Adesão Celular 1) e E-selectina. (OCKENHOUSE et al., 1992). VCAM-1 é uma molécula que pertence à superfamília das Igs e é ligante da integrina VLA-4 (Antígeno Tardio 4). A E-selectina se liga a carboidratos complexos e glicoproteínas. Ambas têm sua expressão ativada na resposta inflamatória e mediam infiltração leucocitária (CARLOS & HARLAN, 1994).

Existem evidências experimentais de que ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina possam também sustentar a adesão de eritrócitos parasitados por *P. falciparum*

“in vivo”. Estudos de imunohistoquímica demonstraram que a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina era mais alta no endotélio cerebral, muscular e renal de pacientes que morreram de malária do que em indivíduos com outros tipos de patologia e que a expressão estava fortemente associada com o seqüestro de hemácias parasitadas naqueles órgãos (TURNER et al., 1994).

A literatura é restrita quanto a indicação de moléculas endoteliais que poderiam atuar como mediadores de adesão de eritrócitos parasitados por *Babesia bovis*. Experimentos de adesão “in vitro” mostraram que hemácias infectadas por *B. bovis* aderem a superfícies tratadas com trombospondina, laminina (PARRODI et al., 1989) e heparina (GOODGER et al., 1987). Os autores não indicam qual a natureza do antígeno eritrocitário que atua como ligante.

WRIGHT et al. (1989) também apontam a trombospondina, em conjunto com a fibronectina, como mediador de adesão. Segundo estes autores, a trombospondina e fibronectina se ligam a monômeros de fibrina, os quais são formados em grande quantidade durante a fase aguda da babesiose. Estes monômeros têm afinidade pela superfície dos eritrócitos e assim podem mediar a ligação com a fibronectina e trombospondina presentes na membrana da célula endotelial.

Não existem relatos de que CD36, trombospondina ou ICAM-1 possam servir como ligantes de VESA-1. No entanto, ALLRED et al., (2000) identificaram, em uma das cadeias de VESA-1 (VESA 1a), uma seqüência de aminoácidos muito similar ao sítio de ligação da PfEMP1 em CD36.

2.4 Citoaderência como mecanismo de escape imunológico de hemoparasitas

A citoaderência se constitui numa vantagem adaptativa para *Babesia bovis* e para o *Plasmodium falciparum*, sendo um dos mecanismos que permitem aos parasitas escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (ALLRED, 1995 e 1998).

Uma das vias de controle da infecção por *B. bovis* e *P. falciparum* seria pela eliminação de eritrócitos parasitados. Normalmente, a destruição de células infectadas é uma atribuição dos linfócitos T citotóxicos. A hemácia, porém, é uma célula destituída de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) e por isso não apresenta antígenos a linfócitos T (ALLRED, 1995).

Alternativamente, o hospedeiro poderia eliminar os eritrócitos parasitados por meio de fagocitose mediada por células do sistema monocítico-fagocitário (MAHONEY, 1977). Foi proposto também que os eritrócitos parasitados poderiam ser opsonizados por anticorpos contra antígenos de *B. bovis* e *P. falciparum* e fagocitados por macrófagos (BROWN & PALMER, 1999) ou destruídos por reações de citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC) desencadeadas pelos linfócitos matadores naturais (“natural killer cells”) (GOFF et al., 1984). Contudo, a citoaderência previne a circulação das hemácias infectadas e diminui seu contato com as células fagocitárias do baço ou leucócitos periféricos (ALLRED, 1995).

A formação de rosetas permite que os eritrócitos parasitados sejam “encobertos” por células não parasitadas, o que também impede o contato com células imunocompetentes. Nas rosetas, os merozoítos podem passar diretamente de um eritrócito para outro, sem o risco de serem bloqueados ou opsonizados por anticorpos e fagocitados no plasma (WAHLGREN et al., 1989).

O bloqueio dos sítios de interação das moléculas de adesão na superfície eritrocitária por meio de anticorpos específicos poderia inibir a citoaderência, diminuindo o desenvolvimento de lesões e sinais clínicos da malária e babesiose (ALLRED, 1998). Isto é confirmado por estudos que mostram que humanos imunes, vivendo em áreas endêmicas de malária possuem anticorpos capazes de reconhecer a superfície de eritrócitos parasitados, e que a ocorrência de tais anticorpos está relacionada à proteção contra a doença (MARSH et al., 1989). Além do mais, a proteção contra a doença pode ser transferida passivamente de um indivíduo imune para um não imune através do soro ou imunoglobulina de um indivíduo imune (SABCHAREON et al., 1991). A presença de anticorpos contra eritrócitos parasitados também está correlacionada com a proteção contra

babesiose bovina (MAHONEY et al., 1979). Recentemente, O'CONNOR & ALLRED (2000) demonstraram que no soro de animais inoculados com amostra de *B. bovis* existem anticorpos (IgG) específicos para VESA 1 capazes de bloquear e até mesmo reverter a adesão de eritrócitos parasitados “in vitro”.

No entanto, a presença de tais anticorpos não impede que animais infectados com *B. bovis* ou humanos parasitados com *P. falciparum* desenvolvam infecções crônicas de longa duração, o que indica que existem mecanismos que permitem aos dois hemoparasitas escaparem da resposta mediada por anticorpos. Dentre eles, a variação antigênica clonal é o principal (ALLRED, 1998).

A variação antigênica clonal é um fenômeno através do qual aparecem, dentro da população de *B. bovis* e *P. falciparum*, indivíduos que expressam proteínas antígenicamente diferentes das proteínas expressas na população original que infectou o hospedeiro. A variação envolve a mudança na expressão de genes que codificam para as proteínas variantes (SU et al., 1995).

A principal proteína do *P. falciparum* envolvida na variação antigênica é a molécula de adesão PfEMP1. A PfEMP1 é codificada pela família gênica *var*, composta de 50 a 150 genes reunidos em “clusters” ou espalhados em praticamente todos os cromossomos do *P. falciparum*, ocupando cerca de 6% do genoma total (SU et al., 1995). Quando uma amostra de *P. falciparum* infecta um hospedeiro e entra em multiplicação, dá origem a uma população que apresenta vários perfis antigênicos e de adesividade diferentes da amostra parental. Isso acontece porque as células filhas podem expressar genes *var* e PfEMP1 diferentes das células progenitoras.

Foi demonstrado que a proteína dimérica VESA 1 é a responsável pela variação antigênica clonal em populações de *B. bovis* (ALLRED et al., 1994). Recentemente o gene *ves1 α* , que codifica para o peptídeo VESA 1a, foi caracterizado. Inúmeras cópias do mesmo gene estão presentes em todos os cromossomos da *B. bovis*, mas apenas uma cópia é expressa por vez dentro de uma população clonada (derivada de um único indivíduo). Há indícios que a variação na expressão de VESA 1a ocorre devido ao aparecimento, na população, de indivíduos que sofreram modificações da cópia de *ves1 α* expressada, talvez

por meio de conversão gênica. Isso difere muito da regulação dos genes *var* do *P. falciparum*, no qual o maior mecanismo é a troca “in situ” dos genes expressos (ALLRED et al., 2000).

A variação antigênica se desenvolve rapidamente. Estima-se que a cada ciclo de replicação do *P. falciparum*, 2% da população dos indivíduos expressam um novo fenótipo (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

Com a variação antigênica, a resposta de anticorpos contra uma estrutura de membrana e todos os mecanismos dela dependentes apresentam eficácia limitada. A cada mudança nos antígenos de superfície expressos pela população, uma nova resposta imune deve ser ativada. Dessa maneira, a *B. bovis* e o *P. falciparum* escapam da eliminação completa (ALLRED, 1998).

O fato da variação antigênica e capacidade de adesão estarem ligadas às mesmas moléculas cria um paradoxo. A variação antigênica pode aumentar a diversidade das moléculas de adesão e permitir a evasão à resposta imune humoral. Por outro lado, a mesma variação é limitada pelo fato de que alterações na seqüência de aminoácidos das proteínas de adesão não podem alterar sua capacidade de se ligar aos receptores endoteliais (BIGGS et al., 1992). Assim, as seqüências de aminoácidos das moléculas de adesão envolvidas na ligação com os receptores e manutenção da estrutura espacial dos sítios de ligação devem ser conservadas (BARUCH et al., 1997).

O principal interesse no estudo da adesão é criar mecanismos que possam bloquear a citoaderência e impedir as lesões por ela causadas. Para isso, uma das estratégias traçadas é a imunização dos indivíduos contra as moléculas responsáveis pela citoaderência, de maneira a induzir a produção de anticorpos bloqueadores. O desenvolvimento de vacinas, no entanto, esbarra no problema da diversidade antigênica das moléculas de adesão entre os diferentes isolados dos parasitas e na variação antigênica clonal destas proteínas dentro de um mesmo isolado. A obtenção de uma vacina eficiente depende da identificação de epítomos funcionais (envolvidos na adesão), conservados e que tenham capacidade imunogênica (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

2.5 Modelos “in vitro” para estudo da citoaderência

Para elucidar as interações entre eritrócitos infectados e células endoteliais é necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que permitam observar a adesão sob condições controladas. Os modelos “in vitro” envolvem o uso de linhagens de células endoteliais isoladas de diversos órgãos ou células transfectadas com genes de receptores de superfície de células endoteliais. Os eritrócitos provenientes de cultivos “in vitro” dos parasitas são colocados sobre as células para indução da adesão. Modificações na metodologia, como bloqueio de moléculas de superfície conhecidas antes da adição de células parasitadas, permitem caracterizar as interações no nível molecular e definir ligantes que medeiam a adesão (GAY et al., 1995).

No estudo com *Plasmodium falciparum* foram identificadas várias linhagens celulares capazes de sustentar a adesão “in vitro”, incluindo células endoteliais de veia umbilical humanas, com alta expressão de ICAM-1 (UDEINYA et al., 1981); de capilares cerebrais e microvasculatura dérmica humanos (JOHNSON et al., 1993); células de melanoma amelanótico CD32r, com alta expressão de CD36 (SCHIMIDT et al., 1982); células CHO transfectadas com genes de ICAM-1 e CD36 (HASLER et al., 1993) e células endoteliais de microvasculatura cerebral de macacos *Saimiri* (GAY et al., 1995). Foi o uso destes modelos que permitiu identificar a TSP, ICAM-1 e CD36 como mediadores de adesão de eritrócitos parasitados (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

Para estudo com *B. bovis* não há uma quantidade comparável de modelos. O’CONNOR et al. (1999) demonstraram que células endoteliais de microvasculatura cerebral de bovinos são capazes de promover a adesão de eritrócitos parasitados “in vitro”. No entanto, a aplicação desta linhagem é recente e ainda não foram definidos os receptores que promovem a interação.

KILGER (1999) desenvolveu um modelo de adesão em que se utiliza células endoteliais de aorta bovina. Neste estudo, pode-se observar maior número de eritrócitos aderentes provenientes de sangue de animais inoculados com

amostras de *Babesia bovis* em comparação com eritrócitos de animais não inoculados. Esse mesmo modelo foi aplicado no presente trabalho para avaliar o desenvolvimento de adesão de eritrócitos de bovinos em células endoteliais, mediante a inoculação dos animais com duas amostras de *Babesia bovis* patogênicas de origens diferentes e uma amostra vacinal atenuada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Aplicação e avaliação de um modelo de adesão “in vitro” de eritrócitos de animais parasitados por *Babesia bovis* em células endoteliais cultivadas à partir de aorta bovina.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer cultivos primários de células endoteliais de aorta bovina.
- Realizar testes de adesão de eritrócitos coletados de animais inoculados com amostras atenuada BbovUFV1 26^a passagem e amostras patogênicas BbovUFV1 7^a e Jaboticabal, ambas de 7^a passagem e de animais controles em células endoteliais de aorta bovina.
- Acompanhar a dinâmica do processo de adesão, determinando o início, nível máximo e o declínio nos níveis de citoaderência.

- Determinar se diferentes amostras de *Babesia bovis* variam em sua capacidade de indução de adesão “in vitro” e quais fatores influenciam nesta propriedade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram empregados bovinos *Bos taurus* da raça Jersey, com 24 meses de idade, negativos sorológica e parasitologicamente a hematozoários e mantidos em condições de isolamento à prova de artrópodes e outros vetores de hemoparasitas no Departamento de Medicina Veterinária da UFV. Os animais que foram submetidos a esplenectomia passaram 14 dias em recuperação antes de serem introduzidos nos experimentos.

4.2 Amostras de *Babesia bovis*

Três amostras de *Babesia bovis* foram utilizadas. Duas delas - BbovUFV1 7^a passagem, patogênica, e BbovUFV1 26^a passagem, atenuada - foram isoladas na Zona da Mata, na microrregião de Viçosa – MG, reproduzidas por passagens em bezerros esplenectomizados, congeladas em sangue total diluído v/v em PBS (Na₂HPO₄ 6,4mM, KH₂PO₄ 10mM, NaCl 73mM) pH 7,6 acrescido de 22% de DMSO e mantidas em nitrogênio líquido, no Laboratório de Biologia e Controle

de Hematozoários do DVT – BIOAGRO/UFV. A terceira amostra - Jaboticabal, 7^a passagem, patogênica – foi gentilmente cedida pela professora Rosângela Zacarias Machado do setor de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista. Esta amostra foi isolada no Rio Grande do Sul, reproduzida por passagens em animais esplenectomizados, congelada em sangue total com 10% de DMSO e mantida em nitrogênio líquido.

4.3 Cultivos celulares

Para os testes de adesão, cultivos primários de células endoteliais de aorta bovina (denominadas BAECs) foram mantidos no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários. A extração das células foi realizada de acordo com protocolo descrito de BOOYSE et al. (1975) e SCHWARTZ (1978), com as seguintes modificações introduzidas por KILGER (1999): uso de Solução de Sais Balanceados de Hank (HBSS) no lugar de solução salina tamponada (PBS) para lavagem da luz aórtica e das células recém extraídas; uso de tripsina no lugar de colagenase tipo II para digestão da membrana basal do endotélio e liberação das células; tempo máximo de 35 minutos de digestão com tripsina, em contraste com os 60 minutos necessários nos procedimentos com colagenase tipo II.

As aortas foram obtidas de animais abatidos para consumo na região de Viçosa – MG. Um segmento do vaso tinha suas extremidades ligadas com barbante estéril e sua luz preenchida com HBSS (KCl 5,4mM, KH₂PO₄ 0,44mM, NaCl 137mM, NaHCO₃ 4,2mM, Na₂HPO₄ 0,34mM, D-Glucose 5,6mM e 1% de antibiótico/antimicótico). O fragmento era também mergulhado em HBSS e mantido em banho de gelo para o transporte até o laboratório. Na capela de fluxo laminar, o tecido conjuntivo externo do segmento de aorta era dissecado, os pequenos ramos arteriais ligados e a superfície externa descontaminada com um banho de álcool iodado. Seguia-se lavagem da luz do vaso para retirada de sangue acumulado, por meio de injeções repetidas de HBSS aquecido a 37°C. Após a lavagem, o segmento de aorta era preenchido com Meio de Eagle Modificado (DMEM) acrescido de 0,2% de tripsina a 37°C. A partir de 20

minutos de digestão e a cada 5 minutos, alíquotas eram retiradas do conteúdo da aorta e substituídas pela mesma quantidade de DMEM 0,2% tripsina. Este procedimento era repetido até 35 minutos de digestão. As alíquotas eram centrifugadas a 300g durante 3 minutos e o “pellet” obtido lavado uma vez em HBSS, a 300g durante 3 minutos. Em seguida, as células eram ressuspensas em DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1% antibiótico/antimicótico, 1% mitógeno endotelial e semeadas em placas de cultivo de 24 “wells”. Os cultivos eram incubados em estufa a 37°C, 5%CO₂.

A manutenção das culturas consistiu em troca de meio a cada 48 horas e repicagens, que eram realizadas toda vez que as células endoteliais formavam uma monocamada confluenta. As células aderidas ao fundo da placa eram lavadas com PBS (Na₂HPO₄ x 7H₂O 2,9mM, NaCl 154mM, KH₂PO₄ 1mM) acrescido de 5% de soro fetal bovino e sem Ca⁺² e Mg⁺² e tratadas com uma solução PBS acrescido de 0,5% de EDTA e 0,2% de tripsina durante 3 minutos, a 37°C. Após o descolamento, as células eram lavadas uma vez em PBS/5% soro fetal bovino, a 300g, durante 3 minutos, ressuspensas em meio completo e uma alíquota era retirada para contagem em câmara de Neubauer. As células eram semeadas em placas ou garrafas de cultivo numa concentração de 3,5x10⁴/ml de meio completo. As células destinadas aos testes de adesão eram semeadas, na mesma concentração, em placas de Petri com fundo coberto com lamínulas de 22x22mm². Os cultivos repicados eram incubados em estufa a 37°C e 5%CO₂.

Células Vero, extraídas de tecido renal de macaco verde africano, foram usadas como controle nos testes de adesão. Estas células foram gentilmente cedidas pela Prof. Bernardete Miranda dos Santos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. As células Vero foram cultivadas em estufa a 37°C e 5%CO₂, em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 2mM de glutamina, trocado a cada 48 horas. A repicagem e confecção de lamínulas recobertas com células Vero era feita da mesma maneira descrita para as células endoteliais.

4.4 Delineamento experimental

O trabalho foi dividido em três experimentos, cada um com uma amostra de *Babesia bovis*.

No primeiro experimento, utilizaram-se três animais esplenectomizados. Dois deles (denominados B01 e B02) foram inoculados com amostra patogênica BbovUFV1 7^a passagem em uma dose de $6,6 \times 10^7$ parasitas e um animal (denominado C01) foi mantido como controle.

No segundo experimento, o grupo era formado de três animais com baço “in situ”. Dois animais, identificados como B03 e B04, foram inoculados com amostra atenuada BbovUFV1 26^a passagem, na dose de 1×10^6 parasitas e um animal, identificado como C02, serviu como controle.

No terceiro experimento, empregaram-se dois animais esplenectomizados. O animal identificado como B05 foi inoculado com amostra Jaboticabal na dose de 6×10^7 parasitas e o animal identificado como C03 foi mantido como controle.

Em todos os experimentos, os animais foram monitorados para detecção do desenvolvimento de sinais de babesiose aguda. A partir de um dia antes da inoculação e a cada 48 horas, procedia-se a medição da temperatura retal e coletas de sangue para mensuração do hematócrito e confecção de esfregaços destinados aos exames parasitológicos para detecção de merozoítos de *Babesia bovis* em eritrócitos. As amostras de sangue foram tomadas dos animais em sistema de coleta à vácuo com EDTA (VacuumII[®], Labnew Indústria e Comércio, LTDA).

Nos três experimentos foram realizados testes de adesão de eritrócitos em BAECs e testes de imunofluorescência indireta para detecção de antígenos de *B. bovis* em eritrócitos de esfregaços de sangue periférico, a partir de um dia antes da inoculação e a cada 48 horas.

Em todos os experimentos foram realizados testes de sensibilização de hemácias e hemaglutinação passiva para detecção de exoantígenos de *B. bovis* no soro dos animais. Estes ensaios foram realizados com amostras de soro coletadas dos animais a partir de um dia antes da inoculação e a cada 48 horas. Para

obtenção do soro utilizou-se sistema de coleta a vácuo sem anticoagulante (VacuumII[®], Labnew Indústria e Comércio, LTDA). Os tubos contendo os coágulos eram deixados em temperatura ambiente durante 12 horas para liberação do soro, que era posteriormente estocado a -20°C até o momento do uso.

Os experimentos com as amostra BbovUFV1 atenuada 26^a passagem e Jaboticabal se estenderam até 22 dias após a inoculação. Os experimentos com as amostras BboUFV1 patogênica 7^a passagem se estenderam até o dia do óbito dos animais inoculados.

4.5 Teste de adesão de eritrócitos em células endoteliais

Os testes de adesão foram realizados segundo o protocolo de UDEINYA et al. (1981). Esta técnica foi desenvolvida para observar adesão de eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*, e sofreu as seguintes modificações introduzidas por KILGER (1999): uso de eritrócitos coletados a partir de circulação periférica dos bovinos em lugar de eritrócitos mantidos em cultivo “in vitro”; modificações na composição do tampão de adesão, com acréscimo de HEPES a 25mM, acréscimo de cálcio e magnésio a 1mM e substituição de soro total a 20% por soroalbumina bovina a 1%; uso de solução salina tamponada (PBS) no lugar de Solução de Sais Balanceados de Hank (HBSS) para lavagem das lamínulas na etapa final do teste.

Monocamadas confluentes de células endoteliais ou células Vero cultivadas sobre lamínulas de vidro de $22 \times 22 \text{mm}^2$ eram incubadas durante 60 minutos em tampão de adesão (RPMI1640, HEPES 25mM, Soroalbumina bovina 1%, CaCl_2 1mM e MgCl_2 1mM) a 37°C e 5% CO_2 . Sangue total dos animais era centrifugado a 300g durante 5 minutos. O plasma e a camada de leucócitos eram descartados e os eritrócitos lavados uma vez em PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,9mM, NaCl 154mM, KH_2PO_4 1mM) sem Ca^{+2} e Mg^{+2} , a 300g durante 5 minutos, ressuspensos em tampão de adesão a uma concentração de 1% e colocados sobre a monocamada de células endoteliais ou Vero previamente

preparada. Seguiu-se incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 90 minutos. As lamínulas eram lavadas sob agitação por três vezes, durante 5 minutos cada vez, em PBS acrescido de CaCl₂ e MgCl₂ 1mM, coradas com corante panóptico (Instant Prov[®], Newprov, Produtos para Laboratório, LTDA) de acordo com instrução do fabricante e fixadas sobre lâminas com resina (Entellan[®], MERCK). Em microscópio óptico, num aumento de 1000x, contou-se o número de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais em cada lamínula.

Os testes de adesão foram realizados da mesma maneira nos experimentos com as três amostras de *B. bovis*. As amostras de sangue dos animais inoculados e controles coletadas a cada dia eram testadas em duplicata. O resultado dos testes foi expresso em média de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais. As médias dos valores de adesão para cada dia foram comparadas, pelo teste t, entre os animais inoculados e controles.

4.6 Imunofluorescência de eritrócitos fixados para detecção de exoantígenos de *Babesia bovis*

O sangue total dos animais era centrifugado a 300g por 5 minutos. O plasma e a camada de células brancas eram descartados e os eritrócitos lavados 2 vezes em PBS sem Ca⁺² e Mg⁺² a 300g por 5 minutos. O “pellet” de eritrócitos era ressuscitado v/v em PBS com 1,5% de albumina bovina. Esfregaços espessos eram confeccionados e estocados a -20°C. No momento dos testes, os esfregaços eram fixados em metanol gelado durante 5 minutos. Após a secagem das lâminas, procedia-se à delimitação de campos sobre os esfregaços com tinta óleo (Tekpen[®], Mark-Tex Corp). Em cada campo, os eritrócitos eram incubados com um soro ou IgG primários diferentes, a saber: soro negativo de animal livre de *Babesia bovis* e mantido em isolamento; IgG anti BboUFV1 precipitada de soro hiperimune ou soro específico para amostra Jaboticabal. Todos os soros e IgG foram diluídos 1:20 em PBS sem Ca⁺² e Mg⁺² e incubados sobre os esfregaços durante 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Após essa etapa os esfregaços eram lavados em PBS sem Ca⁺² e Mg⁺² sob agitação por 3 vezes, 5

minutos cada vez. O anticorpo secundário consistiu de IgG de coelho anti IgG bovina conjugada com isotiocianato de fluoresceína, diluída 1:40 em PBS/0,2% de Tween 20. A incubação com anticorpo secundário durava 60 minutos a 37°C em câmara úmida e escura. Seguiam-se 3 lavagens das lâminas em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} , sob agitação, 5 minutos cada vez. A contracoloração era feita com Azul de Evan durante 3 minutos e a leitura em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x.

4.7 Sensibilização de hemácias com exoantígenos de *Babesia bovis* e testes de hemaglutinação passiva

O sangue total coletado de animais livres de *Babesia bovis* era centrifugado a 300g durante 5 minutos. O plasma e a capa de leucócitos eram descartados e o “pellet” de eritrócitos lavado 3 vezes em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} a 300g durante 5 minutos. As células eram ressuspensas em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} numa concentração de 2%. A suspensão de eritrócitos era misturada v/v a uma solução de ácido tânico 1:15000 em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} . Seguiu-se incubação durante 10 minutos a 56°C e, logo após, 3 lavagens dos eritrócitos em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} , centrifugando-se a 300g durante 5 minutos cada vez. Para a sensibilização, as hemácias tratadas com ácido tânico eram ressuspensas numa concentração de 2% em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} e misturadas v/v em soros de animais inoculados com as amostras BbovUFV1 (atenuada ou patogênica) ou Jaboticabal. O controle negativo da sensibilização era feito com incubação das hemácias tratadas com ácido tânico em soro de animais não inoculados e em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} . O controle positivo da sensibilização era feito com incubação das hemácias tratadas com ácido tânico em sobrenadante de cultivo de *Babesia bovis* BbovUFV1 patogênica de 7^a passagem ou atenuada de 26^a passagem. As hemácias eram incubadas durante toda a noite com os soros ou sobrenadante, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a incubação, os eritrócitos eram lavados 3 vezes em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} a 300g, 5 minutos cada vez, e ressuspensos numa concentração de 0,2% em PBS sem Ca^{+2} e Mg^{+2} . Para induzir reações de

hemaglutinação, as hemácias sensibilizadas foram incubadas com IgG anti BboUFV 1 ou soro específico para amostra Jaboticabal. Para controle negativo da hemaglutinação, empregou-se soro de animal controle livre de *B. bovis*, mantido em isolamento.

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento dos cultivos primários de células endoteliais de aorta bovina

Para realização dos testes de adesão de eritrócitos, foram estabelecidos cultivos primários de células endoteliais de aorta bovina (BAECs). Como mostrado na Figura 1 (A e B), a metodologia empregada na extração de células a partir de segmentos de aorta proporcionou cultivos formados por células poligonais pavimentosas, com crescimento em monocamadas. Células entre a 10^a e a 13^a passagem foram empregadas nos testes de adesão.

5.2 Experimento com amostra patogênica BbovUFV1 7^a passagem

Para verificar se existe diferença de adesão de eritrócitos entre animais infectados por *Babesia bovis* e animais livres, eritrócitos dos animais B01 e B02 inoculados com amostra BbovUFV1 patogênica e do animal controle C01 (todos esplenectomizados) foram testados quanto à sua capacidade de aderir a BAECs e a células Vero.

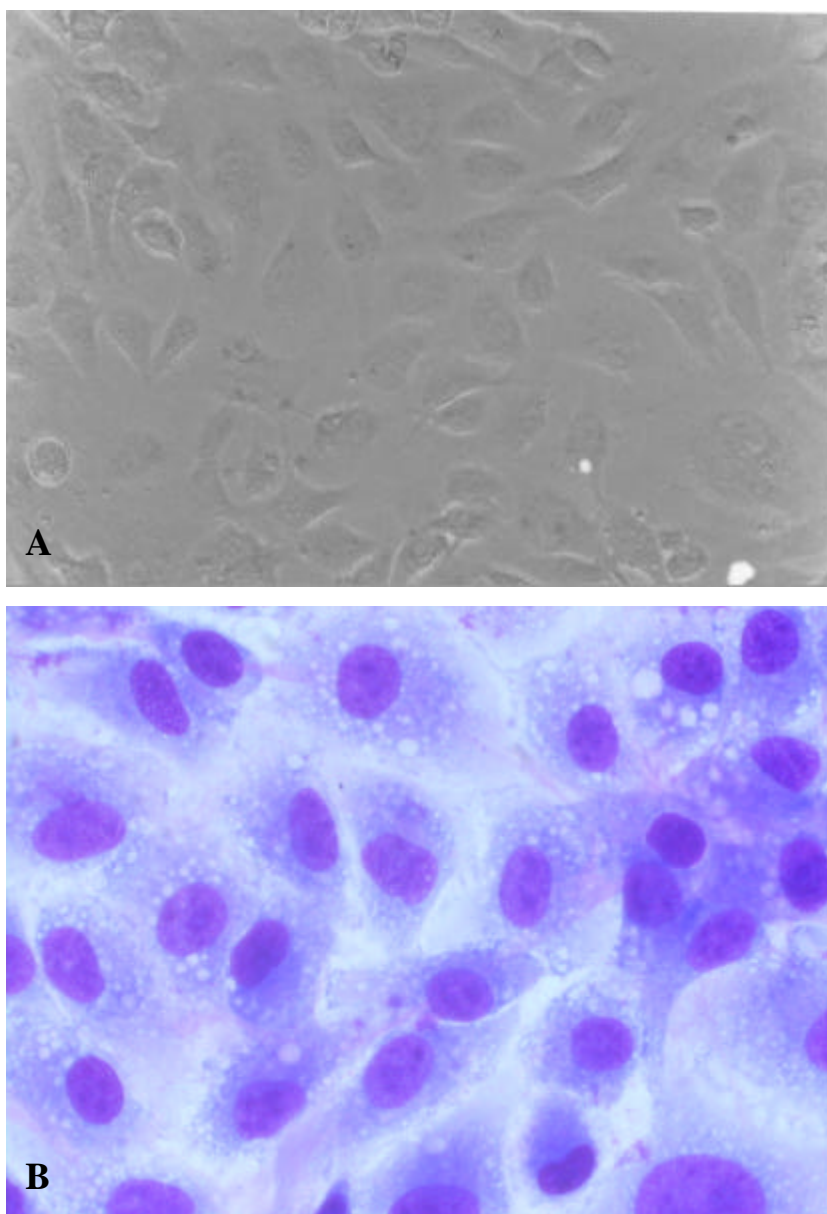


Figura 1 – Monocamada de células endoteliais de aorta bovina (BAECs). A, microscópio de contraste de fase, 1000x. B, microscópio óptico, coloração com Instant prov[®], 1000x.

Observou-se aumento na média de eritrócitos dos animais B01 e B02 aderidos em BAECs e este aumento foi detectado aos 12 dias pós inoculação para o animal B01 e aos 10 dias pós inoculação para o animal B02. Não houve aumento na média de eritrócitos aderidos em BAECs nos testes com sangue do animal controle C01 (Quadro 1).

As médias de adesão eritrocitária obtidas nos ensaios foram comparadas, a cada dia, entre os animais inoculados B01 e B02 e controle C01, por meio de teste t ($p < 0,05$). Comparando-se os resultados dos testes de B01 e C01, observou-se que os valores de adesão nos testes com eritrócitos de B01 foram significativamente maiores a partir de 12 dias pós inoculação (Quadro 1). A comparação entre as médias obtidas nos testes com eritrócitos dos animais B02 e C01 demonstrou que os valores de B02 foram significativamente maiores a partir de 10 dias pós inoculação (Quadro 1).

Apenas eritrócitos não parasitados foram detectados como aderentes às BAECs (Figura 2 A e B). Em nenhum dos ensaios, seja com eritrócitos de animais inoculados ou controle, foram observados eritrócitos aderidos a células Vero (Figura 2 C).

O aumento na média de eritrócitos aderidos “in vitro” sucedeu o desenvolvimento de sinais de babesiose aguda nos animais inoculados, que apresentaram aumento de temperatura retal (igual ou superior a 39°C), redução de volume globular (igual ou superior a 30%) e presença de eritrócitos parasitados com merozoítos de *B. bovis* circulantes. Os sinais se desenvolveram a partir de 10 dias pós inoculação no animal B01 e a partir de 8 dias pós inoculação no animal B02. O animal controle C01 não apresentou alterações nos parâmetros clínicos medidos (Quadro 2).

Para verificar se a diferença na adesão observada entre os testes com eritrócitos de animais inoculados e controle estava relacionada à presença de antígenos de *B. bovis* na superfície dos eritrócitos dos animais inoculados, ensaios de imunofluorescência foram realizados com esfregaços de sangue periférico dos animais. Os resultados mostraram a presença de eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-*B. bovis* em esfregaços de sangue dos

Quadro1 – Resultado dos testes de adesão de eritrócitos de animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica e animal controle em células endoteliais de aorta bovina

Dia pós inoculação	Média de eritrócitos aderidos em 1000 BAECs		
	B01	B02	C01
0	0	1.5	0
2	0.5	1	1
4	0	0	0
6	0.5	1.5	0
8	4.5	0	1,5
10	0	149 ^a	1 ^b
12	119.5 ^a	579,5 ^a	1 ^b
14	323.5 ^a	792,5 ^a	2,5 ^b
16	606.5 ^a	-	2 ^b

* BAECs, células endoteliais de aorta bovina; B01 e B02, animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica; C01, animal controle

* As médias foram calculadas entre duplicatas de um mesmo teste

* ^{a, b} Indicam médias diferentes entre um animal inoculado e o animal controle pelo teste t com $p < 0,05$

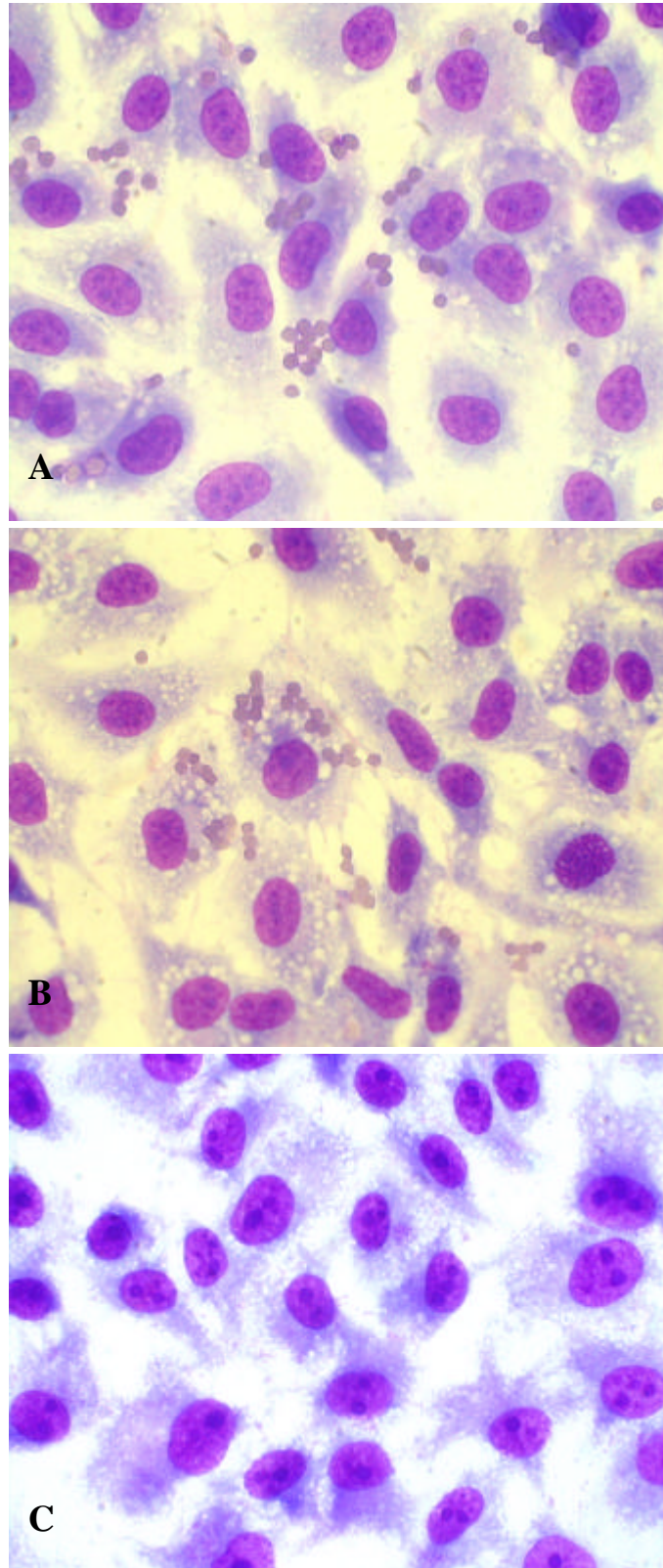


Figura 2 – Resultados dos testes de adesão de eritrócitos de animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem BAECs. A, teste com eritrócitos coletados do animal B01 (12 dias pós inoculação); B, teste com eritrócitos do B02 (12 dias pós inoculação); C, testes de adesão controle em células Vero. Microscópio óptico, Instant Prov[®], 1000x.

Quadro 2 – Parâmetros clínicos e laboratoriais medidos nos animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica e animal controle para detecção do desenvolvimento de babesiose aguda

Animal	Parâmetro	DIAS PÓS-INOCULAÇÃO								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
B01	PCV%	28	28	25	25	23	20	20	18	12
	P%	0	0	0	0	0.001	0.001	0.001	0.005	0.17
	T(°C)	38	37.5	38.4	38	38	39	39,5	40	41
B02	PCV%	35	33	34	30	27	25	22	20	
	P%	0	0	0	0	0.0025	0.005	0.007	0.08	
	T(°C)	38	38.2	38.5	39	39.5	40	42	41	
C01	PCV%	33	32	28	27	30	30	31	30	32
	P%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T(°C)	38	38	38.5	37.9	38	37.5	38	38.5	38

* B01 e B02, animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica; C01, animal controle

* PCV, volume globular; P, parasitemia; T, temperatura em graus Celsius

animais B01 e B02. Estes eritrócitos foram detectados a partir de 14 dias pós inoculação para o animal B01 e 12 dias pós inoculação para o animal B02. Nos dois casos, os eritrócitos marcados com antígenos de *B. bovis* apareceram após o desenvolvimento de adesão eritrocitária “in vitro” (Figura 3 A e B). Não foram observadas hemácias reativas nos esfregaços preparados com eritrócitos do animal controle C01 (Figura 3 C e D).

Para detectar a presença de antígenos de *B. bovis* no soro dos animais - antígenos estes que poderiam se ligar à superfície eritrocitária e à receptores endoteliais, provocando adesão - foi desenvolvido um método de hemaglutinação no qual eritrócitos normais de animais livres de *B. bovis* foram tratados com ácido tânico e incubados com soro de animais inoculados com a BbovUFV1 ou controle. Se antígenos de *B. bovis* estivessem presentes no soro, poderiam se ligar à superfície dos eritrócitos, dada a alteração de cargas na membrana provocada pelo tratamento com ácido tânico. Se os eritrócitos fossem marcados com os antígenos do parasita, anticorpos anti-*B. bovis* poderiam se fixar à superfície celular e, por ligações cruzadas, provocar a aglutinação.

Ao testar soros dos animais B01 e B02 quanto à sua capacidade de sensibilizar os eritrócitos, observou-se que soros coletados dos dois animais a partir de 12 dias pós inoculação produziram sensibilização e posterior aglutinação das hemácias (Figura 4 A e B). Assim, a presença de antígenos no soro dos animais inoculados também foi detectada após o desenvolvimento da adesão eritrocitária “in vitro”. Soros do animal controle C01 não provocaram sensibilização de eritrócitos e reação de hemaglutinação (Figura 4 C).

O animal B02 morreu 14 dias após a inoculação e o animal B01 16 dias após a inoculação, levando à interrupção dos testes.

5.3 Experimento com amostra atenuada BbovUFV1 26^a passagem

Dois animais com baço “in situ” (B03 e B04) foram inoculados com a amostra BbovUFV1 atenuada e um terceiro animal, também com baço intacto, (C02) foi mantido como controle. Durante os 22 dias em que foram

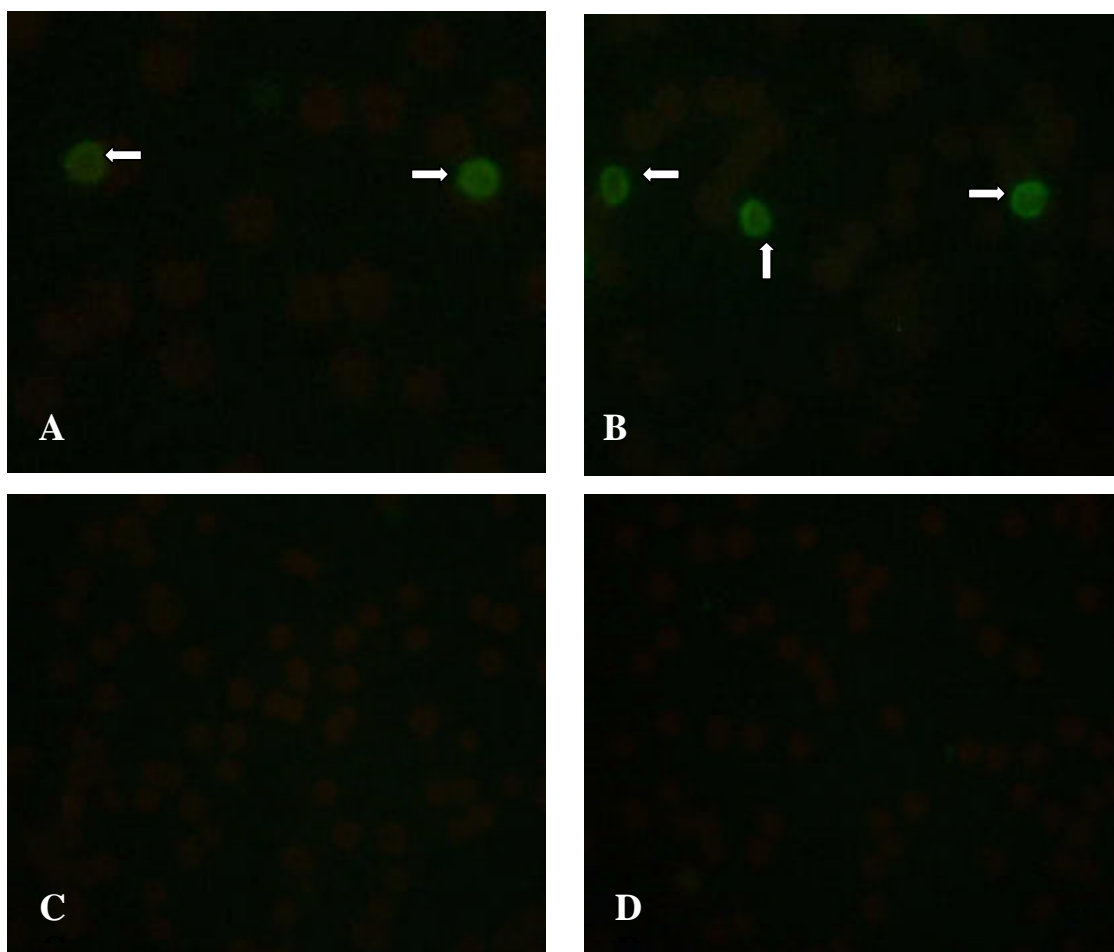


Figura 3 – Imunofluorescência para detecção de antígenos de *Babesia bovis*. Eritrócitos não parasitados de animais inoculados com amostra patogênica BbovUFV1 apresentam fluorescência de superfície, indicativa da presença de antígenos de *B. bovis* na membrana plasmática (setas). A, eritrócitos de animal B01 e B, eritrócitos do animal B02, 14 e 12 dias pós inoculação, respectivamente; C e D, eritrócitos do animal controle C01 14 e 12 dias pós inoculação, respectivamente. Microscópio de epifluorescência, 1000x.

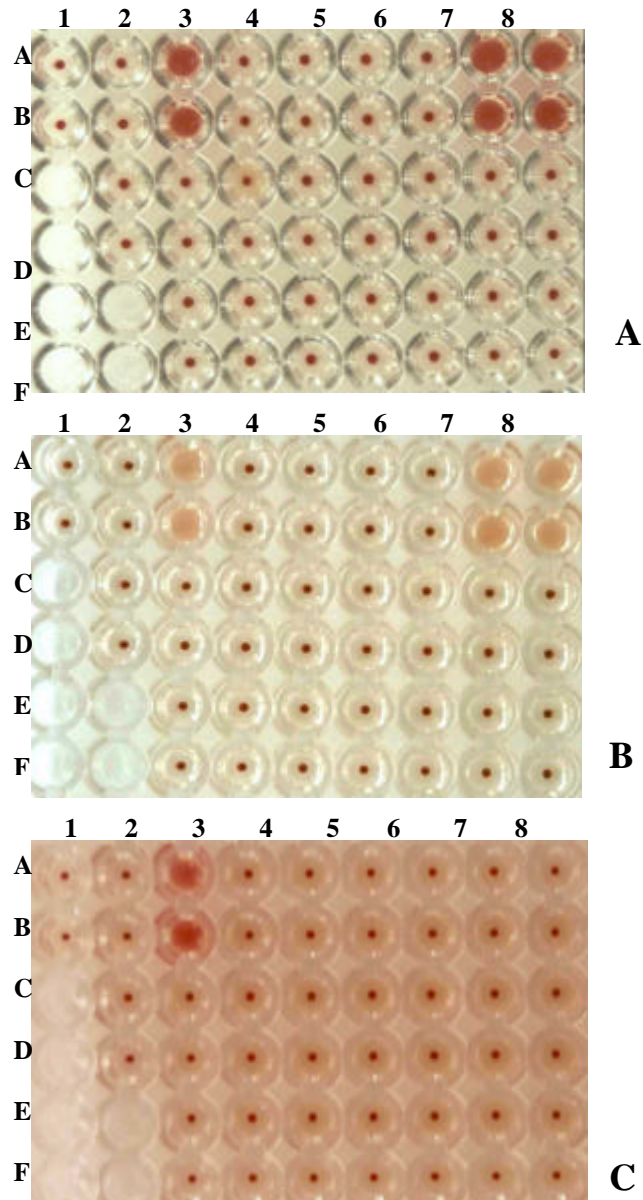


Figura 4 – Teste de hemaglutinação passiva. Em todas as placas, colunas 1 e 2, eritrócitos não sensibilizados; coluna 3, eritrócitos sensibilizados com sobrenadante de cultivo de BbovUVF1 7^a passagem; coluna 4, eritrócitos sensibilizados com soro de animal controle; colunas 5-9, eritrócitos sensibilizados com soros coletados nos dias 0, 4, 8, 12 e 14 pós inoculação, dos animais B01 (placa A), B02 (placa B) e C01 (placa C). Em todas as placas, linhas A e B da coluna 1, eritrócitos não sensibilizados, sem soro; linhas A e B das demais colunas, IgG anti-BbovUFV1 1:20; linhas C e D, soro de animal controle 1:20; linhas E e F, eritrócitos sensibilizados, sem soro. Em todas as placas, coluna 3, linhas A e B: hemaglutinação positiva nos testes controle. Placas A e B, colunas 8 e 9, linhas A e B: hemaglutinação positiva indica presença de exoantígenos de *B. bovis* nos soros dos animais inoculados a partir de 12 dias pós inoculação.

acompanhados, os animais destes experimento não desenvolveram alterações de parâmetros clínicos (temperatura, volume globular e parasitemia) associadas ao quadro de babesiose aguda.

Para confirmar se os animais B03 e B04 inoculados com a amostra BbovUFV1 atenuada desenvolveram a infecção a despeito de não apresentarem sinais de babesiose aguda, foram realizados testes imunoenzimáticos do tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) com amostras de soro coletados em diferentes dias após a inoculação. Tais testes detectam a presença de anticorpos anti-*Babesia bovis*, que são produzidos mediante estímulo de células imunocompetentes dos bovinos durante infecções ativas.

Os testes ELISA foram desenvolvidos de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (BIOAGRO – UFV). Os resultados mostram que os animais B03 e B04 apresentaram sorologia positiva, estando efetivamente infectados. O animal controle C02 apresentou sorologia negativa nos testes imunoenzimáticos (Quadro 3).

Nos testes de adesão em BAECs realizados com eritrócitos dos animais inoculados B03 e B04 e controle C02 as médias permaneceram constantes durante o período do experimento (Quadro 4). As médias de eritrócitos aderidos foram comparadas, por meio de teste t ($p < 0,05$), entre B03 e C02 e entre B04 e C02, a cada dia. Não houve diferença significativa entre as médias de eritrócitos aderidos entre os animais infectados e controle (Quadro 4). Não foi observada adesão de eritrócitos de animais inoculados ou controle nos testes realizados com células Vero.

Os ensaios de imunofluorescência com amostras de sangue periférico dos animais B03, B04 e C02 não demonstraram eritrócitos positivos para antígenos de *B. bovis* em quaisquer dias pós inoculação (Figura 5 A, B, C e D).

Testes de sensibilização de eritrócitos empregando soros coletados dos animais no decorrer do experimento não detectaram antígenos livres de *B. bovis* circulando no soro dos animais inoculados ou do controle em quaisquer dias pós inoculação (Figura 6).

Quadro 3 - Médias da absorvância óptica (492nm) em teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis* em soro de bovinos inoculados com amostra BbovUFV1 26^a passagem atenuada

Dias pós inoculação	Média da absorvância		
	B03	B04	CO2
0	0,701(0,042)	0,626(0,028)	0,670(0,043)
12	0,636(0,005)	0,605(0,001)	0,684(0,009)
37	1,567(0,009)	1,675(0,021)	0,674(0,009)

* Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão

* As amostras foram avaliadas em triplicata; o ponto de corte que define o soro como negativo é 0,763(0,003)

* B03 e B04, animais inoculados com amostra atenuada BbovUFV1 26^a passagem; CO2, animal controle

Quadro 4 – Resultados dos testes de adesão de eritrócitos de animais inoculados com amostra atenuada BbovUFV1 26^a passagem e animal controle em células endoteliais de aorta bovina

Dia pós inoculação	Média de eritrócitos aderidos em 1000 BAECs		
	B03	B04	C02
0	2	2	3
2	0	0.5	0
4	3	0	0
6	0	1	2
8	0.5	1.5	0
10	0.5	1.5	0.5
12	2	0	2
14	0.5	1	1
16	0	2	1
18	1	1.5	0
20	0.5	0	0.5
22	1.5	1.5	1

* BAECs, células endoteliais de aorta bovina; B03 e B04, animais inoculados com amostra BbovUFV1 26^a passagem atenuada; C02, animal controle

* As médias foram calculadas entre duplicatas de um mesmo teste

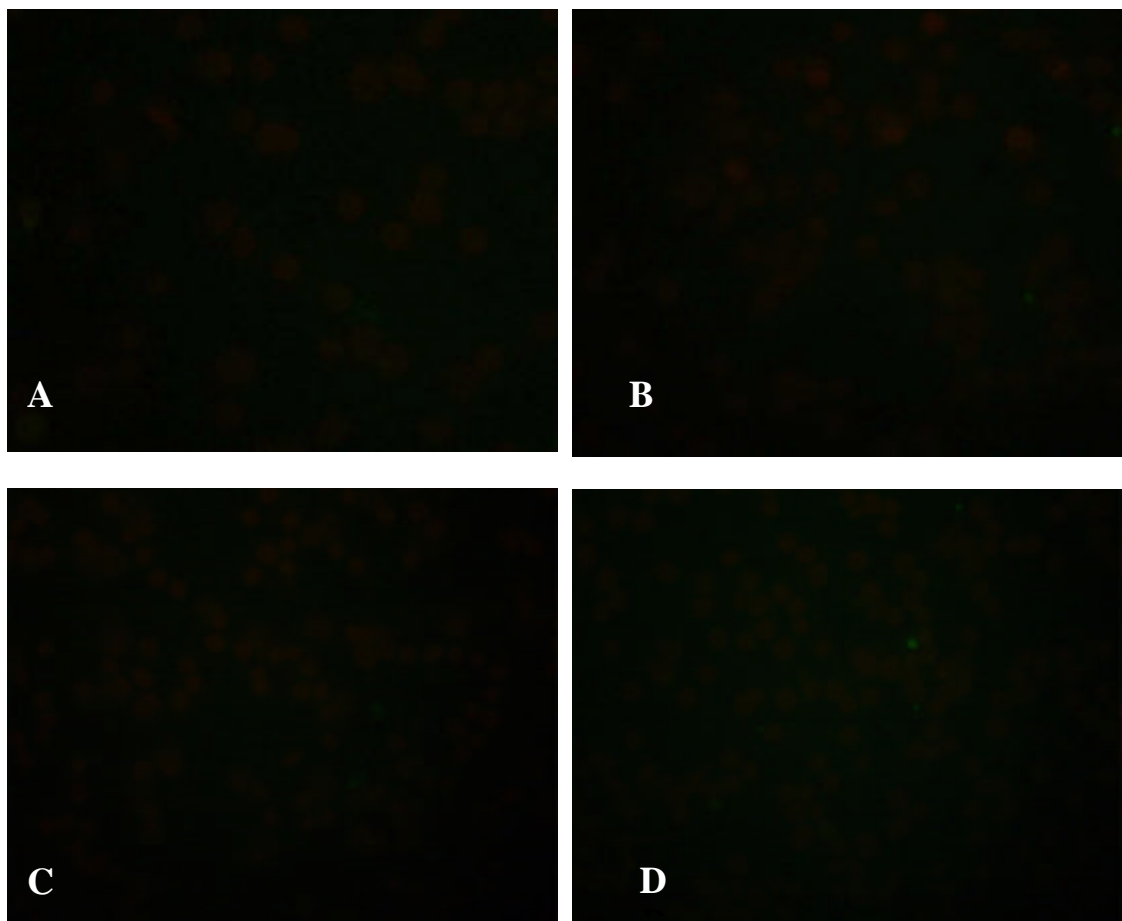


Figura 5 – Imunofluorescência indireta para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em eritrócitos. A, eritrócitos do animal B03 e B, eritrócitos do animal B04, 8 e 16 dias pós inoculação, respectivamente; C e D, eritrócitos do animal C02, 8 e 16 dias pós inoculação, respectivamente. Microscópio de epifluorescência, 1000x.

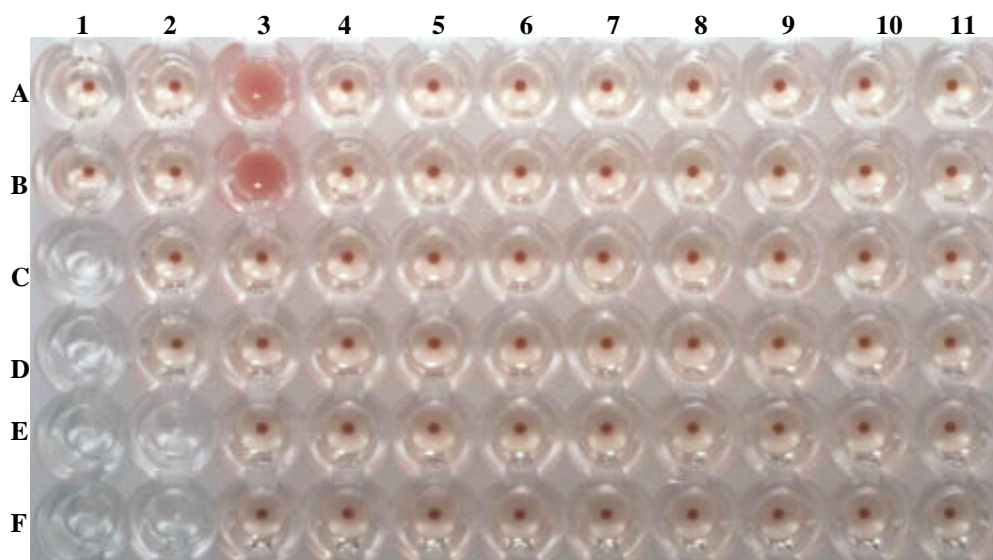


Figura 6 – Teste de hemaglutinação passiva. Colunas 1 e 2, eritrócitos não sensibilizados; coluna 3, eritrócitos sensibilizados com sobrenadante de cultivo de BbovUFV1 26^a passagem; colunas 4 e 5, eritrócitos sensibilizados com soro do animal C02, 0 e 16 dias pós inoculação, respectivamente; colunas 6-8, eritrócitos sensibilizados com soro do animal B03, 0, 8, 16 e 20 dias pós inoculação, respectivamente; colunas 10-11, eritrócitos sensibilizados com soro do animal B04 0, 8, 16 e 20 dias pós inoculação, respectivamente. Linhas A e B da coluna 1, eritrócitos não sensibilizados, sem soro; linhas A e B das demais colunas, IgG anti-BbovUFV1 1:20; linhas B e C, soro de animal controle 1:20; linhas E e F, eritrócitos sensibilizados, sem soro. Coluna 3, linhas A e B, hemaglutinação positiva no teste controle.

5.4 Experimento com amostra patogênica Jaboticabal 7^a passagem

No terceiro experimento, um animal esplenectomizado (B05) foi inoculado com a amostra patogênica Jaboticabal e outro animal esplenectomizado (C03) foi mantido como controle. O animal B05 apresentou aumento de temperatura, queda de volume globular e presença de eritrócitos parasitados com merozoítos de *B. bovis*, sinais atribuídos à babesiose aguda, entre 8 e 14 dias pós inoculação (Quadro 5).

Eritrócitos de B05 e C03 foram submetidos a testes de adesão em BAECs e células Vero no mesmo esquema dos experimentos anteriores. Nos testes com BAECs, as médias de eritrócitos aderidos do animal inoculado e do controle permaneceram constantes (Quadro 6).

A comparação das médias de adesão obtidas com eritrócitos dos dois animais, a cada dia, por meio de teste t ($p < 0,05$), mostrou que não ocorreu diferença significativa entre o número de eritrócitos do animal B05 e C03 aderidos às células endoteliais em quaisquer dias pós inoculação (Quadro 6).

Nos testes de adesão em células Vero não foi detectada adesão de eritrócitos de B05 ou C03.

Nos testes de imunofluorescência, o animal B05 apresentou eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-*B. bovis* nas amostras de sangue coletadas entre os dias 8 e 12 pós inoculação (Figura 7). Testes de hemaglutinação mostraram antígenos do parasita presentes no soro do animal inoculado entre os dias 8 e 12 pós inoculação (Figura 8). As reações de fluorescência e hemaglutinação, no entanto, só eram positivas quando se empregava soro específico para a amostra Jaboticabal para identificar os antígenos de *B. bovis* na superfície do eritrócitos do animal inoculado ou dos eritrócitos sensibilizados. O uso de IgG anti-BbovUFV1 patogênica não proporcionou as mesmas reações de fluorescência e aglutinação.

Quadro 5 - Parâmetros clínicos e laboratoriais medidos no animal inoculado com amostra patogênica Jaboticabal 7^a passagem e animal controle para detecção do desenvolvimento de babesiose aguda

Animal	Parâmetro	DIAS PÓS INOCULAÇÃO											
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
B05	PCV (%)	28	26	28	29	23	20	23	20	23	24	24	24
	P (%)	0	0	0	0	0	0.003	0.02	0.003	0	0	0	0
	T (°C)	37.5	38	37.5	38.5	39	41	40	39.5	38.5	38.5	38	38
C03	PCV (%)	28	25	28	25	25	27	27	27	28	27	25	26
	P (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T (°C)	38	38.5	38	38.5	38.5	38	37.5	37.5	38	38.5	37.5	38.5

* B05, animal inoculado com amostra Jaboticabal 7^a passagem patogênica; C03, animal controle

* PCV, volume globular; P, parasitemia; T, temperatura

Quadro 6 – Resultado dos testes de adesão de eritrócitos do animal inoculado com amostra patogênica Jaboticabal 7^a passagem e de animal controle em células endoteliais de aorta bovina

Dia pós inoculação	Média de eritrócitos aderidos em 1000 BAECs	
	B05	C03
0	1.5	0
2	0	0.5
4	0.5	0
6	1	0.5
8	0.5	2
10	6	1
12	3.5	6.5
14	9	5
16	1	1.5
18	2.5	1
20	1	0
22	0.5	0

* BAECs, células endoteliais de aorta bovina; B05, animal inoculado com amostra Jaboticabal 7^a passagem patogênica; C03, animal controle

* As médias foram calculadas entre duplicatas de um mesmo teste

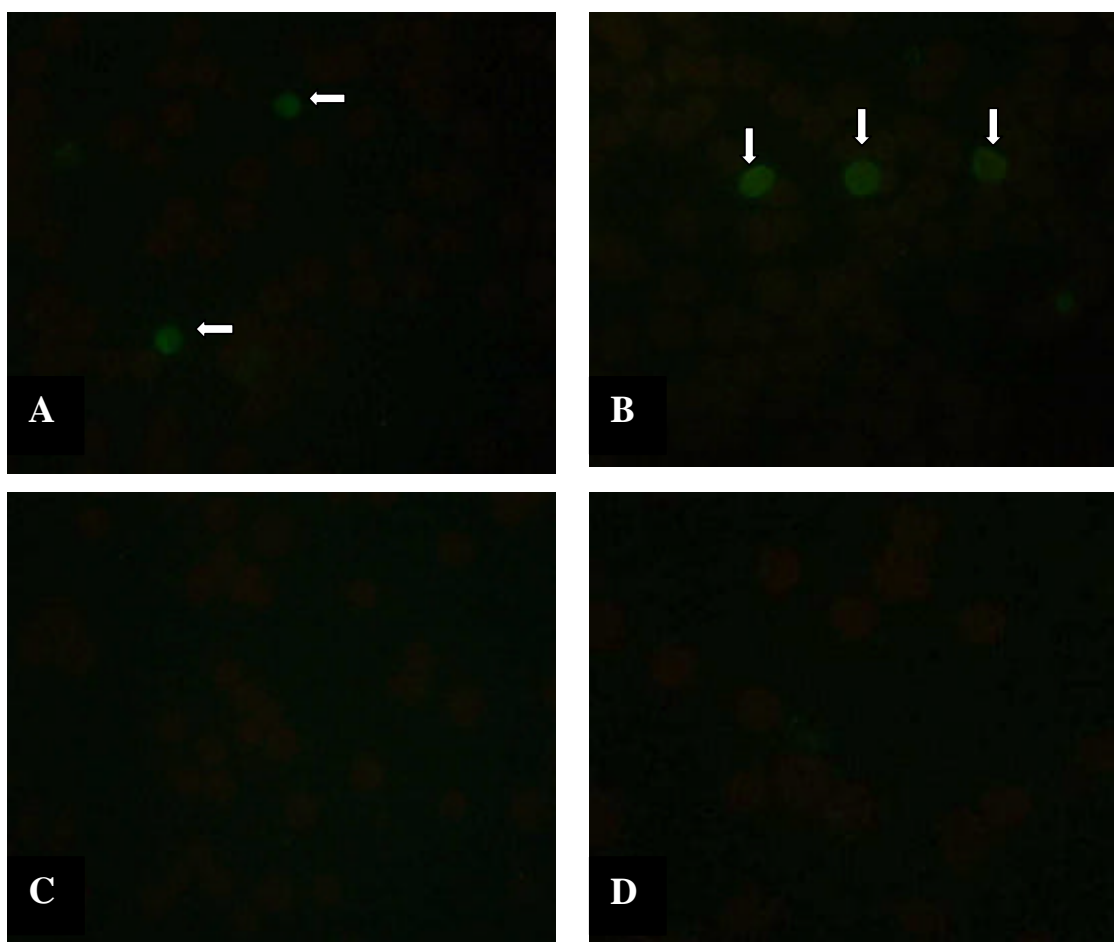


Figura 7 – Imunofluorescência para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em eritrócitos. Eritrócitos não parasitados de animais inoculados com amostra patogênica Jaboticabal apresentam fluorescência de superfície, indicativa da presença de antígenos de *B. bovis* na membrana plasmática (setas). A e B, eritrócitos de animal B05, 8 e 12 dias pós inoculação, respectivamente; C e D, eritrócitos do C03, 8 e 12 dias pós inoculação, respectivamente.

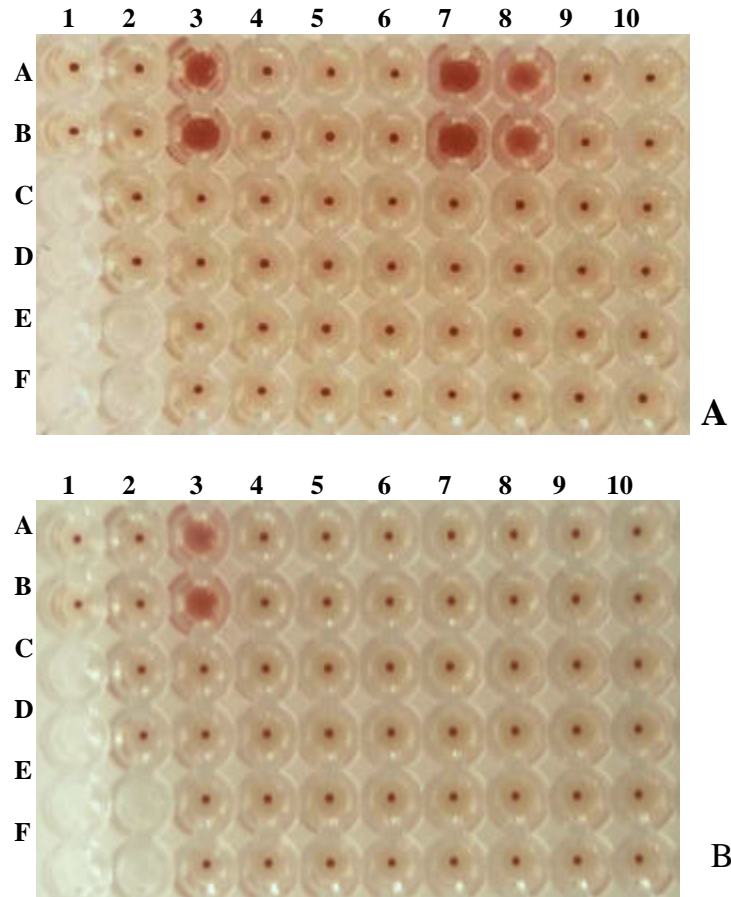


Figura 8 – Teste de hemaglutinação passiva. Em todas as placas, colunas 1 e 2, eritrócitos não sensibilizados; coluna 3, eritrócitos sensibilizados com sobrenadante de cultivo de BbovUVF1 7^a passagem; coluna 4, eritrócitos sensibilizados com soro de animal controle; colunas 5-10, eritrócitos sensibilizados com soros coletados nos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 pós inoculação, dos animais B05 (placa A), C03 (placa B). Em todas as placas, linhas A e B da coluna 1, eritrócitos não sensibilizados, sem soro; linhas A e B da coluna 2, IgG anti-BbovUFV1 1:20; linhas A e B das demais colunas, soro anti amostra Jaboticabal; linhas B e C, soro de animal controle 1:20; linhas E e F, eritrócitos sensibilizados, sem soro. Em todas as placas, coluna 3, linhas A e B, hemaglutinação positiva nos testes controle. Placa B, colunas 8 e 9, linhas A e B, hemaglutinação positiva indica presença de exoantígenos de *B. bovis* nos soros do animal B05 entre 8 e 12 dias pós inoculação.

6. DISCUSSÃO

As células isoladas de aortas bovinas, para aplicação em testes de adesão eritrocitária, foram definidas como endoteliais de acordo com as características morfológicas descritas por SPANEL-BOROWSKI & FENYVES (1994): formação de uma monocamada epitelial pavimentosa, com células poligonais.

Segundo BOOYSE et al. (1975) e SCHWARTZ (1978), o principal tipo celular contaminante em cultivos primários de células endoteliais de aorta são células musculares lisas. As células musculares crescem em camadas sobrepostas, são multinucleadas e podem ser facilmente distinguidas das células endoteliais. Este tipo de célula não foi detectado nos exames de microscopia óptica realizados nos cultivos primários de células endoteliais estabelecidos.

A taxa de multiplicação das células musculares lisas em cultivo é mais alta que a das células endoteliais. Assim, colônias de células musculares contaminantes poderiam, após certo tempo, crescer ao ponto de predominar sobre a população de células endoteliais. Para evitar que eventuais colônias de células musculares não detectadas pelo exame microscópico proliferassem em excesso, os cultivos de células endoteliais eram submetidos ao mínimo de repiques possíveis, nunca ultrapassando 13 passagens.

As células endoteliais podem reduzir a expressão de moléculas de superfície como ICAM 1, VCAM 1, Trombospondina, CD36, entre outras, quando mantidas em cultivo. Se estas moléculas forem as responsáveis pela citoaderência, então, a modulação das mesmas poderia interferir no resultado dos testes de adesão. Resultados negativos dos testes de adesão eritrocitária poderiam decorrer da incapacidade das células endoteliais empregadas em sustentar a adesão, e não da ausência da indução de mecanismos de adesão pelas amostras de *Babesia bovis* testadas. Para evitar este desvio, os testes de adesão nos experimentos com as três diferentes amostras de *B. bovis* foram realizados com células endoteliais entre a 10^a e a 13^a passagens.

Os testes de adesão “in vitro” aplicados neste trabalho demonstraram o aumento da adesão, em células endoteliais, de eritrócitos não parasitados de animais inoculados com uma amostra patogênica de *Babesia bovis* BbovUFV1 7^a passagem.

A adesão de eritrócitos não parasitados observada pode ter resultado da modificação da superfície destas células por antígenos de *B. bovis* adsorvidos do plasma que se ligariam a receptores específicos presentes na superfície de células endoteliais. À medida em que o parasita replicaria no organismo dos animais inoculados, aumentaria a produção e liberação destes antígenos no plasma, de maneira que ocorreria a alteração de um número grande suficiente de eritrócitos para afetar os resultados da adesão “in vitro”.

De fato, pelo resultado dos testes de hemaglutinação, ficou demonstrada a presença de antígenos livres de *B. bovis* em amostras de soro tomadas dos animais a partir de 12 dias após a inoculação com BbovUFV1 patogênica, coincidindo com o desenvolvimento de parasitemia. Paralelamente, imunofluorescências indiretas em esfregaços de sangue periférico dos animais inoculados detectaram a presença de eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-BbovUFV1. Nota-se que o mesmo anticorpo utilizado para aglutinar os eritrócitos sensibilizados com antígenos de BbovUFV1 identificou os eritrócitos não parasitados em testes de imunofluorescência, o que reforça a idéia de que antígenos livres de *B. bovis* podem se ligar à superfície eritrocitária.

Ao mesmo tempo em que os antígenos livres de BbovUFV1 foram detectados no soro e eritrócitos não parasitados portando antígenos de BbovUFV1 foram observados no sangue periférico dos animais inoculados, houve desenvolvimento de adesão eritrocitária “in vitro”. Esta correlação reafirma a hipótese de que a adesão pode ter sido causada pelos antígenos de *B. bovis* adsorvidos na superfície eritrocitária.

No plasma de um animal em fase aguda de babesiose, são encontradas proteínas liberadas das hemácias parasitadas e que podem ser separadas em dois grandes grupos, a saber, os exoantígenos e proteínas de lise eritrocitária. RISTIC & KAKOMA (1988) definem como exoantígenos, todas as proteínas liberadas pela *B. bovis* no plasma ou no sobrenadante de cultivo durante seu desenvolvimento dentro da célula hospedeira. São diferentes das proteínas de lise liberadas apenas quando há ruptura da hemácia pelos merozoítos emergentes. Segundo GOODGER (1973 e 1976) e GOODGER et al. (1981), os exoantígenos de *B. bovis* constituem um grupo heterogêneo de proteínas que são difíceis de fracionar e separar das proteínas plasmáticas. Muitas delas estão associadas em complexos com proteínas liberadas na fase aguda da infecção como haptoglobina, hemoglobina e fibrina ou com anticorpos, especialmente IgM. Os exoantígenos têm alta afinidade pela superfície eritrocitária, o que ficou comprovado com experimentos que envolviam inoculação dessas proteínas em animais imunocompetentes livres de *B. bovis*. Observou-se que, nestes casos, os animais inoculados desenvolviam anemia transitória, que era mediada, em parte, pela retirada de eritrócitos sensibilizados pelos exoantígenos por meio de fagocitose realizada por células do sistema monocítico fagocitário.

Os exoantígenos também foram identificados em sobrenadantes de cultivo de *B. bovis*. Eles foram caracterizados nos trabalhos de SMITH et al. (1981), MONTENEGRO-JAMES et al. (1983 e 1987) e MONTEALEGRE et al. (1987). Estes estudos mostraram que os exoantígenos de cultivo são 3 proteínas distintas, cujo peso molecular varia de 37 a 40 kDa e cada uma delas tem uma origem diferente na célula parasitada. O primeiro está ligado à membrana do eritrócito, o segundo é encontrado no citoplasma da célula hospedeira e o terceiro está

diretamente associado ao parasita, na capa protéica do merozoíto livre. Os exoantígenos de cultivo têm alta afinidade pela superfície eritrocitária, como os exoantígenos identificados no plasma.

É possível que as células endoteliais de aorta bovina expressem algum receptor que possa reconhecer tais exoantígenos nos eritrócitos sensibilizados e mediar a adesão. A ocorrência de adesão de eritrócitos não parasitados dos animais inoculados em células endoteliais de aorta bovina não acompanhada de adesão concomitante em células Vero é indicativo de que exoantígenos de *B. bovis* presentes nos eritrócitos estabeleceriam interações específicas com receptores presentes apenas em células endoteliais bovinas. A natureza do(s) exoantígeno(s) e do(s) receptor(es) que possa(m) ter participado da adesão das hemácias não parasitadas permanece a ser definida.

Antígenos retidos no “pool” protéico citoplasmático ou na membrana da hemácia também são liberados no plasma, no evento de ruptura das hemácias para saída de merozoítos. Entre essas proteínas está VESA 1, hoje apontada como o principal mediador de adesão de eritrócitos parasitados por *B. bovis* em células endoteliais.

Em experimentos seqüenciais, ALLRED et al. (1993 e 1994) e O’CONNOR et al. (1997) e O’CONNOR & ALLRED (2000) demonstraram que essa proteína é sintetizada pelos merozoítos de *B. bovis* e inserida nas projeções espiculares de membrana do eritrócito parasitado. Apesar de não esclarecerem os mecanismos de transporte e inserção da mesma na bicamada lipídica, os pesquisadores descartaram a possibilidade de VESA 1 ser secretado e adsorvido inespecificamente na superfície de células. Em primeiro lugar, testes de imunofluorescência com eritrócitos de cultivo de *B. bovis*, onde foram empregados anticorpos específicos para VESA 1 demonstraram a presença da molécula exclusivamente nas células parasitadas. O tratamento das células com tampões de baixo pH, que poderia retirar materiais fracamente ligados à superfície celular, não diminuiu a fluorescência das células parasitadas, demonstrando que VESA 1 está inserida no bicamada lipídica ou ancorada fortemente em ligações com fosfatidilinositol. Por último, tentativas deliberadas

de adsorver VESA 1 na superfície de eritrócitos normais com dois métodos distintos falharam. Assim, a princípio VESA 1 não parece ser um ligante capaz de mediar adesão de eritrócitos não parasitados.

Porém é preciso lembrar que a purificação e caracterização de VESA 1 se deu em eritrócitos cultivados “in vitro”. Não se sabe como esta molécula se comportaria “in vivo”, se pode sofrer ligação a componentes plasmáticos ou a proteínas de fase aguda, como ocorre com os exoantígenos. Interações deste tipo podem alterar as propriedades químicas da molécula, tornando-a citofílica. Por outro lado, proteínas como fibrina e fibrinogênio, liberadas na babesiose aguda, poderiam se ligar a VESA 1 e ancorá-la na superfície dos eritrócitos.

Outro mecanismo possível para a associação de VESA 1 com a superfície de eritrócitos não parasitados é através da sua transferência entre membranas de eritrócitos ligada a âncoras de fosfatidilinositol. Num eritrócito parasitado, VESA 1 seria conjugada com o fosfatidilinositol que, através da inserção de sua cauda hidrofóbica na bicamada lipídica, fixaria VESA 1 na superfície da membrana. Com a ruptura da hemácia, o complexo VESA 1/fosfatidilinositol seria liberado no plasma e poderia ser incorporado na bicamada lipídica da membrana de um eritrócito não parasitado via cauda hidrofóbica do fosfatidil.

SCHOFIELD et al. (1996) citam exemplos de infecções parasitárias em que ocorrem transferência de proteínas associadas ao fosfatidilinositol entre os parasitas e células do hospedeiro “in vivo”. Por exemplo, a glicoproteína variante de superfície do *Trypanosoma brucei* associada ao fosfatidilinositol intacto pode ser transferida dos parasitas para os eritrócitos e fator acelerador do decaimento funcional (DAF) humano pode ser transferido dos eritrócitos para os trypanossomas. Nas infecções pelo *Plasmodium falciparum* também parece haver liberação, a partir de eritrócitos parasitados, de glicofosfatidilinositol que se associa à membrana de células endoteliais e de macrófagos.

Os estudos voltados para a caracterização da estrutura de VESA 1 realizados por O'CONNOR et al. (1997) não definiram se esta proteína se liga ao fosfatidilinositol. Se isto acontece, é possível então que VESA 1 possa ser transferida entre eritrócitos. Desta maneira, um eritrócito não parasitado poderia

ser “marcado” com VESA 1 e adquirir um fenótipo adesivo. A ocorrência de um mecanismo como este merece posterior confirmação.

Um outro mecanismo que pode ter contribuído para a adesão seria a ativação do sistema de coagulação por esterases liberadas pela *B. bovis* durante a fase aguda da doença. Segundo WRIGHT et al. (1988 e 1989), este fator facilita o desenvolvimento de adesão por desencadear a produção de monômeros solúveis de fibrina que têm afinidade pela superfície das hemácias. A fibrina pode se ligar à trombospondina na superfície de células endoteliais, e portanto, promover a adesão eritrocitária. É possível que a ativação da coagulação tenha contribuído para o desenvolvimento da adesão observada “in vitro”, visto que os animais inoculados com a BbovUFV1 7^a passagem patogênica desenvolveram babesiose aguda.

Existem poucas evidências experimentais que confirmem esta hipótese. PARRODI et al. (1989) observaram que eritrócitos parasitados e não parasitados de animais inoculados com amostra patogênica de *B. bovis* aderiam em superfícies plásticas tratadas com trombospondina, mas não definiram qual a molécula da superfície eritrocitária atuava como ligante. Em um estudo de microscopia eletrônica do seqüestro de eritrócitos em capilares cerebrais de animais inoculados com amostras patogênicas de *B. bovis*, WRIGHT (1972) descreveu a formação de filamentos de fibrina que ligavam eritrócitos parasitados e não parasitados entre si e ao endotélio.

Em estudos anteriores realizados com este mesmo modelo de adesão de eritrócitos em células endoteliais de aorta, KILGER (1999) e PATARROYO et al. (1999) também observaram adesão de eritrócitos de animais inoculados com *B. bovis*, sendo que uma pequena porcentagem dos eritrócitos aderidos (<10%) estavam parasitados. Isto contrasta com os trabalhos O’CONNOR et al. (1999) que, usando células endoteliais de cérebro bovino, observaram que a totalidade dos eritrócitos aderidos estavam parasitados com trofozoítos de *B. bovis*.

Algumas diferenças de metodologia entre esses modelos podem explicar a diferença nos resultados finais. Em primeiro lugar, grupo de O’Connor usou eritrócitos de cultivos “in vitro” de *B. bovis* com alta concentração de eritrócitos

parasitados (2-5%). No modelo presente, os eritrócitos foram obtidos de sangue periférico de animais inoculados, onde as maiores parasitemias não ultrapassaram 0,17%. A redução da porcentagem de células parasitadas introduzidas no teste, diminui a probabilidade de adesão das mesmas.

Nos cultivos existe um grande número de eritrócitos parasitados por trofozoítos e alterados com antígenos de *B. bovis* inseridos na membrana plasmática. Ao contrário do que ocorre na circulação, onde células parasitadas são, em sua maioria, eritrócitos recém invadidos por merozoítos e que ainda não sofreram as modificações de superfície que poderiam levar a adesão. Os eritrócitos parasitados com trofozoítos ficam retidos na microcirculação, aderidos a células endoteliais, ou então são fagocitados pelo sistema mononuclear de defesa. Assim, além de menor concentração de células parasitadas na circulação dos animais inoculados, a proporção de células parasitadas capazes de aderir é menor. Este fator pode ter dificultado a detecção de células parasitadas aderidas nos testes “in vitro”.

O’CONNOR et al. (1999) empregaram amostras clonadas de *B. bovis* mantidas em cultivo “in vitro”, nas quais a população de parasitas deriva de uma só célula parental. Nestas condições, os indivíduos desta população apresentam o mesmo fenótipo e capacidade de adesão. As amostras empregadas no presente estudo são derivadas de isolados de campo e, portanto, heterogêneas em sua constituição. Dentro deste isolado, provavelmente há subpopulações de parasitas expressando um fenótipo adesivo nas hemácias, enquanto que outras subpopulações não têm este fenótipo. Esta heterogeneidade aumenta a probabilidade de se encontrar eritrócitos circulantes que, mesmo estando parasitados, não têm capacidade de aderir.

Observa-se pelas micrografias apresentadas na Figura 3 que os eritrócitos aderidos às células endoteliais sofriam uma redução (não quantificada) em relação ao seu volume normal (provavelmente devido às lavagens em tampões empregados nos testes), além de formar aglomerados. Isto dificultou a focalização do conteúdo dos eritrócitos e diferenciação de parasitas em seu interior. Dessa forma, a ausência de eritrócitos parasitados nos testes de adesão

realizados no presente experimento pode ser atribuída principalmente à forma como tais testes foram delineados e executados, criando situações que não favoreceram a adesão de eritrócitos parasitados ou dificultaram a sua visualização entre os eritrócitos não parasitados.

Animais inoculados com amostra atenuada BbovUFV1 26^a passagem não desenvolveram adesão de eritrócitos em células endoteliais de aorta “in vitro”, em oposto ao que foi observado no experimento com a amostra patogênica de mesma origem. Em modelos de adesão semelhantes ao do presente trabalho, empregando amostras atenuadas de *B. bovis*, KILGER (1999) e PATARROYO et al. (1999) também não observaram adesão eritrocitária.

Uma hipótese levantada para tentar explicar estes achados é que a amostra atenuada não seria capaz de sintetizar proteínas de adesão, ou ainda, produziria proteínas de adesão com baixa afinidade por receptores endoteliais. A amostra atenuada também não ativaria a coagulação e não levaria à liberação de produtos, tais como a fibrina, que facilitariam a adesão. A alteração de todos os mecanismos de adesão seria resultante do próprio processo de atenuação da amostra.

Outra possibilidade é que a amostra atenuada poderia ativar estes mecanismos de adesão porém, como os animais inoculados possuíam baço “in situ”, puderam desenvolver uma resposta eficiente de controle da infecção, não permitindo que o parasita proliferasse a uma carga suficiente para provocar alterações significativas.

Segundo RISTIC & KAKOMA (1988), o processo de atenuação consiste na seleção de subpopulações não patogênicas dentro de uma amostra heterogênea de *B. bovis*. A patogenicidade de uma amostra está associada a muitos fatores, como a sua capacidade de produzir adesão eritrocitária, que é um dos mecanismos fisiopatológicos determinantes de muitas das lesões observadas na babesiose. Assim, a seleção de populações não patogênicas poderia ser resultado de seleção de populações não adesivas. A atenuação pode ser induzida na prática por passagens sucessivas de uma amostra de *B. bovis* em animais esplenectomizados. Não se conhece o mecanismo exato deste processo de

atenuação, sendo que número de passagens que leva à mesma é variável entre as amostras de *B. bovis* e é definido empiricamente.

Acredita-se que a atenuação é resultante da imposição de uma pressão seletiva sobre a população de parasitas. Num animal com o baço intacto, esta pressão é exercida pelo sistema retículo-endotelial esplênico, que fagocita e elimina o agente ou as células parasitadas pelo mesmo (RISTIC & KAKOMA, 1988). As subpopulações que desenvolvem um fenótipo adesivo são positivamente selecionadas na medida em que elas podem escapar da resposta fagocitária, ao permanecerem retidas na microcirculação. Num animal esplenectomizado, a pressão de seleção que o organismo hospedeiro impõe sobre a população de parasitas é diminuída, de modo que as subpopulações com fenótipo não adesivo podem proliferar. Um número alto de passagens de uma amostra de *B. bovis* em animais esplenectomizados pode levar à predominância das subpopulações não adesivas. Tais subpopulações não sintetizariam antígenos capazes de induzir a adesão ou, por outro lado, produziriam formas não adesivas dos mesmos antígenos expressos pela população capaz de causar citoaderência.

Os achados de KILGER (1999) corroboram esta teoria. Em seus estudos, ficou demonstrado que o aumento do número de passagens de uma amostra de *B. bovis* em animais esplenectomizados diminuía sua capacidade de induzir adesão de eritrócitos “in vitro”.

É possível que, no processo de atenuação, a diminuição da capacidade de adesão seja resultado da predominância das subpopulações que expressam as formas não adesivas de VESA 1. O’CONNOR & ALLRED (2000) demonstraram que dentro de uma população de *B. bovis* havia diferentes subpopulações expressando isoformas distintas do antígeno VESA 1. Por causa disso, cada subpopulação apresentava uma capacidade variada de adesão em células endoteliais de cérebro bovino.

Isto seria muito semelhante ao que foi demonstrado por BIGGS et al. (1992) em infecções pelo *P. falciparum*, em humanos. Segundo estes pesquisadores, a patogenicidade de uma amostra de *P. falciparum* depende da sua capacidade de provocar retenção de eritrócitos no sistema nervoso central. As

amostras patogênicas de *P. falciparum* seriam aquelas em cuja população predominam indivíduos com PfEMP1 de alta afinidade pelo endotélio venular cerebral, enquanto que amostras atenuadas de *P. falciparum* expressariam PfEMP1 de baixa afinidade.

Ao mesmo tempo em que os testes de adesão com amostras de sangue dos animais inoculados com BbovUFV1 atenuada não demonstraram eritrócitos aderidos, também não foram detectados exoantígenos de *B. bovis* no soro nem a presença de eritrócitos não parasitados portando antígenos do agente nas amostras de sangue periférico. Estes resultados indicam, a princípio, que a atenuação da amostra induziu a perda da capacidade de síntese de exoantígenos capazes de causar adesão.

No entanto, como mostrado na Figura 6, os ensaios de sensibilização de eritrócitos mostraram que os exoantígenos estavam presentes no sobrenadante de cultivo de BbovUFV1 atenuada, o que atesta a capacidade de síntese de exoantígenos da amostra. Assim, a ausência de adesão de eritrócitos não parasitados poderia ser devida ao fato de que os exoantígenos sintetizados não teriam afinidade por receptores de BAECs e, mesmo que viessem a sensibilizar eritrócitos não parasitados, não ocorreria adesão.

Segundo WRIGHT et al. (1981), a atenuação das amostras de *B. bovis* também é resultante da diminuição da produção de esterases ativadoras dos sistemas caliceína/cininas e coagulação, por predomínio de indivíduos que não sintetizam aquelas enzimas dentro da população. Assim, os efeitos de estase sangüínea e distúrbios de coagulação que geram lesões teciduais não são observados nas infecções com amostras atenuadas. Da mesma forma, a produção de monômeros solúveis de fibrina e a sua participação no processo de adesão também não se desenvolve.

O fato dos animais inoculados com a amostra BbovUFV1 atenuada não terem desenvolvido sinais de babesiose aguda é um indicativo de que não houve desencadeamento de uma resposta inflamatória generalizada associada a mediadores liberados pelo parasita. Assim sendo, acredita-se que a inoculação

não culminou com a ativação de eventos de coagulação que pudessem desencadear adesão.

Por outro lado, a adesão pode não ter se desenvolvido porque os animais inoculados com a amostra atenuada BbovUFV1 tinham o baço intacto, podendo desenvolver uma resposta imune que controlasse a proliferação da babesia e, conseqüentemente, a liberação de antígenos em quantidade. Mesmo que dentro da amostra atenuada houvessem indivíduos expressando antígenos capazes de induzir a adesão e que estes antígenos viessem a sensibilizar eritrócitos, a probabilidade da adesão se desenvolver “in vitro” seria pequena, visto que quaisquer eritrócitos circulantes que fossem marcados com antígenos do parasita seriam reconhecidos e eliminados pelo sistema retículo-endotelial do baço. O controle da carga parasitária também impediria a liberação de enzimas esterases capazes de ativar eventos de coagulação que facilitam a adesão. A inoculação da amostra BbovUFV1 26^a passagem atenuada em animais esplenectomizados e realização de novos testes de adesão poderá esclarecer esta questão.

A inoculação da amostra Jaboticabal 7^a passagem patogênica em animal esplenectomizado levou ao desenvolvimento de sinais de babesiose aguda, presença de hemácias não parasitadas marcadas com antígenos de *B. bovis* em sua circulação e níveis transitórios de antígenos livres de *B. bovis* entre 8 e 14 dias após a inoculação. Apesar disso, não foi observada a adesão de eritrócitos em BAECs “in vitro”.

Foi hipotetizado no experimento com a amostra patogênica BbovUFV1 que a presença de antígenos do parasita no plasma, entre eles VESA 1, pudesse levar a marcação de eritrócitos não parasitados e, com isso, produzir adesão dos mesmos. Por outro lado, esta adesão poderia ser potencializada pelo desencadeamento da cascata de coagulação na fase aguda da doença, com liberação de fibrina capaz de servir de “ponte” entre os eritrócitos e o endotélio. Esperava-se, a princípio, que a mesma correlação atuasse na patologia da doença causada pela amostra Jaboticabal, o que não aconteceu.

Acredita-se que essa diferença marcante com a amostra patogênica BbovUFV1 possa ser atribuída, em parte, a diferenças antigênicas entre estes

dois isolados de origens geográficas diversas (a amostra BbovUFV1 patogênica foi isolada na região de Viçosa-MG e amostra Jaboticabal no estado do Rio Grande do Sul).

A adesão resulta da interação entre antígenos de *B. bovis* na superfície dos eritrócitos e receptores endoteliais complementares. Variações na composição de aminoácidos e estrutura dos antígenos podem alterar a afinidade de ligação com receptores expressos nas células endoteliais. Assim, mesmo que amostras diferentes de *B. bovis* sejam capazes de produzir a sensibilização de hemácias com antígenos, apenas haverá adesão se estes antígenos apresentarem afinidade pelos receptores endoteliais, o que parece ser o caso dos antígenos da BbovUFV1 patogênica e não da amostra Jaboticabal.

De fato, há indícios de que os antígenos detectados nas hemácias não parasitadas dos dois isolados são variantes, visto que nos testes de imunofluorescência e hemaglutinação não foi observada reação cruzada com soro ou IgG específico de cada amostra.

A proteína VESA 1 é o antígeno de *B. bovis* que apresenta a variação mais marcante entre os isolados como demonstrado por ALLRED et al. (1994). Também ficou demonstrado que dependendo da isoforma de VESA 1 expressada, clones de *B. bovis* possuíam ou não a capacidade de aderir em células endoteliais de cérebro bovino (O'CONNOR & ALLRED, 2000). De maneira similar, a molécula de adesão PfEMP1 do *P. falciparum*, apresenta variação na sua porção extracitoplasmática, nos domínios responsáveis pela ligação aos receptores endoteliais. Esta variação, demonstrada por SU et al. (1995) afeta a capacidade de indução de adesão pelo *P. falciparum*.

Se VESA 1 é mediador da adesão dos eritrócitos não parasitados no modelo aqui apresentado, então a variação nesta proteína entre as amostra BbovUFV1 e Jaboticabal pode ser a causa da diferença nos resultados dos testes de adesão.

Os animais inoculados com a amostra Jaboticabal apresentaram um quadro de babesiose aguda que é condizente com a ativação de vias inflamatórias anteriormente descritas e que poderiam desencadear mecanismos “secundários”

de adesão (via fibrina, por exemplo). Assim, era esperado que estes animais tivessem níveis de adesão que, mesmo menores, fossem comparáveis aos observados nos testes com a amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica - o que não foi constatado.

Neste caso, é necessário comparar o grau de patogenicidade das duas amostras citadas. A amostra BbovUFV1 7^a passagem causou um quadro clínico mais grave, com alterações mais pronunciadas de temperatura, volume globular e parasitemia que a amostra Jaboticabal, levando os dois animais inoculados (B01 e B02) a óbito. O animal inoculado com a amostra Jaboticabal (B05) apresentou uma forma benigna de babesiose, que foi controlada a partir de 14 dias pós infecção. É correto inferir destas informações que a amostra Jaboticabal não provocou ativação acentuada dos sistemas calicreína/bradicinina e de coagulação e não levou à liberação de fibrinogênio ou fibrina suficiente para provocar sensibilização e adesão eritrocitária detectável “in vitro”.

O seqüestro de eritrócitos não parasitados na microcirculação sempre foi descrito como consequência da estase sangüínea, da agregação dos eritrócitos não parasitados em torno dos eritrócitos parasitados e da ativação da coagulação. Seria, na verdade, um “empacotamento” dos eritrócitos, impedidos de fluir pelos vasos. Evidências deste trabalho e de outros anteriormente realizados por KILGER (1999) e PATARROYO et al. (1999) mostram que pode haver mecanismos específicos de ligação dos eritrócitos não parasitados com a célula endotelial, via antígenos adsorvidos pelos eritrócitos. Se esses mecanismos se reproduzem “in vivo” é uma questão que merece posterior esclarecimento.

A retenção de eritrócitos não parasitados na microcirculação facilita a proliferação da *B. bovis* nos tecidos e escape da resposta imunológica pelo parasita. Com os eritrócitos justapostos, os merozoítos podem se transferir diretamente de uma célula a outra, escapando da fagocitose ou opsonização por anticorpos. Desenvolvimento de mecanismos que aumentem a retenção de hemácias favorecem a sobrevivência do parasita. Nesse contexto, é provável que a *B. bovis* utilize a adesão de eritrócitos não parasitados como um mecanismo para escapar da resposta imune do hospedeiro.

7. CONCLUSÕES

- Infecções com a amostra patogênica de *Babesia bovis* BbovUFV1 7^a passagem levam ao desenvolvimento de adesão “in vitro” de eritrócitos em células endoteliais de aorta bovina.
- O processo de atenuação de uma amostra de *B. bovis* por passagens sucessivas em animais esplenectomizados leva à seleção, dentro de uma população heterogênea de parasitas, das subpopulações de fenótipo não adesivo.
- Amostras patogênicas diferentes possuem capacidade variada de produzir adesão de eritrócitos não parasitados em células endoteliais.

7.1 Perspectivas futuras

Algumas modificações podem ser introduzidas no modelo com intuito de aprimorar o estudo do processo de adesão eritrocitária. O uso de eritrócitos de cultivo de sangue periférico permitiria a obtenção de um maior número de eritrócitos parasitados com formas maduras de *Babesia bovis* para se introduzir nos testes de adesão. Ao mesmo tempo, poderiam-se empregar outras linhagens

de células endoteliais, tais como células de microcirculação cerebral e pulmonar. Estas modificações simulariam com mais precisão os eventos de adesão “in vivo”.

Para se definir a natureza dos antígenos de *B. bovis* causadores de adesão de eritrócitos pode-se desenvolver adaptações nas técnicas de adesão “in vitro”. Por exemplo, pode-se incubar os eritrócitos dos animais inoculados ou eritrócitos de cultivo com anticorpos contra antígenos definidos de *B. bovis* e verificar se a presença dos mesmos interfere no desenvolvimento de adesão. Para identificar os ligantes do endotélio, pode-se empregar testes de adesão com bloqueio de moléculas de adesão endoteliais, como ICAM-1, VCAM-1 e Trombospondina.

Identificados os mediadores de adesão “in vitro” pode-se testar a atuação dos mesmos “in vivo”, mediante análises histopatológicas dos tecidos que apresentam retenção de hemácias durante as infecções com *B. bovis*. O uso de anticorpos contra antígenos de *B. bovis* ou moléculas de adesão endoteliais em testes de imunohistoquímica permite comparar a expressão de receptores endoteliais entre animais inoculados e não inoculados com *B. bovis* e relacionar a presença destas proteínas com o desenvolvimento local de adesão eritrocitária.

A partir da identificação das moléculas de adesão, pode-se dar início a uma nova etapa do estudo, na qual estas moléculas serão purificadas e caracterizadas quimicamente. Então, pode-se testar o potencial destas proteínas como imunógenos capazes de induzir a produção de anticorpos bloqueadores que impediriam o processo de adesão “in vivo”. Uma vacina com estas características seria uma ferramenta importante para prevenção do desenvolvimento da babesiose aguda e da mortalidade por ela causada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKAWA, M., RABBEGE, J., UNI, S., RISTIC, M., MILLER, L.H. Structural alterations of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 1, p. 45-49, 1985.
- AIKAWA, M. Human cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, n. 1, p. 3-10, 1988.
- AIKAWA, M., ISEKI, M., BARNWELL, J.W., TAYLOR, D., OO, M.M., HOWARD, R.J., The pathology of human cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, n. 2, p. 30-37, 1990.
- AIKAWA, M., PONGPONRATN, E., TEGOSHI, T., NAKAMURA, K., NAGATAKE, T., COCHRANE, A., OZAKI, L.S. A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, s. III, p. 297-301, 1992.
- ALLRED, D.R., HINES, S.A., AHRENS, K.P. Isolate-specific parasite antigens of the *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, p. 121-132, 1993.
- ALLRED, D.R., CINQUE, R.M., LANE, T.J., AHRENS, K.P. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis*-infected erythrocytes. **Infect. Immunt.**, v. 62, n.1, p. 91-98, 1994.
- ALLRED, D.R. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the Parasite World. **Parasitology Today**, v. 11, n. 3, p. 100-105, 1995.

- ALLRED, D.R. Antigenic variation in *Babesia bovis*: how similar is to that in *Plasmodium falciparum*? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92, p. 461-472, 1998.
- ALLRED, D.R., CARLTON, J.M-R., SATCHER, R.L., LONG, J.A., BROWN, W.C., PATTERSON, P.E., O'CONNOR, R.M., STROUP, S.E., The *ves* multigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. **Moll. Cell**, v. 5, p. 153-162, 2000.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne des boeufs. **Comptes Rendus de Académie des Sciences**, v. 107, p. 693-694, 1888. Apud KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.
- BARUCH, D.I., MA, X.C., SINGH, H.B., BI, X., PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood**, v. 90, n.9, p. 3766-3775, 1997.
- BIGGS, B., ANDERS, R.F., DILLON, H.E., DAVERN, K.M., MARTIN, M., PETERSEN, C., BROWN, G.V. Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variants of *Plasmodium falciparum*. **J. Immunol.**, v.149, n. 6, p. 2047-2054, 1992.
- BOCK, R.E., KINGSTONE, T.G., DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.
- BOOYSE, F.M., SEDLAK, B.J., RAFELSON JR., M.E. Culture of arterial endothelial cells: characterization and growth of bovine aortic cells. **Thrombos. Diathes. Haemorrh. Stuttg.**, v. 34, p. 825-839, 1975.
- BROWN, W.C., PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275-280, 1999.
- BUSHELL, G.R., GARRONE, B., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., DALRYMPLE, B.P. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **Int. J. Parasitol.**, v. 21, n. 5, p. 609-611, 1991.
- CARLOS, T.M., HARLAN, J.M. Leucocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n.7, p. 2068-2101, 1994.

- CLARK, I.A., SCHOFIELD, L. Pathogenesis of malaria. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 451-454, 2000.
- COOKE, B.M., BERENDT, A.R., CRAIG, A.G., MacGREGOR, J., NEWBOLD, C.I., NASH, G.B. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. **Brit. J. Haematol.**, v. 87, p. 162-167, 1994.
- FAJARDO, F.T. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. **Revista de Medicina de São Paulo**, v. 4, p. 315-319, 1901. Apud SIQUEIRA, C.L.M. *Babesia bovis* (Babes, 1888; Starcovici, 1893) (Protozoa: Babesiidae). Desenvolvimento de amostra atenuada e virulenta no carrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Belo Horizonte: UFMG, 1991. 89p. Tese (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Unversidade Federal de Minas Gerais, 1991.
- FLORIN-CHRISTENSEN, J., SUAREZ, C.E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., HINES, S.A., McELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 106, p. 147-156, 2000.
- FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 23-52.
- GAY, F., ROBERT, C., POUVELLE, B., PEYROL, S., SCHERF, A., GYSIN, J. Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from *Saimiri* monkeys. An in vitro model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Immunol. Met.**, v. 184, p. 15-28, 1995.
- GOFF, W.L., WAGNER, G.G., CRAIG, T.M., Increased activity of bovine ADCC effector cells during acute *Babesia bovis* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 16, p. 5-15, 1984.
- GOODGER, B.V. *Babesia argentina*: intraerythrocytic location of babesial antigen extracted from parasite suspensions. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 387-391, 1973.
- GOODGER, B.V. *Babesia argentina*: studies on the nature of an antigen associated with infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 6, p. 213-216, 1976.
- GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., MAHONEY, D.F. Initial characterization of cryoprecipitates in cattle recovering from acute *Babesia bovis* (*argentina*) infection. **AJEBAK**, v. 59, p. 521-529, 1981.
- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WRIGHT, I.G., WALTISBUHL, D.J., MIRRE, G.B., *Babesia bovis*: succesful homologous vaccination using a

- heparin-binding fraction of infected erythrocytes. **Int. J. Parasitol.**, v. 17, p. 935, 1987.
- GREENWALT, D.E., LIPSKY, R.H., OCKENHOUSE, C.F., IKEDA, H., TANDON, N.N., JAMIESON, G.A. Membrane glycoprotein CD36: a review of its role in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood**, v. 80, n. 5, p. 1105-1115, 1991.
- HANDUNNETTI, S.M., SCHRAVENDIJK, M.R., HASLER, T., BARNWELL, J.W., GREENWALT, D.E., HOWARD, R.J. Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Blood**, v. 80, n.8, p. 2097-2104, 1992.
- HASLER, T., ALBRECHT, G.R., van SCHRAVENDIJK, M.R. et al. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 332-347, 1993. Apud PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malaria, the red cell and the endothelium. **Annu. Rev. Med.**, n. 45, p. 283-295, 1994.
- HOWARD, R.J., BARNWELL, J.W., ROCK, E.P. Tow approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 27, p. 207-224, 1988.
- IGARASHI, I., AIKAWA, M., KREIER, J.P. Host cell-parasite interactions in babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 53-70.
- JACK, R.M., WARD, P.A. Mechanisms of entry of *Plasmodia* and *Babesia* into red cells. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 445-458.
- JOHNSON, J.K., SWERLICK, R.A., GRADY, K.K. et al. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to microvascular endothelium is regulatable by cytokines and phorbol ester. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 698-703, 1993. Apud PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malaria, the red cell and the endothelium. **Annu. Rev. Med.**, n. 45, p. 283-295, 1994.
- KILGER, G.U. Abschlussbericht. Postdoktoranden – Stipendium der Deutschen. **Forschungsge-meinschaft**. 1999.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.

- LAHAV, J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1182, p. 1-14, 1993.
- LEVINE, L.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 435p.
- LIGNIERES, J. La "Tristeza" ou malaria bovine dans la République Argentine. **Bulletin Société M edicine V et rinaire**, p. 735-770, p. 818-880, 1900. Apud KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.
- LOSOS, G.J. **Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals**. Canada: Longman Scientific and Technical, 1986. 938p.
- MACPHERSON, G.G., WARREL, M.J., WHITE, N.J., LOOAREESUAN, S., WARREL, D.A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocytes sequestration. **Am. J. Pathol.**, v. 119, p. 385-401, 1985.
- MAHONEY, D.F. Babesia of domestic animals. In: KREIER, J.P. (ed.). **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1977. p. 1-52.
- MAHONEY, D.F., KERR, J.D., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *Babesia argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **Int. J. Parasitol.**, v. 9, p. 297-306, 1979.
- MARSH, K., OTOO, L., HAYES, R.J., CARSON, D.C., GREENWOOD, B.M. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 293-303, 1989.
- MCCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, p. 1-24. 1981.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stage. **Adv. Parasitol.**, v. 23, p. 37-103, 1984.
- MONTEALEGRE, F., MONTENEGRO-JAMES, S., KAKOMA, I., RISTIC, M. Detection of culture-derived *Babesia bovis* exoantigens using a two-site enzyme immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 9, p. 1648-1652, 1987.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M.A., RISTIC, M. Localization of culture-derived soluble *Babesia bovis* in the infected erythrocytes. **Vet. Parasitol.**, v. 13, p. 311-316, 1983.

- MONTENEGRO-JAMES, S., TORO, M., LEON, E., LOPEZ, R., RISTIC, M. Bovine babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. **Parasitol. Res.**, v. 74, p. 142-156, 1987.
- NAKAMURA, K.I., MOREHEAD, K., HASLER, T. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes receptor(s) for CD36 and thrombospondin are restricted to knobs on the erythrocyte surface. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 40, p. 1419-1422, 1992.
- OCKENHOUSE, C.F., TEGOSHI, T., MAENO, Y., BENJAMIN, C., HO, M., KAN, K.E., THWAY, Y., WIN, K., AIKAWA, M., LOBB, R.R. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leucocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1183-1189, 1992.
- O'CONNOR, R.M., LANE, T.J., STROUP, S.E., ALLRED, D.R. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA-1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 89, p. 259-270, 1997.
- O'CONNOR, R.M., LONG, J.A., ALLRED, D.R. Cytoadherence of *Babesia bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3921-3928, 1999.
- O'CONNOR, R.M., ALLRED, D.R. Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. **J. Immunol.**, v. 164, p. 2037-2045, 2000.
- PARRODI, F., WRIGHT, I.G., BOURNE, A.S., DOBSON, C. In vitro adherence of bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis* to thrombospondin and laminin. **Int. J. Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 567-569, 1989.
- PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malaria, the red cell and the endothelium. **Annu. Rev. Med.**, n. 45, p. 283-295, 1994.
- PATARROYO S., J.H., VARGAS, M.I., BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 11, p. 301-308, 1982.
- PATARROYO, J.H., CAETANO, B.C., MARCELINO, F.C., KILGER, G.U. Modelo "in vitro" de adesão em células endoteliais de eritrócitos e leucócitos de bovinos infectados com *Babesia bovis*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO

DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11. **Anais...** Salvador, Brasil, 1999.

PONGPONRATN, E., RIGANTI, M., PUNPOOWONG, B., AIKAWA, M. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, n. 2, p. 168-175, 1991.

PURNELL, R.E. Babesiosis in various hosts. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 25-64.

RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. 589p.

RISTIC, M., KAKOMA, I. Exoantigens of *Babesia*. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 131-142.

ROWE, J.A., MOULDS, J.M., NEWBOLD, C.I., MILLER, L.H. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, v. 388, p. 292-295, 1997.

RUDZINSKA, M.A. Morphologic aspects of host-cell-parasite relationships in babesiosis. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 87-141.

SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUTARRA, D., ATTANATH, T., BOUHARON-TAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., DRUILHE, P. Parasitological and clinical response to immunoglobulin administration in *P. falciparum* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, p. 297-308, 1991.

SCHETTERS, T.P.M., EILING, W.M.C. Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria? **Parasitology Today**, v. 15, n. 12, p. 492-497, 2000.

SCHIMIDT, J.A., UDEINYA, I.J., LEECH, J.H. et al. An amelanotic melanoma cell line bears receptors for the knob ligand on infected erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v. 70, p. 379-386, 1982. Apud PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malaria, the red cell and the endothelium. **Annu. Rev. Med.**, n. 45, p. 283-295, 1994.

SCHOFIELD, L., NOVAKOVIC, S., GEROLD, P., SCHWARZ, R.T., McCONVILLE, M.J., TACHADO, S.D. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells

and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. **J. Immunol.**, v.156, p. 1886-1896, 1996.

SCHRAVENDIJK, M.R., ROCK, E.P., MARSH, K., ITO, Y., AIKAWA, M., NEEQUAYE, J., OFORO-ADJEL, D., RODRIGUEZ, R., PATARROYO, M.E., HOWARD, R.J. Characterization and localization of *Plasmodium falciparum* surface antigens on infected erythrocytes from West African patients. **Blood**, v. 78, n. 1, p. 226-236, 1991.

SCHWARTZ, S.M. Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells. **In Vitro**, v. 14, n. 12, p. 966-980, 1978.

SIQUEIRA, C.L.M. *Babesia bovis* (Babes, 1888; Starcovici, 1893) (Protozoa: Babesiidae). Desenvolvimento de amostra atenuada e virulenta no carrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Belo Horizonte: UFMG, 1991. 89p. Tese (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

SMITH, R.D., JAMES, J.A., RISTIC, M., AIKAMA, H., VEGA, C.A. 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. **Bull. Burr. Anim. Ind., U.S.A. Department of Agriculture**, v. 1, p. 177-304, 1893. Apud KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.

SPANEL-BOROWSKI, K., FENYVES, A. The heteromorphology of cultured microvascular endothelial cells. **Drug. Res.**, v. 44, n.1, p. 385-391, 1994.

STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben Hervorbrachten Krankheiten, die Seuchenhafte Hamaglobinurie des Rinder (Babes), das Texasfieber (Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions-krankheiten und Hygiene**, v. 14, p. 1-8, 1893. Apud KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.

SU, X., HEATWOLE, V.M., WERTHEIMER, S.P., GUINET, F., HERRFELDT, J.A., PETERSON, D.S., RAVETCH, J.A., WELLEMS, T.E. The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Cell**, v. 82, p. 89-100, 1995.

- TURNER, G.D.H., MORRISON, H., JONES, M., DAVIS, T.M.E., LOOAREESUWAN, S., BULEY, I.D., GATTER, K.C., NEWBOLD, C.I., PUKRITAYAKAME, S., NAGACHINTA, B., WHITE, N.J., BERENDT, A.R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence of widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule 1 in cerebral sequestration. **Am. J. Pathol.**, v. 145, n. 5, p. 1057-1069, 1994.
- UDEINYA, I.J., SCHMITH, J.A., AIKAWA, M., MILLER, L.H., GREEN, I. Falciparum-malaria infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, v. 213, p. 555-557, 1981.
- WAHLGREN, M., CARLSON, J., UDOMSANGPETCH, R., PERLMAN, P. Why do *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocytes rosettes? **Parasitology Today**, v. 5, p. 183, 1989.
- WILLIMANN, K., MATILE, H., WEISS, N.A., IMHOF, B.A. In vitro sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes: a severe immunodeficiency mouse model for cerebral malaria. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 643-645, 1995.
- WRIGHT, I.G. An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia argentina* infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 2, p. 209-215, 1972.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Proteolytic enzyme activity in the intra-erythrocytic parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Zur. Parasitenkd.**, v. 42, p. 213-220, 1973.
- WRIGHT, I.G., KERR, J.D. Hypotension in acute *Babesia bovis* (= *B. argentina*) infections of splenectomized calves. **J. Comp. Path.**, v. 87, p. 531-537, 1977.
- WRIGHT, I.G. Biogenic amine levels in acute *Babesia bovis* infected cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 4, p. 393-398, 1978.
- WRIGHT, I.G. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 171-206.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., MAHONEY, D.F. Virulent and avirulent strains of *Babesia bovis*: the relationship between parasite protease content and pathophysiological effect of the strain. **J. Protozool.**, v. 28, n. 1, p. 118-120, 1981.

- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 99-118.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., CLARK, I.A. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. **Parasitology Today**, v. 4, n. 8, p. 214-218, 1988.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., BUFFINGTON, G.D., CLARK, I.A., PARRODI, F., WALTISBUHL, D.J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 11-13, 1989.
- XIAO, L., YANG, C., DOROVINI-ZIS, K., TANDON, N.N., ADES, E.W., LAL, A.A., UDHAYAKUMAR, V. *Plasmodium falciparum*: involvement of additional receptors in the cytoadherence of infected erythrocytes to microvascular endothelial cells. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p. 42-55, 1996.
- YIN, H., LU, W., LUO, J., ZHANG, Q., LU, W., DOU, H. Experiments on transmission of *Babesia major* and *Babesia bigemina* by *Haemaphysalis punctata*. **Vet. Parasitol.**, v. 67, p. 89-98, 1996.