

CARLA MARIA BATISTA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE BOVINOS,
INOCULADOS COM AMOSTRA ATENUADA DE *Babesia bovis*
(STARCOVICI, 1893)**

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**

*À minha amada mãe, **Maria de Lourdes Batista**, a quem com muito amor, dedicação e dignidade mostrou-me os caminhos da vida.*

*À minha “vó” **Maria** e ao meu “vô” **João**, os quais ensinaram-me que a felicidade existe nas coisas mais simples da vida.
*In memoriam**

*Ao meu pai **José de Freitas**, onde quer que esteja, sei que está feliz e orgulhoso pela superação de mais uma etapa.
*In memoriam**

DEDICO

*“Há homens que lutam um dia e são bons,
Há outros que lutam um ano e são melhores,
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons,
Mas, há os que lutam por toda a vida, esses são imprescindíveis.”*

Bertold Brecht

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai amado de infinita bondade.

À querida Prof^a. Marlene I. Vargas Vilorio, a quem qualquer palavra de agradecimento não expressaria a minha gratidão e admiração. Na certeza de que o meu aprendizado durante esses anos de convivência superou as fronteiras da ciência, o meu muito obrigada, por toda amizade, dedicação, orientação e confiança.

Ao Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo pela grande amizade, dedicação e ensinamentos transmitidos, que muito contribuíram no meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos de todos os momentos, Aline e Marcinho, pelo ombro amigo nos dias de felicidade e também nos de imensa dificuldade. Pelo auxílio na resolução dos problemas técnicos encontrados durante a confecção da tese.

Ao Prof. Luiz Carlos Croco e sua equipe, da Universidade Federal de Ouro Preto, pela imensa colaboração e orientação na dosagem das citocinas.

Ao Prof. Paulo de Marco Júnior, do Departamento de Biologia Geral/UFV, por todo o auxílio e prestatividade na análise estatística.

A minha amada mãe Lourdes, pelo apoio, confiança e incentivo. Por todo o amor e carinho de mãe que, muitas vezes mesmo à distância, revigoraram as minhas forças para continuar seguindo em frente.

Aos incansáveis companheiros de coleta de sangue, Jorge, Marcio Antônio e Sidimar nas manhãs frias do inverno Viçosense.

A José Carlos, Cauzinho e Waldir por toda a colaboração e cuidados no trato com os animais no isolamento.

Ao então estudante de especialização Caíque pela realização das coletas de linfonodos nos bovinos.

Aos funcionários Cláudio e Adão, do Laboratório de Histopatologia Veterinária, pelo preparo dos cortes histológicos.

Ao Jorge, por todo companheirismo e dedicação, que talvez de forma inconsciente agiram nos aproximando ao longo destes anos de convivência. Pela pessoa maravilhosa e amável em todos os momentos.

Aos meus colegas de curso: Bráulia, Ricardo Portela, Marcelo, José Gomes, Nara, Ana Elisa, Daniele, Flávia, Mayra, Juan Carlos, Leonardo, Dudú, Daniela, Waneska, Paulo e Nivaldo pela amizade e carinho tão importantes nesta jornada.

Aos meus grandes amigos e irmãos de coração, Selma, Anderson, Tereza Oviedo e Rose, por todo o carinho e pela sincera amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte financeiro e estrutural indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos bovinos utilizados no presente trabalho, todo o meu respeito.

BIOGRAFIA

CARLA MARIA BATISTA DE FREITAS, filha de Maria de Lourdes Batista e José de Freitas, nascida em Duque de Caxias-RJ, em 7 de fevereiro de 1974.

Cursou o Segundo grau na Escola Técnica Federal de Vitória-ES, onde se formou técnica em Agrimensura no ano de 1992. Colou grau em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa-MG aos 17 dias do mês de dezembro de 1997.

Durante a graduação foi bolsista do Programa Especial de Treinamento do curso de Ciências Biológicas (CAPES), no período de março de 1994 a dezembro de 1997, sob a tutoria do Prof. Lucio Antônio de Oliveira Campos. Foi estudante de Iniciação Científica do Laboratório de Biologia do Câncer/DBA, sob a orientação do Prof. Marcelo José Vilela, durante o período de maio de 1995 a novembro 1997.

Foi bolsista de Aperfeiçoamento (CAPES) no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários DVT/BIOAGRO, de fevereiro de 1998 a março de 1999, sob a orientação da Prof.^ª Marlene Isabel Vargas Vitoria e do Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária/DVT/UFV em abril de 1999.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	4
3 - REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 - Babesiose bovina.....	6
3.2 - Métodos de controle.....	7
3.2.1 - Proteínas associadas às roptrias (RAP).....	10
3.3 - Peptídeos sintéticos.....	11
3.4 - Mecanismos de imunidade contra espécies de <i>Babesia</i>	14
3.5 - Órgãos linfóides periféricos – Linfonodos.....	19
3.5.1 - Centros germinativos e memória imunológica.....	20
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 - Animais utilizados no experimento.....	25
4.2 - Esquema de inoculação.....	25
4.3 – Coleta de linfonodos.....	26
4.4 - Histopatologia dos linfonodos bovinos.....	27

4.5 - Pesquisa de antígenos de <i>B. bovis</i> em linfonodos bovinos através da técnica de PAP	28
4.6 - Hibridização <i>in situ</i> para detecção de apoptose pela técnica de TUNEL em linfonodos bovinos.....	29
4.7 - Coleta de sangue.....	30
4.7.1 - Teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>B. bovis</i>	30
4.7.2 - Teste de ELISA para detecção de IgG1 e IgG2 bovina.....	32
4.8 - Isolamento de células mononucleares de sangue periférico.....	33
4.9 - Desenho dos peptídeos sintéticos.....	34
4.10 - Estimulação <i>ex vivo</i> de células mononucleares periféricas com peptídeos sintéticos.....	35
4.11 - Dosagem de IFN- γ , TNF- α e IL-12 a partir de sobrenadante de cultivo de PBMC através de teste de ELISA.....	36
4.12 - Análise estatística.....	37
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 - Avaliação sorológica para pesquisa de anticorpos anti- <i>B. bovis</i>	38
5.2 – Cinética de secreção de IgG1 e IgG2 em soro de bovinos inoculados com amostra atenuada de <i>B. bovis</i>	40
5.3 – Avaliação da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por células mononucleares sanguíneas periféricas após estímulo <i>ex vivo</i> ...	44
5.4 – Avaliação histopatológica e imunohistoquímica de linfonodos bovinos inoculados com amostra atenuada de <i>B. bovis</i>	64
6 - CONCLUSÕES.....	79
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	- Morte celular induzida por ativação
APC	- Célula apresentadora de antígeno
CG	- Centro germinativo
CSP	- Proteína do circumsporozoíto
FDC	- Células foliculares dendríticas
IFN- γ	- Interferon- γ
IL-2, 4, 10, 12	- Interleucina-2, 4, 10, 12
iNOS	- Enzima óxido nítrico sintase induzida
MAP	- Peptídeo múltiplo antigênico
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
MSA	- Antígeno principal de superfície
NO	- Óxido nítrico
PBMC	- Células sanguíneas mononucleares periféricas
RAP	- Proteína associada à rotrias
SBP	- Proteína do corpo esférico
TCR	- Receptor de célula T
Th1	- Resposta imune de células auxiliares do tipo 1
Th2	- Resposta imune de células auxiliares do tipo 2
TNF- α	- Fator de necrose tumoral
PAP	- Peroxidase-anti-peroxidase

RESUMO

FREITAS, Carla Maria Batista M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2001. **Avaliação da resposta imune de bovinos inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893).** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vitoria. Conselheiros: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e João Carlos Pereira da Silva.

Bovinos inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* (Bbo UFV-1) foram avaliados quanto ao desenvolvimento da resposta imune, por meio de estudos histopatológicos e imunohistoquímicos de cortes de linfonodos superficiais. Os estudos histopatológicos mostraram ativação da resposta imune pela reatividade de centros germinativos a partir do 3º dia pós-vacinal, sendo mais acentuada entre os 9-12 dias após a primeira exposição ao antígeno. Após a re-inoculação houve um aumento no número de centros germinativos. Níveis maiores de atividade de síntese protéica foram detectados na região medular, em plasmócitos localizados nos cordões medulares, caracterizando a produção de imunoglobulinas. Foram detectados grupos de células em apoptose, principalmente, localizados nos centros germinativos e nos cordões medulares dos linfonodos dos animais inoculados, enquanto que no linfonodo do animal negativo estas células eram observadas em menor número e distribuídas isoladamente. Antígenos de *B. bovis* foram detectados em células dendríticas pelo método de PAP. Concomitantemente às alterações

histopatológicas em órgãos linfóides periféricos, observou-se um aumento nos níveis séricos de IgG1 e IgG2.

Através da dosagem e estudo da cinética de produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 avaliou-se a ativação de PBMCs cultivadas com peptídeos sintéticos e previamente estimuladas com amostra atenuada de *B. bovis*. O reconhecimento do peptídeo sintético 23290 por células de memória, estimulou a produção dos níveis mais elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-12 no presente estudo, caracterizando-o como um potencial imunógeno contra *B. bovis*.

ABSTRACT

FREITAS, Carla Maria Batista M.S., Federal University of Viçosa, June, 2001. **Evaluation of the immune response of bovine inoculated with attenuated sample of *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893).** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Comitee Members: Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo and João Carlos Pereira da Silva.

Bovine inoculated with attenuated sample of *Babesia bovis* (Bbo UFV-1) were appraised about the development of the immune response through histopathologies and immunohistochemistry studies of sections of superficial lymph nodes. The histopathologies studies showed activation of the immune response through the reactivity of germinal centers starting from the 3rd day post-vaccinal, being more accentuated among the 9-12 days after the first exhibition to the antigen. After the re-inoculation there was an increase in the number of germinal centers. Larger levels of protein synthesis were detected in the medullar area, in plasmacytes located in the medullars cords, characterizing the immunoglobulin production. Groups of cells were detected in apoptosis, mainly located in the germinal centers and in the medullars cords of the lymph nodes of the inoculated animals, while in the lymph node of the bovine control, these cells were observed in smaller number and distributed separately. Antigens of *B. bovis* were detected in dendritic cells by the method of PAP. An increase in the serics levels of IgG1 and IgG2 was observed in parallel to the histopathologies alterations in secondary lymphoids tissues.

The activation of PBMCs cultivated in the presence of synthetic peptides and previously stimulated with attenuated sample of *B. bovis* was evaluated through the quantify and study of the kinetics of production of IFN- γ , TNF- α and IL-12. The recognition of the synthetic peptide 23290 for memory cells stimulated the production of the largest levels of IFN- γ , TNF- α and IL-12 detected in the present work, characterizing it as a potential immunogen against *B. bovis*.

1 - INTRODUÇÃO

As babesioses são enfermidades ocasionadas por protozoários intraeritrocitários obrigatórios pertencentes ao gênero *Babesia*. A babesiose bovina continua causando grandes prejuízos econômicos, principalmente em países tropicais e subtropicais. No continente americano, a *Babesia bovis* e a *Babesia bigemina* são as responsáveis pela babesiose bovina, sendo que no Brasil as infecções causadas por *B. bovis* ocasionam prejuízos econômicos mais significativos. A transmissão, em animais susceptíveis, se dá por ocasião da hematofagia por artrópodes da família Ixodidae, sendo o principal vetor biológico na América o carrapato *Boophilus microplus*.

Atualmente, não existem métodos de controle que sejam totalmente eficazes contra a babesiose bovina. Em 1971, foi desenvolvida na Austrália uma vacina viva atenuada que auxiliou no combate ao parasita, mas que ainda apresenta alguns problemas, como o risco de transmissão de outras infecções e a proteção parcial dos animais vacinados (BOCK *et al.*, 1992).

O uso de peptídeos sintéticos apresenta grandes vantagens frente a outros tipos de imunógenos. A utilização de fragmentos protéicos hibridizados, contendo epítomos estimuladores de células B e T que atuam como potentes

imunógenos, poderia representar uma boa alternativa para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a babesiose bovina (BROWN e PALMER, 1999). Proteínas da superfamília gênica ‘*rhoptry associated-proteins 1*’ (RAP-1), localizadas no complexo apical das babesias têm se mostrado promissoras, conferindo imunidade e proteção nos animais vacinados (STICH *et al.*, 1999).

A resposta imune contra a *B. bovis* envolve mecanismos inatos e adaptativos, parecendo ter caráter predominantemente celular. Os macrófagos possuem papel fundamental no controle da infecção, atuando como a primeira linha de defesa na imunidade inata, produzindo citocinas pró-inflamatórias e radicais livres de oxigênio e nitrogênio, os quais são tóxicos para o parasita (STICH *et al.*, 1998). Os linfócitos T CD4⁺ intermediam a resposta imune adaptativa, através da produção de citocinas e da estimulação de linfócitos B a produzirem e secretarem IgG1 e IgG2. Tanto a IgG1 quanto a IgG2 atuam como anticorpos opsonizantes, sendo a IgG2 mais potente do que a IgG1 (McGUIRE *et al.*, 1979).

A elucidação dos mecanismos que conferem proteção, principalmente a indução de memória imunológica, é de grande importância para a produção de uma vacina eficaz contra a babesiose bovina. A morte de linfócitos induzida por ativação (apoptose) está diretamente relacionada à geração da memória imunológica e à manutenção da homeostase do sistema imune. Assim, linfócitos T e B auto-reativos ou com baixa especificidade, bem como aqueles que tenham desempenhado suas funções orgânicas durante a resposta imune são eliminados por apoptose (LIU *et al.*, 1997).

PATARROYO *et al.* (1999), a partir de estudos de predição computacional, baseados na estrutura íntegra da proteína RAP-1, desenvolveram dez peptídeos sintéticos que foram testados quanto a sua antigenicidade. Dentre estes, os peptídeos 5081 e 5084 se destacaram como bons estimuladores de linfócitos B e T, respectivamente. Considerando que a proteção induzida contra a babesiose bovina está diretamente relacionada ao reconhecimento de epítomos

estimuladores de linfócitos B e T (BROWN e PALMER, 1999), os peptídeos 5081 e 5084 foram hibridizados e unidos através de pontes de Lisina-Glutamina-Lisina (KEK) originando o peptídeo sintético 23290. Estes peptídeos foram desenvolvidos e produzidos pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários em conjunto com o Instituto de Immunología do Hospital San Juan de Dios, na cidade de Santa Fé de Bogotá, Colômbia.

Baseado no anteriormente exposto, o estudo da cinética da resposta imune adaptativa *ex vivo*, mediante re-estimulação com peptídeos sintéticos, é de grande importância para avaliar e caracterizar estes fragmentos protéicos como possíveis imunógenos contra a babesiose bovina.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a resposta imune *in vivo* em bovinos *Bos taurus taurus* inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* e verificar memória imunológica pós-vacinal mediante estimulação *ex vivo* com peptídeos sintéticos provenientes da proteína RAP-1.

2.2 – Objetivos específicos

- Constatar *ex vivo* o reconhecimento dos peptídeos sintéticos pelas células sangüíneas mononucleares periféricas (memória imunológica);

-Avaliar comparativamente a eficiência de peptídeos sintéticos na indução da resposta imune adaptativa do tipo celular, através da detecção de IFN- γ , TNF- α e IL-12;

- Estudar a cinética de secreção de IgG1 e IgG2 séricas mediante estimulação de bovinos com amostra atenuada de *B. bovis*;

- Estudar a dinâmica das alterações microscópicas em órgãos linfóides periféricos para verificação da resposta imune *in vivo*;
- Observar a cinética da morte celular induzida por ativação em células imunocompetentes de órgãos linfóides periféricos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Babesiose bovina

A babesiose bovina é uma enfermidade causada por hematozoários intraeritrocitários obrigatórios pertencentes ao Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmorida, Família Babesiidae e Gênero *Babesia*. Duas espécies de babesia acometem rebanhos bovinos na América: *B. bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1893) e *B. bigemina* (SMITH e KILBOURNE, 1893), sendo que, o carrapato da família Ixodidae *Boophilus microplus* é o principal vetor no continente americano, ocorrendo a transmissão biológica do parasita através da hematofagia por artrópodes infectados. Frequentemente, a doença se apresenta de forma aguda, resultando na morte dos animais susceptíveis.

A *B. bovis* e *B. bigemina* têm ampla distribuição mundial, correspondente à distribuição de seus vetores, *B. microplus*, *B. decoloratus* e *B. annulatus*, que ocorrem em regiões localizadas entre os paralelos de latitudes 32°S e 40°N. Cada espécie de *Babesia* é transmitida por uma única espécie de

carrapato em uma mesma região, no entanto, a espécie do vetor pode variar de uma região para outra (LOSOS, 1986).

As perdas econômicas em decorrência da babesiose bovina estão relacionadas principalmente com a mortalidade dos animais, queda da produção de carne e leite, gastos com o controle e tratamento da doença, entre outros fatores. Na América Latina, tais perdas estão associadas à movimentação do rebanho de áreas livres de carrapatos para áreas enzoóticas (RISTIC e KREIER, 1981).

No Brasil, a severidade da doença produzida por *B. bovis* determina maiores prejuízos econômicos em relação aos ocasionados por *B. bigemina*. A babesiose em ocasião da infecção por *B. bovis* é caracterizada por hipertermia, anemia, anorexia, caquexia, hemoglobinúria e pela síndrome do choque hipotensivo, acarretando um alto índice de mortalidade entre animais susceptíveis.

3.2 – Métodos de controle

O controle da babesiose bovina ainda é um problema em diversos países, principalmente, aqueles localizados em áreas de clima tropical onde as doenças produzidas por hematozoários são muito frequentes. Como a transmissão natural da *Babesia* spp é dependente de algumas espécies de carrapatos, a infecção poderia ser prevenida pela execução e manutenção de um programa adequado de controle do vetor. No entanto, em algumas áreas subtropicais e tropicais o programa de controle do carrapato é aparentemente impossível de ser mantido devido a alguns fatores climáticos e geográficos. Assim, em países onde não é possível o controle do vetor, as únicas medidas utilizadas para prevenir as perdas com a babesiose bovina têm sido a vacinação e a aplicação de medidas quimioproláticas (TODOROVIC, 1974).

No início do século XX, devido ao rápido avanço da doença na Austrália, C. J. POUND propôs o primeiro método de imunização como medida de controle da babesiose bovina. O método consistia na inoculação do sangue de animal clinicamente recuperado da infecção por *Babesia* spp em bovinos susceptíveis, sendo esta técnica amplamente utilizada para o controle da doença. Entretanto, na década de 50, houve aumento na taxa de mortalidade dos animais vacinados, provavelmente devido à falhas no processo de imunização proposto. Acredita-se que tenha ocorrido perda da imunogenicidade e diminuição da infectividade da vacina. Outra possibilidade seria que em animais oriundos de áreas com estabilidade enzoótica a “imunidade” conferida pela vacina poderia ser em grande parte atribuída à imunização natural do rebanho quando infestado por carrapatos nas pastagens, a diferença do que ocorria com animais vacinados importados de áreas não endêmicas ao carrapato transmissor da *Babesia* spp. que não apresentavam proteção e morriam quando desafiados (CALLOW *et al.*, 1997).

Pesquisadores australianos desenvolveram a primeira vacina contra *B. bovis*. Trata-se de uma vacina viva atenuada, utilizada em áreas endêmicas na Austrália e posteriormente exportada para diversos países do mundo (CALLOW e MELLORS, 1966; CALLOW *et al.*, 1979). Embora efetiva, a vacina apresenta alguns problemas no que diz respeito ao curto período de validade (5-7 dias a 5°C), a transmissão de agentes infecciosos como o da leucose bovina e a proteção parcial dos animais vacinados (BOCK *et al.*, 1992).

A imunogenicidade de parasitas mortos provenientes de eritrócitos infectados com *B. bovis* foi primeiramente reportada por MAHONEY e WRIGHT em 1976, no entanto, os animais vacinados mostraram proteção parcial quando desafiados com organismos heterólogos.

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que propiciaram a manutenção *in vitro* de *B. bovis* geraram um grande interesse no cultivo deste

parasita, como fonte de vacinas babesiais a partir de antígenos presentes no sobrenadante de cultura (LEVY e RISTIC, 1980).

Animais quando vacinados com exoantígenos de cultivo de *B. bovis* apresentaram proteção parcial após desafio com organismos heterólogos, enquanto que animais inoculados com vacina viva mostraram-se fortemente protegidos com altos níveis de anticorpos específicos por mais de seis meses. Entretanto, os índices de estimulação linfocitária e a taxa de proliferação celular, quando desafiados com amostras homólogas, foram maiores e por períodos mais prolongados nos animais inoculados com exoantígenos de cultivo de *B. bovis* (TIMMS *et al.*, 1983; TIMMS e STEWARD, 1984). Em 1995, PATARROYO *et al.* demonstraram que exoantígenos presentes em sobrenadante de cultivo de amostra atenuada de *B. bovis* (Bbo UFV-1) foram capazes de induzir uma resposta imune protetora contra amostras virulentas heterólogas.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de se identificar proteínas de *B. bovis* que sejam imunogênicas e possam ser utilizadas na produção de vacinas constituídas por subunidades protéicas (ORINDA *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1995; TUO *et al.*, 1999).

A utilização de anticorpos monoclonais contra merozoítos íntegros ou organelas do complexo apical, tais como: roptrias, micronemas, corpos esféricos e grânulos densos, permitiram a identificação de proteínas requeridas para a sobrevivência do parasita (PALMER e McELWAIN, 1995). Porém, uma limitação deste método, é que nem sempre as proteínas imunodominantes identificadas conferem proteção, como é o caso da ‘*major surface antigen – 1*’ (MSA-1) (WRIGHT *et al.*, 1992; HINES *et al.*, 1995).

Por outro lado, várias proteínas foram fracionadas por métodos bioquímicos e caracterizadas como frações indutoras de células T auxiliares (Th) específicas para *B. bovis*, incluindo a ‘*rhoptry-associated protein 1*’ (RAP-1), 12D3, ‘*spherical body protein 1*’ (SBP-1), MSA-1, MSA-2, ‘*glutathione-S-transferase*’ (GST-11C5), entre outras. A proteína recombinante 12D3, rica em

resíduos de cisteína e secretada pelo parasita no citoplasma de eritrócitos infectados, foi fracamente reconhecida por linhagens de células Th provenientes de bovinos imunizados contra *B. bovis*, fato que segundo os autores poderia estar relacionado ao extensivo dobramento intramolecular gerado pelos inúmeros resíduos de cisteína presentes em sua estrutura (COURT *et al.*, 1998). As proteínas MSA-1 e SBP-1 induziram *in vitro* baixos níveis de proliferação de linfócitos Th (BROWN *et al.*, 1993a; STICH *et al.*, 1999). Segundo ORINDA *et al.* (1992), a proteína recombinante GST-11C5 não induziu à produção de IFN- γ por células provenientes de animais inoculados com esta proteína e nem de animais naturalmente infectados com *B. bovis*. Já, a proteína RAP-1 induziu altos índices de proliferação de linhagens celulares do tipo Th cultivadas por mais de oito semanas (STICH *et al.*, 1999).

3.2.1– Proteínas associadas as roptrias (RAP)

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

A maior parte dos estudos de componentes do complexo apical está relacionada a antígenos da proteína RAP-1, de 60kDa, a qual é codificada por dois genes idênticos em *B. bovis* (SUAREZ *et al.*, 1998).

Todos os membros da família RAP-1 apresentam quatro resíduos de cisteína conservados e uma considerável homologia na sequência de aminoácidos. A comparação entre as sequências de aminoácidos da RAP-1 de *B. bovis* e de *B. bigemina* revelou a existência de um bloco de aproximadamente 300 aminoácidos

com 45% de identidade, inclusive uma seqüência de 14 resíduos de aminoácidos com 100% de homologia, localizado na região amino terminal da proteína (PALMER e McELWAIN, 1995).

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

Então, uma vacina contra *B. bovis*, constituída de subunidades protéicas deve incluir epítomos para linfócitos T e B, não sujeitos a variação antigênica, devendo ser reconhecidos por uma grande variedade de moléculas MHC classe II, o que coloca a proteína RAP-1 como forte candidata para produção de vacina (BROWN e PALMER, 1999).

3.3 – Peptídeos sintéticos

As inúmeras descobertas no campo da biologia molecular, assim como, o domínio de técnicas biomoleculares tornou possível o desenvolvimento de vacinas de DNA e vacinas recombinantes, bem como a utilização de peptídeos sintéticos que induzem a proteção contra um determinado agente agressor.

Um grande avanço que viabilizou o uso de peptídeos sintéticos como possíveis imunógenos foi a simplificação e automatização da síntese de peptídeos em fase sólida, que veio abolir as velhas e trabalhosas técnicas de clivagem enzimática ou química de proteínas, as quais comprometiam a pureza do material obtido (MERRIFIELD, 1963). A possibilidade de síntese de peptídeos permite a manipulação de fragmentos protéicos mínimos, com estrutura antigênica bem definida que venham estimular uma resposta imune específica e

efetiva, eliminando os efeitos indesejáveis dos métodos tradicionais (BEN-YEDIDIA e ARNON, 1997).

Estudos de predição computacional, baseados na estrutura primária e nas características bioquímicas das proteínas, têm sido realizados para a identificação de possíveis sítios antigênicos em vírus, bactérias, parasitas e células neoplásicas, estimulando o estudo de uma nova geração de vacinas (HOOP e WOODS, 1981; STREICHER *et al.*, 1984; DeLISI e BERZOFSKY, 1985; SPOUGE *et al.*, 1987).

ANDERER e SCHLUMBERGER (1965), foram os primeiros pesquisadores a utilizar-se da tecnologia de peptídeos sintéticos em trabalhos com o vírus do mosaico do tabaco. Desde então, vários estudos têm sido realizados visando a utilização de peptídeos sintéticos como possíveis imunógenos contra diversas patologias.

Vacinas constituídas por peptídeos sintéticos oferecem algumas vantagens quando comparadas com outras categorias de vacinas, tais como: alto grau de pureza e completa segurança quanto à caracterização química e à ausência de contaminantes, reprodutibilidade na produção, fim da manipulação de cultivo celular em biorreatores, alta estabilidade e baixo custo na produção, permitindo também a manipulação da resposta imunológica, pois os imunógenos sintéticos podem ser desenhados de tal forma que estimulem uma resposta imune apropriada (NEURATH e KENT, 1986).

Atualmente reconhece-se que a utilização de peptídeos sintéticos como imunógenos requer a presença de epítomos estimuladores de linfócitos B e T em sua estrutura, para induzir a proteção do indivíduo vacinado contra o agente agressor. Assim, por meio de ligações covalentes é possível construir peptídeos híbridos constituídos por seqüências de resíduos de aminoácidos que sejam reconhecidos tanto por células B quanto por células T. Estes peptídeos recombinantes são denominados “*multiple antigenic peptide*” (MAP) (JACKSON *et al.*, 2000).

ARNON e LEVI (1995), já haviam reportado o desenvolvimento de um peptídeo sintético híbrido, constituído por frações estimuladoras de linfócitos B, T CD4+ e T CD8+ a partir de uma nucleoproteína do vírus da influenza. Utilizando-se de ratos como modelo experimental observaram proteção contra a forma letal da doença, assim como, proteção cruzada contra organismos correlacionados.

Igualmente, muitos avanços têm sido obtidos com relação à utilização de peptídeos sintéticos como imunógenos contra o *Plasmodium falciparum*, cuja complexidade do ciclo biológico é um dos fatores que dificulta o desenvolvimento de uma vacina. Este fato levou os pesquisadores a procurar vacinas constituídas de subunidades, para tentar definir qual proteína referente a cada estágio biológico poderia ser utilizada no controle da doença. A proteína do circumsporozoítio (CSP), constituída por 37 repetições de um tetrapeptídeo (Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina) denominado NANP mostrou-se altamente antigênica. Resultados positivos foram observados em voluntários humanos vacinados com um peptídeo sintético constituído por 40 repetições da seqüência NANP (TOGNA *et al.*, 1986; GORDON *et al.*, 1995). Outra vacina contra a malária, que se encontra em fase de testes clínicos, é a SPf66 constituída de três peptídeos desenhados a partir de proteínas do estágio sangüíneo do *P. falciparum* unidas à seqüência NANP. A vacina quando testada na América do Sul apresentou níveis significativos de proteção (PATARROYO *et al.*, 1992).

Entretanto, a aplicação da tecnologia dos peptídeos sintéticos no campo da medicina veterinária ainda é pouco utilizada. Dentre eles, destacam-se os trabalhos sobre o controle do carrapato bovino *B. microplus* que mostram a eficiência de fragmentos protéicos, na indução de proteção de bovinos susceptíveis contra este artrópode (OLIVEIRA, 1998; PORTELA, 2000).

Estudos preliminares para avaliar a antigenicidade de dez peptídeos sintéticos, baseados na estrutura íntegra da proteína RAP-1 de *B. bovis*, foram realizados no Laboratório de Biologia e Controle de

Hematozoários/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa. Bovinos *Bos taurus taurus* da raça Holandês foram inoculados com amostra atenuada e exoantígenos de cultivo de *B. bovis* (Bbo UFV-1) e reinoculados aos 30 dias. Os testes de estimulação *ex vivo* de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) e os testes de ELISA, visando o mapeamento de epítomos indutores de linfócitos T e B respectivamente, mostraram o reconhecimento de seis peptídeos, sendo que três induziram ótima estimulação para linfócitos T (5084, 5087 e 5089) e os outros para linfócitos B (5081, 5085 e 5088) de acordo com registro no livro de seqüências (PATARROYO *et al.*, 1999).

A partir destes resultados foram selecionados os dois peptídeos que apresentaram maior antigenicidade, os quais após hibridização deram origem ao peptídeo sintético 23290. Assim, os peptídeos 5081 e 5084 foram intercalados com pontes KEK, com o intuito de melhorar suas características hidrofílicas. A construção deste peptídeo teve como objetivo principal estimular a resposta imune e caracterizá-lo como possível imunógeno contra *B. bovis*.

3.4– Mecanismos de imunidade contra espécies de *Babesia*

A imunidade contra a *Babesia* spp. requer não só a resposta imune inata mas também a resposta imune adaptativa. Pelo fato da babesia ser parasita intra-eritrocitário obrigatório, células T CD4+ representam a ligação entre estes dois tipos de resposta imune, uma vez que o eritrócito não possui complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

WRIGHT *et al.* (1988), BROWN e PALMER (1999) consideram que pelo fato de *B. bovis* e *P. falciparum* causarem patologias similares, é possível que os mecanismos de proteção contra estes patógenos também sejam semelhantes.

Estudos experimentais com camundongos atímicos não imunizados demonstraram que a recuperação durante o estágio agudo da malária é

independente de células T, requerendo, porém, a ativação de macrófagos. Esta ativação leva ao aumento da fagocitose, com produção de radicais tóxicos de oxigênio e óxido nítrico (NO) e também a ativação de células 'natural killer' (NK). Entretanto, a imunidade adaptativa é dependente de linfócitos T auxiliares (Th), os quais possuem papel fundamental na produção de citocinas, que por sua vez, contribuem na estimulação de linfócitos B a produzirem imunoglobulinas de alta afinidade (IgG1 e IgG2) e na ativação de macrófagos (KUMARATILAKE e FERRANTE, 1992; FELL *et al.*, 1994).

Em bovinos esplenectomizados que receberam corticosteróide, os quais inibem a reação inflamatória mediada por macrófagos e por células T, observou-se parasitemia aumentada e maior incidência de morte em decorrência de edema pulmonar. Então, a atividade anti-parasitária contra *Babesia* spp e *Plasmodium* spp parece estar relacionada à produção de mediadores pró-inflamatórios, dentre os quais: fator de necrose tumoral- α e β (TNF- α , TNF- β) e interferon- γ (IFN- γ) que aumentam a atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos, levando à explosão respiratória com liberação de produtos microbicidas (WRIGHT e GOODGER, 1988). Ainda, JOHNSON *et al.* (1996) constataram, em estudos *in vitro*, que produtos secretados pelos macrófagos ativados, com exceção de TNF- α , foram tóxicos para *B. bovis*, inibindo o crescimento do parasita em sistemas de co-cultivo de macrófagos com eritrócitos infectados ou quando separados fisicamente em cultivo.

Por outro lado, IGARASHI *et al.* (1999) demonstraram a importância dos linfócitos T CD4+ no controle da infecção por *B. microti*. Após re-infecção, camundongos BALB/c atímicos apresentaram altas parasitemias (30-60%) em relação a camundongos BALB/c normais (<0,15%). Também observaram que camundongos BALB/c normais, após receberem tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD4+ apresentavam altas parasitemias após re-infecção em relação aos animais que receberam anticorpos anti-CD8+.

FELL e SMITH (1998), constataram que células T CD4+ antígeno-específicas, quando transferidas para roedores infectados com *Plasmodium* spp. conferiam imunidade contra o estágio sanguíneo assexual do parasita. Entretanto, a maioria dos estudos mostra que células B também são requeridas para a proteção do hospedeiro, indicando a importância tanto das células do tipo Th quanto dos anticorpos na imunidade contra hemoparasitas (TAYLOR-ROBINSON, 1995).

Experimentos *in vivo* comprovaram as funções efetoras dos macrófagos ativados e dos linfócitos T CD4+ na imunidade protetora contra *B. bovis*. A administração de soro hiperimune ou misturas equivalentes de IgG1 e IgG2, após quatro dias de infecção com *B. bovis*, reduziu significativamente os níveis de parasitemia em bovinos esplenectomizados (MAHONEY *et al.*, 1979). Já, experimentos *in vitro* utilizando eritrócitos infectados com *B. bovis* e soro hiperimune mostraram que a viabilidade dos parasitas não era afetada, o que sugere que os anticorpos, *in vivo*, agem como opsoninas para macrófagos ativados (MAHONEY, 1986).

Em bovinos, tanto a IgG1 quanto a IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação à IgG1 (McGUIRE *et al.*, 1979). A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina-4 (IL-4) enquanto que o IFN- γ estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995). Estes resultados foram confirmados por BROWN *et al.* (1999), quando demonstraram que clones de células Th produtoras de IFN- γ , específicos para RAP-1 de *B. bigemina*, induziam aumento nos níveis de IgG2 produzidos por linfócitos B e que células Th0, capazes de co-expressar IL-4 e IFN- γ , forneciam sinais co-estimuladores necessários para o aumento da síntese de IgG1 e IgG2 por células B.

O paradigma da resposta imune do tipo Th1 ou do tipo Th2, postulado por MOSMANN *et al.* em 1986 em camundongos, de que a proteção imunológica está relacionada a respostas do tipo celular ou humoral, é na verdade

uma simplificação de uma complexa rede de mecanismos imunorreguladores. Existem evidências de que muitas infecções são controladas através de mecanismos humorais e celulares. A imunorregulação de infecções difere em relação aos tipos celulares envolvidos, as citocinas e mediadores secretados, assim como os seus efeitos supressores ou indutores sobre respostas imunes do tipo Th1 e Th2 (COX, 1997; BROWN *et al.*, 1998a).

A resposta imune de humanos e bovinos contra determinados antígenos é heterogênea, existindo uma predominância da resposta de tipo Th1 ou de tipo Th2 (BROWN *et al.*, 1993b). Esta heterogeneidade relaciona-se com o perfil de citocinas produzidas e secretadas. Pesquisas realizadas com clones específicos de células T CD4⁺ bovinas contra *B. bigemina* e *Fasciola hepatica* mostraram uma co-expressão de IL-4 e IFN- γ , acompanhada da expressão de IL-2 e/ou IL-10. A expressão do RNAm da IL-10 foi detectada em clones de células T do tipo Th0, Th1 e Th2 (BROWN *et al.*, 1998a).

As citocinas desempenham importantes funções imunorreguladoras sobre células T diferenciadas. A IL-10 humana recombinante suprimiu a proliferação de linfócitos T bovinos e a produção de IFN- γ , sendo este efeito dependente de células apresentadoras de antígenos (APC), possivelmente macrófagos (CHITKO-McKOWN *et al.*, 1995). A inibição causada pela IL-10 foi revertida pela adição de IL-12 ou pelo uso de anticorpos específicos contra essa citocina.

Estudos realizados com clones de células Th de bovinos e humanos mostraram que a IL-12, produzida principalmente por macrófagos e por células dendríticas, induziu à produção de IFN- γ em todos os subtipos de clones Th analisados (Th0, Th1 e Th2), embora, não foi observado aumento significativo na taxa de proliferação celular (MANETTI *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1996b). Todavia, os autores não puderam definir o efeito da IL-4 sobre os clones analisados devido à heterogeneidade dos resultados obtidos. Em clones de células

T antígeno-específicas de bovinos a IL-4 ora inibia, ora não apresentava efeito algum e em alguns casos aumentava sutilmente a produção de IFN- γ .

Então, estes resultados parecem mostrar que em humanos e bovinos o paradigma das respostas Th1/Th2, é uma visão simplificada dos mecanismos intrínsecos e extrínsecos envolvidos na proteção do hospedeiro contra o agente agressor.

Em estudos *in vitro* com diversos clones de células Th, estimuladas com antígenos de *B. bovis*, analisou-se o efeito da IL-12 e da IL-4 na modulação da expressão de citocinas por células Th de memória. Assim, quando se adicionou a IL-12 houve um aumento na produção de IFN- γ em todos os clones estudados, embora sem aumento significativo na taxa de proliferação celular ou na expressão de RNAm de IL-2. Ainda, não houve efeitos significativos na indução da expressão de transcritos de IL-4. Por outro lado, a produção de IFN- γ não foi afetada pela adição de IL-4 recombinante (TUO *et al.*, 1999). Estudos prévios em bovinos já haviam demonstrado que um dos efeitos biológicos da IL-4 é aumentar a expressão de marcadores de superfície em linfócitos B, tais como: CD23, IgM e MHCII, além de aumentar a produção de IgG1 e IgE (ESTES *et al.*, 1995).

Vários estudos têm mostrado a importância do IFN- γ , produzido por linfócitos Th ativados, na proteção contra a babesiose bovina. Em 1998, STICH *et al.* demonstraram, pela primeira vez, a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de bovinos, estimulados *in vitro* com antígenos de membrana de *B. bovis* e com sobrenadante de cultura de células Th antígeno-específicas contendo IFN- γ e TNF- α endógenos. Estes achados parecem sugerir que o aumento da expressão da iNOS em macrófagos pode ser indicativo do potencial babesicida do NO contra babesias. Todavia, a superprodução de NO também pode estar associada a mecanismos patogênicos da infecção, incluindo a babesiose cerebral, já que várias disfunções orgânicas, observadas durante a evolução da malária e da babesiose, podem ser mediadas pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (GRAU *et al.*, 1989).

3.5- Órgãos linfóides periféricos – Linfonodos

A ontogênese dos linfócitos em mamíferos acontece em duas fases distintas de desenvolvimento. A primeira fase ocorre em órgãos linfóides primários: medula óssea e timo, a qual é totalmente independente da exposição a antígenos estranhos. A segunda fase de desenvolvimento ocorre nos órgãos linfóides periféricos ou secundários: linfonodos, baço, tecido linfóide associado às mucosas. Nos órgãos linfóides secundários ocorre a proliferação e a diferenciação de linfócitos imunocompetentes em resposta a antígenos específicos (ABBAS *et al.*, 2000).

A maioria dos linfócitos está localizada em estruturas encapsuladas altamente organizadas denominadas linfonodos, que estão interpostos ao longo dos maiores vasos regionais do sistema vascular linfático (BURKITT *et al.*, 1994).

Histologicamente o linfonodo é caracterizado por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, uma região mais externa, altamente celular, denominada de córtex e uma região central conhecida como medular. A região cortical pode ser dividida em: córtex externo ou superficial e o córtex profundo ou paracórtex. O córtex superficial, localizado mais externamente ao estroma nodal, é constituído basicamente por linfócitos B “naive”, os quais se aglomeram de forma mais ou menos compacta dando origem aos nódulos linfóides ou foliculos primários. Vários destes foliculos podem apresentar centros germinativos (CG) ou nódulos secundários, local de alta proliferação e diferenciação de linfócitos B. A região paracortical está localizada entre o córtex externo e a medula, sendo constituída principalmente por linfócitos T, dos quais cerca de 70% são linfócitos T CD4+. Além dos linfócitos T, também são encontrados macrófagos e células dendríticas, estas últimas são as responsáveis pelo transporte e apresentação de antígenos na região paracortical. As unidades funcionais da região paracortical são os cordões paracorticais, onde se acredita que ocorra a ativação e subsequente

maturação de células T antígeno-específicas por células dendríticas (FU e CHAPLIN, 1999).

A região medular localiza-se no centro do linfonodo e caracteriza-se pela grande quantidade de canais linfáticos interconectados denominados seios medulares, possui menos células do que a região cortical, e está constituída principalmente por plasmócitos e macrófagos. Também é possível encontrar linfócitos B localizados difusamente nos cordões medulares e na região de transição córtico-medular (BURKITT *et al.*, 1994).

Os vasos linfáticos aferentes dividem-se em vários ramos fora do linfonodo e depois perfuram a cápsula para drenar no seio subcapsular. A linfa atravessa o linfonodo através dos seios corticais e medulares e deixa o órgão por meio de vasos linfáticos eferentes localizados no hilo. O suprimento sangüíneo do linfonodo é derivado de uma ou mais pequenas artérias que chegam no hilo e ramificam-se na medula, originando extensas redes capilares. A maioria dos linfócitos entra no linfonodo via corrente sangüínea, com uma pequena proporção entrando com a linfa que drena os tecidos. Os linfócitos deixam o leito sangüíneo e entram no estroma nodal através de vasos especializados denominados vênulas de endotélio alto (FU e CHAPLIN, 1999).

3.5.1 – Centros germinativos e memória imunológica

É possível encontrar linfócitos B localizados difusamente nos cordões medulares e na região de transição córtico-medular, enquanto que, na região cortical os linfócitos B apresentam-se agregados em áreas foliculares. Este fato possivelmente está associado à entrada de linfócitos e antígenos através da linfa nesta região induzindo a formação dos CGs (CAMACHO *et al.*, 1998).

Em linfonodos de bezerros, os CGs são observados a partir da primeira semana de vida, e em bovinos adultos saudáveis cerca de 30-70% dos nódulos linfóides apresentam CGs, o que demonstra a alta atividade dos

linfonodos também em animais normais. Em bovinos, os CGs contém depósitos granulares densos de imunoglobulinas e, analogamente a achados em outras espécies, é possível que estes depósitos representem imunocomplexos na superfície das células foliculares dendríticas (FDC) (MORRISON *et al.*, 1986).

Os CGs podem ser subdivididos em duas regiões distintas: a zona clara composta principalmente por células não-linfocíticas, especialmente por FDCs, onde ocorre a hipermutação genética e a zona escura, com uma alta atividade mitótica para geração de linfoblastos (THORBECKE *et al.*, 1994).

Os CGs se desenvolvem em resposta ao estímulo antigênico, e são caracterizados funcionalmente pelas altas taxas de proliferação e seleção de linfócitos B produtores de anticorpos de alta afinidade e geração de linfócitos de memória. A ativação da resposta imune primária ocorre em áreas extrafoliculares. Linfócitos B ativados migram para dentro da rede de FDCs dos folículos primários no período de 2-4 dias após a primeira exposição ao antígeno (MORRISON *et al.*, 1986). As células B ativadas crescem exponencialmente na rede de FDCs. O ciclo celular destas células se completa em um período de 6-7 horas, desta forma, cada três células B blásticas originam entre $10^4 - 1,5 \times 10^4$ células nos CGs considerando-se um período de três dias (LIU *et al.*, 1991).

Os linfócitos T são menos abundantes do que os linfócitos B nos CGs, no entanto, essas células parecem desempenhar papel de fundamental importância na resposta imune nos CGs (GULBRANSON-JUDGE *et al.*, 1997). As células T localizam-se principalmente na zona clara dos CGs (HARDIE *et al.*, 1993). Estudos recentes em camundongos demonstraram atividade proliferativa de células T antígeno-específicas em regiões intrafoliculares nos CGs (ZHENG *et al.*, 1996). Diversos estudos mostraram que a ausência de células T acarreta a não formação dos CGs (LINTON *et al.*, 1992; TSIAGBE *et al.*, 1992; NOSSAL *et al.*, 1993). Os mecanismos de interação entre as células B e T, durante a formação e manutenção dos CGs ainda não foram completamente esclarecidos. Contudo, sabe-se que o epítipo reconhecido por células T durante o processo de ativação

não é, necessariamente, o mesmo que é reconhecido por linfócitos B (FULLER *et al.*, 1993).

Os folículos linfóides primários contêm poucos linfócitos T, sendo que, mediante estimulação antigênica a população de células antígeno-específicas aumenta nos CGs. Em 1996, GULBRANSON-JUDGE e MacLENNAN, demonstraram em camundongos que o número de células T nos CGs atinge valor máximo ao final da primeira semana após a estimulação, e aos dez dias a população destas células é reduzida aos níveis encontrados durante a pré-imunização. Entretanto, a população de células T volta a aumentar durante a resposta imune secundária, sendo que, este aumento é cerca de 10% do observado durante a resposta imune primária. Os autores acreditam que este fato pode estar associado ao reconhecimento antigênico de células T de memória geradas mediante a primeira exposição ao antígeno.

Acredita-se que as funções dos CGs estejam associadas às propriedades das FDCs, já que estas formam uma verdadeira rede celular dentro dos CGs. Estas células possuem receptores para a região Fc de imunoglobulinas da classe G e para o fator C3 do complemento, não apresentam atividade fagocítica e não expressam níveis detectáveis de MHCII. De acordo com estudos em roedores, o antígeno liga-se à superfície da FDC sob a forma de imunocomplexo antígeno-anticorpo, provavelmente ligando-se a receptores para C3, e podem permanecer retidos no CG durante vários meses (KELSOE, 1995).

A diferenciação e sobrevivência dos linfócitos B nos CGs são dependentes da estimulação antigênica, da interação com FDCs, de fatores solúveis produzidos por estas células, da interação entre células B e T envolvendo principalmente sinalização através de CD40-CD40L e da produção de citocinas incluindo a IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (HOLLOWOOD e GOODLAD, 1998).

Durante a formação dos CGs, as células B podem seguir vários caminhos: viver ou morrer e diferenciar-se em células terminais ou células B de memória. Alterações na afinidade dos receptores antigênicos de linfócitos B,

através da hipermutação de genes que codificam a região IgV_H das imunoglobulinas, levam a uma seleção positiva ou negativa. As células selecionadas positivamente podem diferenciar-se em plasmócitos ou células de memória. A produção de anticorpos específicos que neutralizam o antígeno é função dos plasmócitos, enquanto que as células de memória devido ao contato prévio com o antígeno são capazes de elicitar uma resposta secundária mais rápida, intensa e qualitativamente distinta da resposta imune primária (LIU *et al.*, 1997).

Muitas questões sobre as células de memória permanecem sem resposta. Por exemplo, ainda não se sabe que sinal é responsável pela diferenciação de uma pequena parcela dos linfócitos ativados antígenoicamente em células de memória; ou quais os mecanismos responsáveis pela sobrevivência por longos períodos dos linfócitos de memória, aparentemente na ausência do antígeno (LIU *et al.*, 1997).

Aproximadamente 95% das células que fazem parte da resposta imune são eliminadas rapidamente através do processo de morte celular programada ou apoptose, o qual pode ser induzido por uma grande variedade de sinais. A eliminação de linfócitos B e T, expandidos clonalmente durante a resposta imune adaptativa, é conhecida como morte celular induzida por ativação (AICD) (KELSOE, 1995).

Fatores que previnem o processo de AICD ou que atuam na sobrevivência celular, possivelmente contribuem também para o desenvolvimento da memória imunológica. Existem algumas evidências mostrando que as citocinas que agem via cadeia- γ do receptor para IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) induzem genes anti-apoptóticos (*bcl-2* e o *bcl-X_L*) a expressar determinadas proteínas que podem contribuir para a sobrevivência celular (KIRBERG *et al.*, 1993).

Linfócitos T periféricos recém-ativados são resistentes a AICD. Entretanto, este processo pode ser revertido resultando no declínio da resposta imune e na eliminação de clones auto-reativos. Apenas um pequeno número de

linfócitos T sobrevive como células de memória. O processo de AICD em linfócitos T pode ser induzido diretamente pela ligação do antígeno ao receptor TCR ou pela interação Fas/FasL (SCAFFIDI *et al.*, 1999).

Os estudos sobre AICD constituem um importante modelo para a obtenção de informações sobre a regulação da resposta imune celular e proteção (memória imunológica) induzida por imunógenos.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Animais utilizados no experimento

Foram selecionados quatro bovinos adultos *Bos taurus taurus*, sexo masculino, com 24 meses de idade, da raça Jersey, com sorologia negativa para *Babesia bovis* e parasitologicamente negativos. Estes animais foram mantidos em isolamento a prova de artrópodes desde o primeiro mês de idade, pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária/Departamento de Veterinária (LBCH/BIOAGRO/DVT) da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

Os bovinos receberam ração balanceada, com 20% de proteína e quantidade definida de volumoso, oferecida às 7:00 e às 15:00 horas, e água *ad libitum*.

4.2 – Esquema de inoculação

Dos quatro animais selecionados, três (bovinos 1, 2 e 3) foram utilizados para inoculação experimental com amostra atenuada de *B. bovis* (Bbo

UFV-1) 26^o passagem (grupo vacinal) e o quarto animal (bovino 4) foi utilizado como controle negativo.

Cada animal do grupo vacinal foi inoculado, por via intravenosa, com $1,0 \times 10^6$ parasitas atenuados. Foram feitas duas inoculações, sendo a primeira no dia um e a segunda no trigésimo dia.

O animal controle negativo recebeu 1ml de água milliQ por via intravenosa, seguindo o mesmo cronograma de inoculação do grupo vacinal.

Exames clínicos dos animais para observar possíveis sinais de manifestação da babesiose eram realizados diariamente, durante os 45 dias do experimento.

4.3 – Coleta dos linfonodos

Com a finalidade de avaliar a resposta imune *in vivo* dos animais realizaram-se biópsias de linfonodos superficiais (pré-escapular esquerdo e direito).

As coletas dos linfonodos foram realizadas aos 3, 6, 9 e 12 dias pós-inoculação e nos dias 3 e 6 após re-inoculação de acordo com quadro 1. Para a realização da biópsia, os animais foram previamente tricotomizados e mantidos em jejum durante 12 horas antes das cirurgias. A sedação foi feita com xilazina (Rompum®) e anestesia local com 10ml de lidocaína. Após a retirada total do linfonodo e sutura da pele foi feito uso de solução de pentabiótico (Penfort®), por via intramuscular.

Quadro 1 – Cronograma de coleta de linfonodos pré-escapulares em bovinos.

Data	Linfonodo	Bovino
3	Pré-escapular esquerdo	1
6	Pré-escapular esquerdo	2
9	Pré-escapular esquerdo	3
12	Pré-escapular direito e esquerdo *	1 e 4*
33	Pré-escapular direito	2
36	Pré-escapular direito	3

* Bovino 4 – controle negativo

4.4 – Histopatologia dos linfonodos bovinos

Os fragmentos de linfonodos foram fixados, durante 48 horas, em formol tamponado pH 7,2. Após fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções alcólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 24 horas em cada solução alcoólica. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (PROPHET *et al.*, 1992).

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

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600¹.

¹ Microscópio Óptico – Eclipse E600 – Nikon – Japan

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

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

Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4. Em seguida, cobriram-se os cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubaram-se em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro e sem deixar secar os cortes colocou-se anticorpo primário específico (IgG de coelho anti-*Babesia bovis*), produzido pelo LBCH, diluído 1:20 em PBS pH 7,4; os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), produzidos pelo LBCH, diluído 1:10 em PBS 7,4. Após incubação em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C, os cortes foram lavados três vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 e posteriormente cobertos com o complexo PAP produzido em coelho (SIGMA®), diluído 1:200 de acordo com especificação do fabricante, e imediatamente incubados em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C. Lavaram-se os cortes novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e imediatamente foram colocados em solução reveladora recém preparada [25mg de diaminobenzidina (DAB), 200µl de H₂O₂ 30 volumes em 100ml de PBS pH

7,4] durante 5 minutos. Finalmente, lavaram-se os cortes durante 5 minutos em PBS pH 7,4 e contra corou-se com Hematoxilina de Harris 1:10 em PBS pH 7,4 durante 20 segundos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan entre lâmina e lamínula.

4.6 – Hibridização *in situ* para detecção de apoptose pela técnica de TUNEL em linfonodos bovinos

Para detecção de apoptose nos cortes histológicos de linfonodos bovinos empregou-se kit de Detecção de Morte Celular *in situ*, POD (Boehringer Mannheim®) que utiliza a técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick and labeling*).

Após desparafinização e hidratação dos cortes, de acordo com protocolo descrito no item 4.5 as lâminas foram transferidas para PBS pH 7,4 onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida, incubaram-se os cortes durante 20 minutos a 37°C com proteinase K (20µg/ml em Tris/HCl 10mM, pH 7,4), posteriormente foram lavados duas vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada e fez-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio metanólico 0,3% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Os cortes foram novamente lavados e as células permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% durante dois minutos; as lâminas sendo colocadas sobre gelo. Em seguida, lavaram-se duas vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada. Os cortes foram enxugados levemente e cobertos com 50µl da mistura TUNEL (5µl da enzima terminal desoxirribonucleotidil transferase e 45µl de nucleotídeos marcados com fluoresceína), cobriu-se com lamínula para propiciar uma reação homogênea e evitar evaporação. Após incubação durante 60 minutos em câmara úmida a 37°C, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada lavagem e adicionou-se 50µl de *Converter-POD* (anticorpo anti-fluoresceína

conjugado com peroxidase) sobre cada corte, que foram imediatamente cobertos com lamínula. Incubou-se em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e repetiram-se as lavagens.

A revelação foi feita com solução de DAB (20mg de DAB em 20ml de Tris 0,1M pH 7,4 e 20µl de H₂O₂ 30 volumes), durante 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida sendo lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada e contracorados com Hematoxilina de Harris 1:10 durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan® entre lâmina e lamínula.

4.7 – Coleta de sangue para obtenção de soro

Coletou-se sangue dos animais para obtenção de soro, de acordo com o seguinte cronograma: um dia anterior à inoculação (dia zero), ao 12°, 25°, 30°, 37° e 45° dia após a primeira inoculação. A coleta realizada no trigésimo dia se deu antes da re-inoculação da amostra atenuada de *B. bovis*.

O sangue foi coletado através da punção jugular em frascos coletores de 5ml (Venoject®), sem anticoagulante e foi mantido em repouso durante toda à noite à temperatura ambiente. Na manhã seguinte retirou-se o coágulo e centrifugaram-se as amostras a 300g durante 5 minutos. O soro obtido de cada amostra foi, então, recolhido com pipeta de Pasteur e aliqüotado em tubos tipo *Eppendorf* e armazenados a -20°C.

4.7.1 – Teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia bovis*

Realizou-se teste imunoenzimático-ELISA, seguindo-se protocolo de rotina do LBCH, para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia bovis* no soro de

animais coletado no dia zero, 12 dias pós-inoculação e sete dias pós-reinoculação. Os testes foram feitos em triplicatas.

As placas de ELISA Hemobag^{®2} foram sensibilizadas à 4°C durante 18 horas com antígeno de *B. bovis* (5µg/well) produzido pelo LBCH e diluído em Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159g de Na₂CO₃; 0,293g de NaHCO₃ e água destilada q.s.p. 100ml). Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0g de cloreto de sódio; 500µl de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1000ml), e procedeu-se a um bloqueio com solução de caseína 2% em PBS pH 7,6 (8,5g de NaCl; 1,28g de Na₂HPO₄; 0,16g de NaH₂PO₄.2H₂O e água destilada q.s.p. 1000ml) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Repetiram-se as lavagens e adicionaram-se os soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em Tampão de Incubação (100ml de PBS pH 7,6; caseína 0,25% e Tween 20 0,05%). Após incubação de 2 horas a temperatura ambiente as placas foram lavadas 6 vezes com Tampão de Lavagem e, em seguida adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (IgG de coelho anti-IgG bovina - peroxidase) diluído 1:20000 (SIGMA) em Tampão de Incubação. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por um período de 2 horas.

Realizaram-se mais 6 lavagens das placas com Tampão de Lavagem. Para a revelação do teste, adicionou-se o substrato, composto de uma solução contendo 4mg de OPD (θ - fenildiaminobenzeno), 2,5µl de H₂O₂ e 20ml de Tampão de Substrato pH 5,0 (7,19g de Na₂HPO₄; 5,19g de ácido cítrico e água destilada q.s.p. 1000ml) e incubou-se na ausência de luz durante 20 minutos. A

² Placas de ELISA de 96 wells – Hemobag Produtos Cirúrgicos Ltda. - SP

reação foi interrompida com 30µl de ácido sulfúrico 1:20 e, em seguida a placa foi lida em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492nm (Titertek Multiskan® PLUS).

4.7.2 – Teste de ELISA para detecção de IgG1 e IgG2 bovina

A cinética da produção de IgG1 e IgG2 em bovinos inoculados com amostra atenuada e no animal controle negativo foi avaliada através de teste de ELISA desenvolvido pela BETHYL Laboratories®, de acordo com metodologia recomendada pelo fabricante. Os testes foram realizados em triplicatas, sempre utilizando-se soros do bovino negativo e do grupo vacinal, para cada data de coleta.

As placas de ELISA MaxSorp Nunc®³ foram sensibilizadas com anticorpo de cobertura de ovelha anti-IgG1 ou anti-IgG2 bovina diluído 1:100 em Tampão de Cobertura pH 9,6 (0,53g de Na₂CO₃ e H₂O destilada q.s.p. 100ml), o tempo de adsorção foi de 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (6,055g de Tris; 8,18g de NaCl; 500µl de Tween 20 e H₂O destilada q.s.p. 1000ml) e bloqueadas com solução de bloqueio (idem ao Tampão de Lavagem) durante 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e os soros dos animais do experimento foram adicionados diluídos 1:40000 em Tampão de Diluição (idem ao Tampão de Lavagem) e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente.

Realizaram-se mais duas lavagens e, em seguida, adicionou-se o conjugado (ovelha anti-IgG1 ou IgG2 bovina conjugado com peroxidase) diluído

³ Placas de ELISA de 96 wells Nunclon MaxiSorp - USA

em Tampão de Diluição 1:50000 e 1:75000, respectivamente. Após incubação de 60 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lavadas mais três vezes e incubadas por um período de 30 minutos na ausência de luz com Solução Reveladora contendo 4mg de O.P.D (θ -fenildiaminobenzeno), 2,4 μ l de H₂O₂ e 20ml de Tampão de Substrato pH 5,0. Finalmente, a reação foi bloqueada com 30 μ l de H₂SO₄ 3M e as placas foram lidas em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492nm (Titertek Multiskan® PLUS).

4.8 – Isolamento de células mononucleares de sangue periférico

Coletou-se sangue assepticamente em frascos coletores de 5ml com vácuo e solução de anticoagulante (EDTA) através de punção jugular, totalizando 20ml/bovino. A coleta de sangue obedeceu ao seguinte cronograma: dia zero, 3°, 6°, 9° e 12° dia pós-inoculação e aos 3°, 6° e 9° dia pós-reinoculação.

Imediatamente após a coleta, o material foi mantido em gelo até o momento do isolamento das células. Adotou-se o método de separação por gradiente de densidade celular utilizando-se Ficoll-Paque (BROWN *et al.*, 1991). Verteram-se cuidadosamente e em condições de esterelidade 5ml de sangue sobre 3ml de Ficoll-Paque em tubos de centrifuga de 15ml estéreis. O material foi centrifugado a 300g por um período de 30 minutos a 4°C.

Retirou-se cuidadosamente a interface esbranquiçada contendo células mononucleares periféricas, sendo em sua grande maioria linfócitos, e transferiu-se para novos tubos de centrifuga de 15ml contendo Solução Balanceada de Sais de Hank – HBSS pH 7,2 (0,4g de KCl; 0,06g de KH₂PO₄; 8,0g de NaCl; 0,35g de NaHCO₃; 0,048g de Na₂HPO₄; 1,0g de D-glucose; 0,01g de vermelho de fenol e água milliQ q.s.p. 1000ml) suficiente para um volume final equivalente a 10ml. As células foram lavadas 3 vezes por centrifugação com HBSS pH 7,2 a 300g durante 5 minutos cada à 4°C, sendo o sobrenadante descartado após cada lavagem. Ressuspendeu-se o pellet celular em 1ml de HBSS

pH 7,2 e 3ml de Acetato Tris-Amônia (ACK) pH 7,2 (0,75g de NH_4Cl ; 0,23g de Tris e água MilliQ q.s.p. 100ml) com a finalidade de hemolisar as hemácias restantes, centrifugou-se a 300g durante 5 minutos a 4°C.

Após descarte do sobrenadante as células foram lavadas novamente 3 vezes por um período de 10 minutos cada com HBSS e o pellet celular ressuspenso em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - SIGMA) suplementado com D-glucose (4,0g/l), ácido fólico (6mg/l), L-arginina (116mg/l), L-asparagina (36mg/l), HEPES (2,38g/l), NaHCO_3 (2,0g/l), solução antibiótica e antimicótica 100X SIGMA® (10ml/l). Antes do uso o meio de cultivo foi acrescido com 10% de Soro Fetal Bovino, L-glutamina 2mM e 2-mercaptoetanol (50 μ M).

4.9 – Desenho dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos utilizados no experimento, baseados na estrutura da proteína RAP-1, foram sintetizados de acordo com técnica descrita por Merrifield em 1963. A escolha desses peptídeos dentro da estrutura íntegra da proteína foi feita a partir de estudos preliminares realizados no LBCH utilizando-se de peptídeos sintéticos para identificação de epitopos indutores de linfócitos T e B através da estimulação *ex vivo* de células mononucleares de sangue periférico (PATARROYO, *et al.* 1999). A partir desses resultados fez-se a hibridização de dois peptídeos sintéticos, o 5081 e o 5084, que deram origem ao peptídeo 23290.

A construção dos peptídeos sintéticos foi baseada em estudos computacionais de sítios imunogênicos da proteína RAP-1, de acordo com suas propriedades antigênicas (HOOP e WOODS, 1981); potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU e FASMAN, 1978); hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (KYTE e DOOLITTLE, 1982). As três seqüências aminoacídicas foram desenhadas no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa e sintetizadas no “Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios” em

Bogotá, Colômbia. A metodologia adotada foi a *Good Manufacture Proceeding* (GMP).

4.10 – Estimulação *ex vivo* de células mononucleares periféricas com peptídeos sintéticos

As células sangüíneas mononucleares periféricas foram estimuladas *ex vivo* com os peptídeos sintéticos 5081, 5084 e 23290 para avaliação da capacidade imunogênica dos mesmos através da produção e secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-12.

Com a finalidade de promover a adaptação às condições de cultivo *ex vivo* as células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por um período de 18 horas precedentes ao estímulo. Após este período as células foram lavadas, contadas e semeadas em placas de cultivo celular de 24 wells NUNCLON™ a uma densidade de 2,0 x 10⁶ células em 2,0ml de meio de cultivo DMEM completo. O estímulo foi feito em duplicatas, sendo que, as células provenientes de cada coleta sangüínea foram estimuladas com os peptídeos sintéticos 5081, 5084 e 23290 (2 μ g/ml). Foram feitos controles celulares negativos e positivos, sendo que, o controle negativo não recebeu nenhum estímulo e o controle positivo foi estimulado com 12,5 μ g/ml de Concanavalina A (SIGMA).

O sobrenadante de cultivo celular foi recolhido ao 3° e ao 5° dia após a estimulação *ex vivo* com os peptídeos sintéticos, aliqüotados em tubos do tipo *Eppendorf* e armazenados a -70°C até o momento do uso.

4.11 – Dosagem de IFN- γ , TNF- α e IL-12 a partir de sobrenadante de cultivo de PBMC através do teste de ELISA

Através de metodologia adotada no Laboratório de Imunoparasitologia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, dosaram-se os níveis de citocinas produzidas e secretadas em sobrenadante de cultivo de PBMC através de teste de ELISA (AFONSO e SCOTT, 1993). Todos os anticorpos monoclonais e reagentes utilizados no teste foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia – UFOP.

As placas de ELISA Falcon® foram sensibilizadas durante 18 horas a 4°C com os anticorpos monoclonais de captura B133.1 (5 μ g/ml), B154.9.2 (50 μ g/ml) e C11.79 (10 μ g/ml), específicos para IFN- γ , TNF- α e IL-12 (p40) humanas respectivamente, diluídos em Tampão de Cobertura pH 9,6 (1,7g de NaCO₃; 2,86g de NaHCO₃ e água milliQ q.s.p. 1000ml acrescida de azida sódica 4mM). Após sensibilização fez-se o bloqueio com PBS acrescido de soro fetal bovino 5% durante 30 minutos a 37°C. Lavaram-se as placas cinco vezes com Solução de Lavagem (salina e Tween 0,05%) adicionaram-se os sobrenadantes íntegros, sendo em seguida incubados a 37°C durante 2 horas.

Após nova lavagem adicionaram-se os anticorpos biotinizados B133-5 (1:1500), B154.7.1 (1:2000) e C8.6.2 (1:2000), específicos para IFN- γ , TNF- α e IL-12 humanos, respectivamente. Transcorrida 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas para posterior adição de estreptoavidina-peroxidase (Zymed Laboratories) diluída 1:3000 e incubadas por um período de 60 minutos a 37°C.

Finalmente, as placas foram lavadas dez vezes e incubadas com 5mg de 2,2'-Azino-bis(3-etilbentiazoline-6-ácido sulfônico) [(ABTS) SIGMA] em 10ml de Tampão Fosfato Citrato pH 4,0 acrescido de 5 μ l de H₂O₂ 30%. Utilizou-se Sulfato de Sódio Lauril 1% (SDS) para bloquear a reação. As placas

foram lidas a 405nm em leitor de microplacas (BIO-RAD⁴) e os dados quantificados pelo programa Microplate Manager BIO-RAD. Os limites inferiores de detecção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 foram 19,5pg/ml, 1,5pg/ml e 19,5pg/ml, respectivamente.

Para a dosagem das citocinas foram utilizadas, como padrões, moléculas recombinantes obtidas da R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA.

4.12 – Análise estatística

Para comparação da homogeneidade das matrizes de variância/co-variância, um dos pressupostos para a análise aqui referida, utilizou-se o teste não-paramétrico de Sen e Puri. Visto que, o teste anterior foi não-significativo para todas as variáveis testadas aplicou-se o método de Análise de Medidas Repetidas dada às condições de padronização do presente experimento.

Tal método permitiu testar o efeito da data de coleta de sangue, do tempo de coleta do sobrenadante, assim como, do tratamento aplicado *ex vivo* em PBMCs sobre a produção de citocinas, sendo que o resultado foi aceito como extremamente significativo a um nível de significância de $p < 0,05$. E para dar consistência ao experimento aplicou-se o Teste de Tukey para comparação de médias e o resultado foi aceito como estatisticamente significativo a um nível de significância de $p < 0,05$. Os dados experimentais foram analisados no programa Statistica versão 5.0.

⁴ Leitor de microplacas BIO-RAD – mod. 450

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Avaliação sorológica para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia bovis*

Os resultados obtidos nos testes de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*B. bovis* encontram-se expostos no Quadro 2. Como pode ser observado, a técnica de ELISA empregada no experimento foi eficaz em identificar os anticorpos específicos contra *B. bovis*.

Segundo os dados de absorvância óptica, os animais apresentaram-se sorologicamente negativos para *B. bovis* no período da pré-inoculação da amostra atenuada, assim como, aos doze dias após a primeira inoculação. Altos níveis de anticorpos antígeno-específicos foram detectados aos sete dias após a segunda exposição ao antígeno, caracterizando os bovinos sorologicamente positivos à *B. bovis*, com exceção do bovino utilizado como controle negativo (4). O soro controle negativo utilizado no teste de ELISA pertence a animal negativo de referência utilizado no LBCH. Resultados similares foram obtidos em estudos de avaliação da resposta imune induzida contra antígenos de *A. marginale* realizados por BROWN *et al.* (1998b).

GOFF *et al.* (1998), pesquisando anticorpos em soro de animais estimulados com amostra virulenta de *B. bovis* reportaram reatividade positiva já a partir do 6º dia pós-inoculação. O aumento dos títulos de anticorpos antígeno-

Quadro 2 - Médias da absorvância óptica (492nm) em teste de ELISA. Detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis* em soro de bovinos inoculados com amostra atenuada. Os números representam as médias das absorvâncias e os desvios padrões das amostras de soro coletadas no dia 0, 12 e 37 após a primeira inoculação, sendo que, cada amostra foi avaliada em triplicata. Os bovinos foram inoculados no dia 0 e no dia 30. O ponto de corte do soro controle negativo é 0,763 (D.P. = 0,003).

Amostras	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4
Pré-inoculação				
Média ABS	0,701	0,626	0,620	0,670
Desvio Padrão	0,042	0,028	0,016	0,043
Coleta 12° dia				
Média ABS	0,636	0,605	0,578	0,684
Desvio Padrão	0,005	0,001	0,011	0,009
Coleta 37° dia				
Média ABS	1,567	1,675	0,912	0,674
Desvio Padrão	0,009	0,021	0,028	0,009

específicos mais precoces mediante estimulação com amostra virulenta pode ser explicado pela maior agressividade, visto que, amostras virulentas induzem uma resposta imune mais intensa quando comparadas às amostras atenuadas. Além disto, os mecanismos de atenuação acarretam uma diminuição desejada da antigenicidade da amostra o que leva a estimulação menos intensa do sistema imune do hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2000).

Além de se tratar de uma amostra atenuada, o fato de que aos doze dias após a primeira exposição ao antígeno os animais apresentavam-se sorologicamente negativos, provavelmente também está associado a uma resposta imune do tipo primária, caracteristicamente mais lenta e menos intensa, com uma baixa ou indetectável produção de imunoglobulinas da classe G pelos linfócitos B reativos à *B. bovis*. Ao contrário, a resposta imune secundária é mais rápida, duradoura e caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos antígeno-específicos (TIZARD, 2000), como pode ser observada com a elevação dos títulos de anticorpos após a segunda inoculação.

5.2 – Cinética de secreção de IgG1 e IgG2 em soro de bovinos inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*

Os testes de ELISA realizados seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (BETHYL Laboratories) permitiram o acompanhamento da cinética de produção de IgG1 e IgG2 em soro de bovinos inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*, assim como, do animal controle negativo de acordo com os resultados expostos nas Figuras 1a, b.

O estudo da cinética da produção de IgG1 e IgG2 constitui-se em uma valiosa ferramenta para avaliação da resposta imune protetora contra a *B. bovis*, visto que, estas imunoglobulinas são importantes no controle da infecção devido a sua capacidade opsonizante, além de proteger o animal por longos períodos após o contato com o parasita (BROWN e PALMER, 1999).

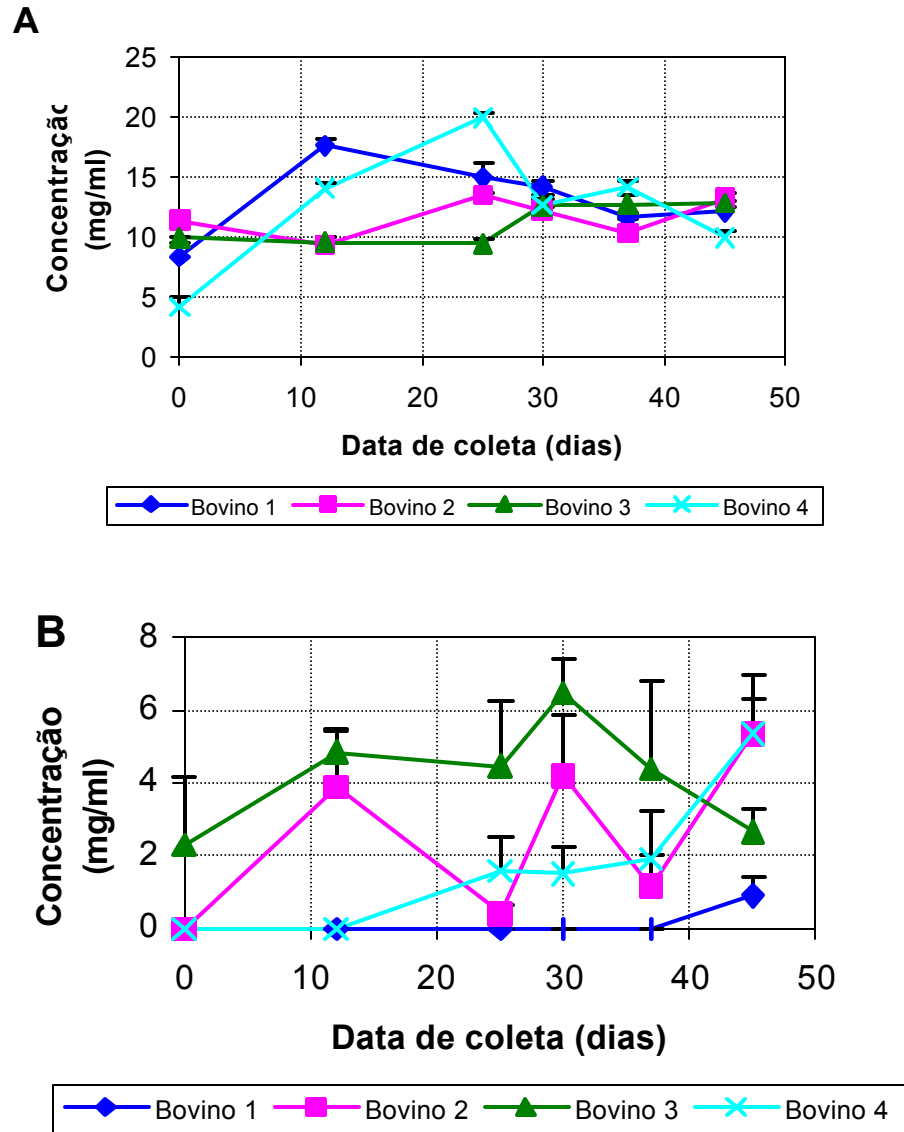


Figura 1 – Cinética de produção de IgG1 e IgG2 em bovinos imunizados com amostra atenuada de *Babesia bovis* e no bovino controle negativo. **A.** Dosagem de IgG1 bovina. **B.** Dosagem de IgG2 bovina. As barras verticais indicam os desvios padrões.

Neste estudo os níveis de IgG1 apresentam-se aumentados no soro do bovino 1 após a primeira inoculação, enquanto que, no animal 3 os níveis de IgG1 permaneceram estáveis até o 25º dia após à primeira exposição ao antígeno, tendo aumentado a partir do 30º dia. O soro do bovino 2 apresentou ligeira queda no nível de IgG1 na primeira coleta pós-vacinal, aumentando ao 25º dia, declinando até o 37º dia e voltando a aumentar 15 dias após a re-inoculação. Curiosamente o animal controle (4) teve a produção de IgG1 aumentada durante o experimento, podendo representar uma resposta inespecífica, visto que, este animal apresentou-se sorologicamente negativo à *B. bovis* durante todo o experimento. A partir da quarta semana observou-se uma maior uniformidade entre os níveis de IgG1 presente no soro. Os níveis de IgG1 permaneceram elevados até a última data de coleta de soro do experimento (Figura 1a).

Ainda que não tenha sido objetivo deste trabalho traçar o perfil das citocinas presentes no soro dos animais, as altas concentrações de IgG1, podem estar relacionadas com a produção de níveis de IL-4, suficientes para estimular a elevação da produção desta imunoglobulina, principalmente pelos animais 1 e 4. Segundo BROWN *et al.* (1999), discutindo o papel das citocinas na infecção por hematozoários, afirmam que a IL-4 induz o aumento da produção de IgG1 pelas células B reativas.

Como pode ser observado na Figura 1b, os maiores níveis de IgG2 foram produzidos pelos animais 2 e 3 após a primeira inoculação. O aumento da produção de IgG2 após 12 dias da primeira inoculação foi superior à secreção de IgG1 nos bovinos 2 e 3, embora as concentrações absolutas de IgG2 nos animais 2 (0 – 3,9mg/ml) e 3 (2,3 – 4,8mg/ml) sejam menores do que IgG1 (11,4 – 9,3mg/ml) e (9,9 – 9,6mg/ml). A produção de IgG2 pelo bovino 3 atingiu o pico de reatividade (6,45mg/ml) no 30º dia pós-vacinal, declinando nas coletas subsequentes. O soro do animal 1 apresentou os menores níveis de IgG2, sendo detectada apenas no 45º dia pós-inoculação, contrariamente aos altos níveis detectados de IgG1. Já o soro do bovino 4 apresentou uma elevação nos níveis de

IgG2 a partir do 25º dia pós-vacinal tendo um pico de reatividade no 45º dia de coleta, quando os níveis detectados de IgG1 neste animal declinavam.

BROWN e PALMER (1999), quando postulam os mecanismos de proteção contra *B. bovis*, afirmam que o IFN- γ atua estimulando a produção de IgG2. O rápido aumento nas concentrações de IgG2 e os níveis mais baixos de IgG1 detectados nos animais 2 e 3 sugerem uma maior produção de IFN- γ *in vivo* quando comparados ao animal 1. Esses mesmos autores demonstraram através de estudos *in vitro*, que linfócitos T CD4+ antígeno-específicos são essenciais na indução da produção de IgG1 e IgG2 por linfócitos B. Desta forma, os níveis aumentados tanto de IgG1 quanto de IgG2 no presente experimento, indicam que houve ativação e seleção clonal de células T CD4+ específicas contra antígenos de *B. bovis*, as quais mediarão a produção e secreção de imunoglobulinas por células B.

No presente estudo os resultados de IgG1 e IgG2 foram interpretados considerando-se cada animal individualmente, no sentido, de se avaliar a cinética de produção e secreção de IgG1 e IgG2 para cada bovino utilizado. Embora os bovinos sejam puros e de uma mesma raça, não se tratam de animais isogênicos e as respostas verificadas não foram uniformes, havendo variação de um animal para o outro. Esta variação na resposta pode ser explicada provavelmente, pela característica polimórfica dos genes que codificam as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). O MHC é fundamental na apresentação de antígenos por parte de células apresentadoras de antígeno (APC), na comunicação bioquímica entre as células do sistema imune e para o reconhecimento de antígenos próprios e não-próprios (KLEIN *et al.*, 1993; HUGHES e YAGER, 1998). Embora pouco estudado em bovinos, o entendimento da apresentação das porções peptídicas pelo MHC é de fundamental importância na montagem da resposta imune, visto que, exerce influência direta na apresentação de epítomos às células T CD4+.

5.3 – Avaliação da produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por células mononucleares sanguíneas periféricas após estímulo *ex vivo*

Os sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados após três e cinco dias de estímulo *ex vivo* com os peptídeos sintéticos e com a Concanavalina A, foram quantificados pela técnica previamente descrita.

A escolha da técnica para quantificação de citocinas secretadas em sobrenadante de cultivo se deu principalmente, pela boa sensibilidade e especificidade dessa técnica, aliada ao baixo custo e a praticidade. Devido à carência de reagentes específicos para bovinos se fez necessária à busca por metodologias alternativas, sendo adotado no presente experimento o uso de anticorpos específicos para citocinas humanas.

As similaridades entre o perfil das respostas imunes do tipo Th1 e Th2 entre humanos e bovinos vêm corroborar na aplicação em bovinos de técnicas destinadas a modelos humanos (BROWN *et al.*, 1998a). Neste experimento, a aplicação de técnicas destinadas a modelos murinos foi descartada devido às discrepâncias nos mecanismos de regulação da resposta imune do tipo Th1 e Th2 entre murinos e bovinos. A IL-4 em camundongos, por exemplo, caracteriza uma resposta do tipo Th2 e inibe a produção de citocinas do tipo Th1 (MOSMANN *et al.*, 1986; FIORENTINO *et al.*, 1989), enquanto que, em humanos e bovinos o efeito inibidor da IL-4 sobre citocinas Th1 ainda é controverso, além desta citocina ser produzida por clones celulares bovinos dos tipos Th0, Th1 e Th2 (BROWN *et al.*, 1999).

Sabe-se ainda que algumas citocinas bovinas apresentam alta identidade de aminoácidos com homólogos humanos, como é o caso da IL-12, cujas subunidades p35 e p40 possuem 82 e 84% de homologia, respectivamente, enquanto que entre camundongos e bovinos a taxa de identidade é de 59 e 68% (COLLINS *et al.*, 1999). Embora ainda não se tenha identificado a sequência de aminoácidos de ligação da IL-12 com o seu receptor, foram identificados cinco

resíduos de aminoácidos localizados na subunidade p35, os quais acredita-se estarem relacionados com a especificidade da IL-12 (ZOU *et al.*, 1995). Destes cinco resíduos de aminoácidos, quatro são idênticos entre humanos e bovinos, enquanto que entre bovinos e camundongos existe identidade em apenas um resíduo amnoacídico (COLLINS *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos neste experimento demonstram que a técnica de ELISA empregada foi eficaz em dosar as citocinas bovinas por meio de anticorpos específicos anti-citocinas humanas. Estes dados vêm corroborar com estudos previamente realizados pelo LBCH/UFV e pelo Laboratório de Imunoparasitologia/UFOP para testar o reconhecimento de IFN- γ bovino sérico (1700pg/ml) por anticorpos com especificidade humana.

Em alguns trabalhos realizados em bovinos para acompanhamento da resposta imune induzida por antígenos de outros hemoparasitas, tais como: *A. marginale* e *B. bigemina*, também se observou falta de uniformidade na produção e secreção de citocinas entre os animais experimentais e clones celulares (GALE *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1998b; BROWN, *et al.*, 1999).

A produção das citocinas analisadas não apresentou um padrão uniforme entre os animais estudados. Este fato possivelmente está relacionado ao polimorfismo genético das moléculas do MHC, o que leva a ativação de clones diversificados de linfócitos T CD4⁺ conferindo um perfil de produção de citocinas variável (ABBAS *et al.*, 2000).

O estudo da cinética de produção e secreção do IFN- γ , TNF- α e IL-12, mediante estimulação *ex vivo* com os peptídeos sintéticos 5081, 5084 e 23290, revelou níveis mais elevados destas citocinas em PBMCs coletados nos primeiros nove dias pós-inoculação da amostra atenuada de *B. bovis*, normalmente, declinando após a re-inoculação. No caso da primo-infecção por *B. bovis* sabe-se que os mecanismos de controle e de proteção imunológica envolvem tanto a resposta inata quanto a adaptativa (BROWN e PALMER, 1999). Os nossos achados vêm reforçar a hipótese de que citocinas pró-

inflamatórias, assim como, àquelas envolvidas na resposta imune adaptativa do tipo Th1 contra hemoparasitas intracelulares obrigatórios são importantes no controle da infecção em um estágio mais precoce (TAYLOR-ROBINSON, 1995).

O declínio nos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12 observado 12 dias após a primeira exposição ao antígeno pode estar relacionado a um aumento na produção de citocinas que caracterizam a resposta Th2, do tipo humoral, como por exemplo, a IL-4, IL-5 e IL-10. Entretanto, o papel das citocinas do tipo Th2 não está bem definido em bovinos, sabe-se que alguns clones de linfócitos do tipo Th1 são inibidos pela adição de IL-4 ou IL-10 exógena (BROWN *et al.*, 1998b; COLLINS *et al.*, 1999).

As citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ são necessárias tanto para a diferenciação de linfócitos B que venham produzir imunoglobulinas de alta afinidade, assim como, para a ativação de macrófagos (BROWN e PALMER, 1999). Através da produção de IFN- γ , células T CD4⁺ ativam macrófagos, que por sua vez aumentam a taxa de fagocitose e a secreção de substâncias tóxicas à *B. bovis*, tal como, o óxido nítrico (COURT *et al.*, 2001). Neste trabalho os altos níveis de TNF- α e IFN- γ detectados *ex vivo*, quando PBMCs foram estimuladas com os peptídeos sintéticos 5084 e 23290, possivelmente atuaram induzindo a ativação dos macrófagos ou outras APCs.

Os animais do presente estudo foram inoculados com amostra atenuada de *B. bovis* e as PBMCs re-estimuladas *ex vivo* com peptídeos sintéticos construídos a partir da estrutura íntegra da proteína RAP-1 de *B. bovis*, com a finalidade de avaliar a memória imunológica induzida *in vivo*.

Não foi possível avaliar a produção de IL-12 por PBMCs provenientes do animal 1 por insuficiência de sobrenadante de cultivo, neste animal priorizou-se a detecção de IFN- γ e TNF- α . As células dos animais 2 e 4 produziram baixas quantidades de IL-12 após três dias de estímulo *ex vivo* (Figuras 2 e 3), sendo que, PBMCs do bovino 2, apresentaram um pico de produção de 325pg/ml referente a coleta de nove dias pós-inoculação quando

estimulado *ex vivo* com o peptídeo sintético 5084 (Figura 3a). Entretanto, níveis mais elevados de IL-12 foram detectados após cinco dias de estímulo para o bovino 2. A cinética de produção de IL-12 foi similar entre os peptídeos 5084 e 23290, embora as concentrações tenham sido maiores quando as células foram estimuladas com o 23290. Houve uma queda abrupta de produção referente à coleta dos 12 dias e voltando a aumentar no 33º dia (Figura 3b). A avaliação do sobrenadante de cultivo de células do animal 3 revelou altos níveis de IL-12, principalmente quando estimuladas pelos peptídeos 5084 e 23290 após três dias de cultivo, chegando a produzir 1,3 ng/ml de IL-12 ao 9º dia pós-inoculação. Observou-se aumento pós-vacinal nos níveis de IL-12 para todos os tratamentos aplicados, seguido de queda até atingir níveis não mais detectáveis ao 36º dia (Figura 4a).

A produção e secreção de IL-12 quando comparada após 3 ou 5 dias de estímulo *ex vivo* apresentou padrões distintos entre os animais. As PBMCs do bovino 4 não produziram níveis detectáveis de IL-12 após cinco dias em cultura, da mesma forma, as PBMCs do animal 3 não produziram níveis detectáveis de IL-12 quando estimuladas com os peptídeos sintéticos e com a ConA após cinco dias de estímulo, mostrando um único ponto detectável, referente a coleta de sangue do 6º dia pós-inoculação e na ausência do fator estimulante (Figura 4b).

A produção de TNF- α pelas PBMCs provenientes dos animais vacinados foi maior do que no bovino controle negativo, no qual detectou-se TNF- α em pontos isolados de coleta (Figura 5a, b). As maiores concentrações de TNF- α foram detectadas em sobrenadantes de PBMCs do bovino 2, com o pico de produção de 2,23ng/ml após três dias de estímulo com o peptídeo 23290, na coleta referente aos nove dias pós-inoculação. Aos 36 dias pós-inoculação, após suave declínio, as concentrações de TNF- α atingem níveis menores do que os basais, detectados no dia zero (Figura 6a, b). Os peptídeos 5081 e 23290

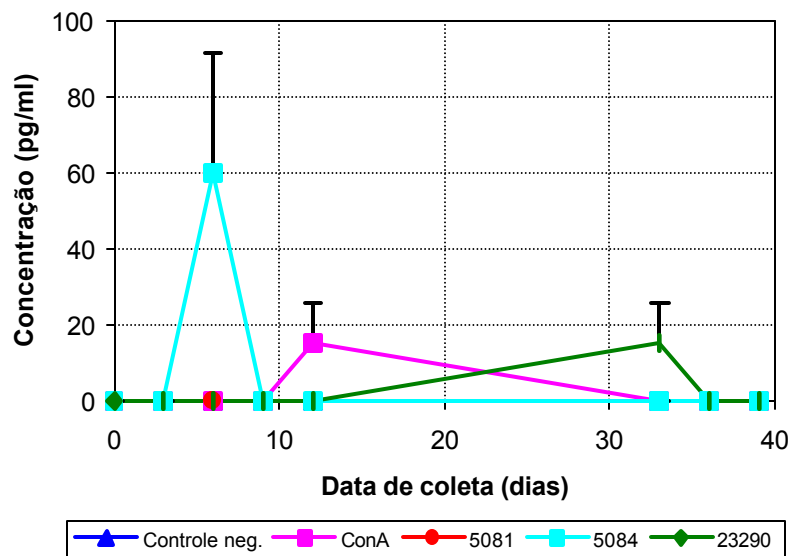


Figura 2 – Cinética de produção e secreção de IL-12 por PBMCs do bovino controle negativo após três dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

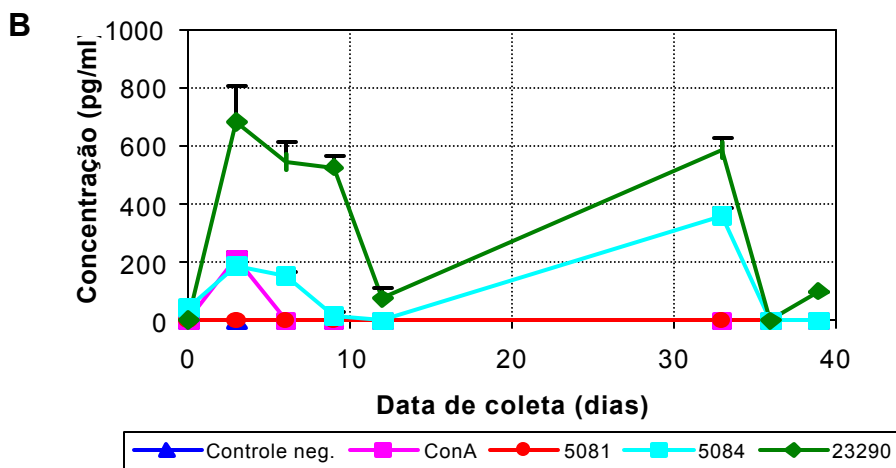
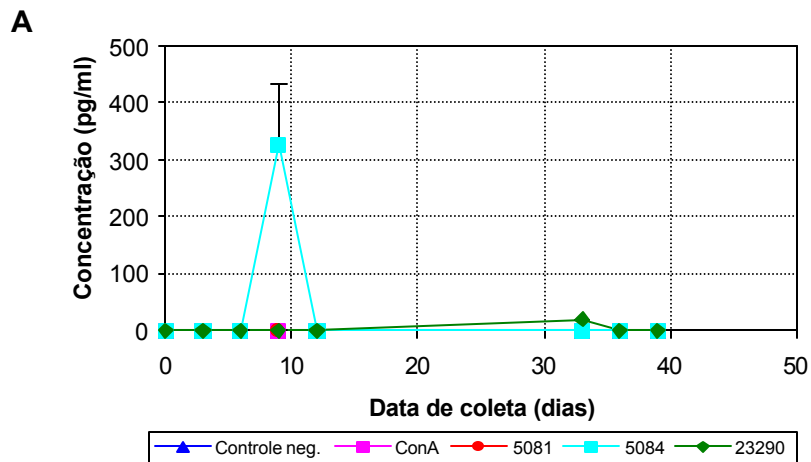


Figura 3 – Cinética de produção e secreção de IL-12 por PBMCs do bovino 2. **A.** Dosagem de IL-12 em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de IL-12 em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

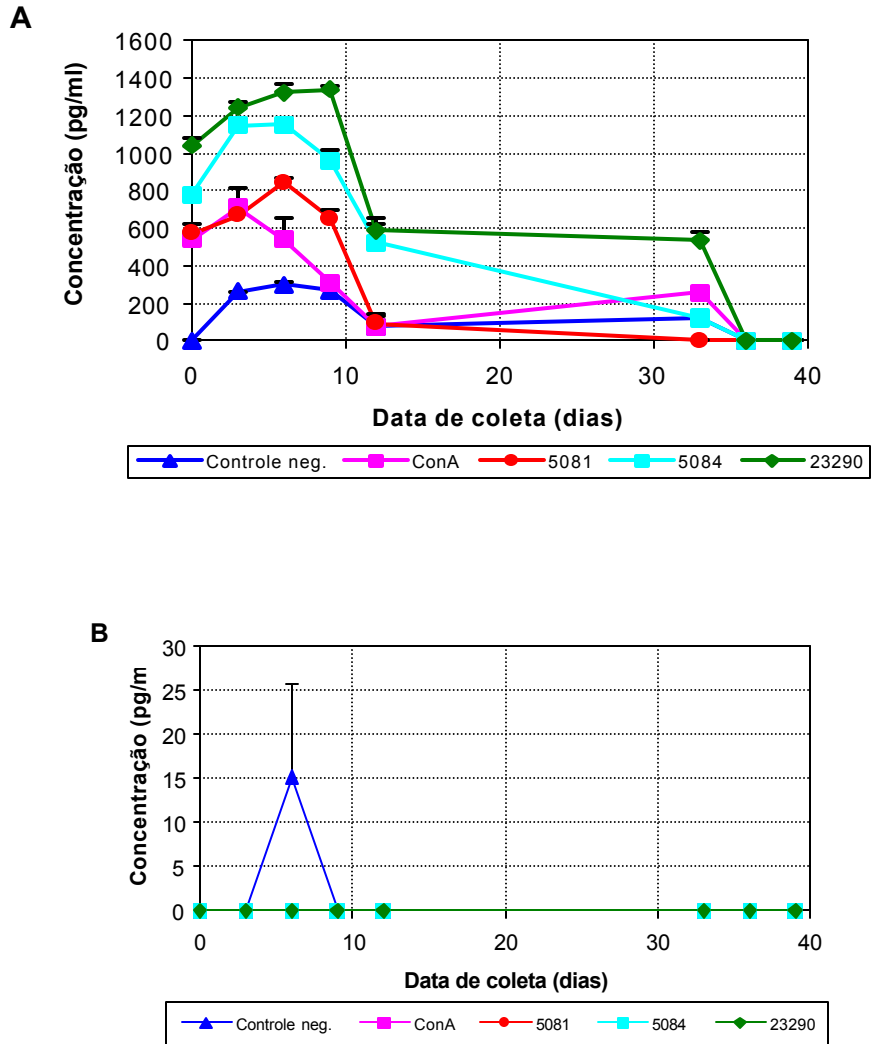


Figura 4 – Cinética de produção e secreção de IL-12 por PBMCs do bovino 3. **A.** Dosagem de IL-12 em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de IL-12 em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

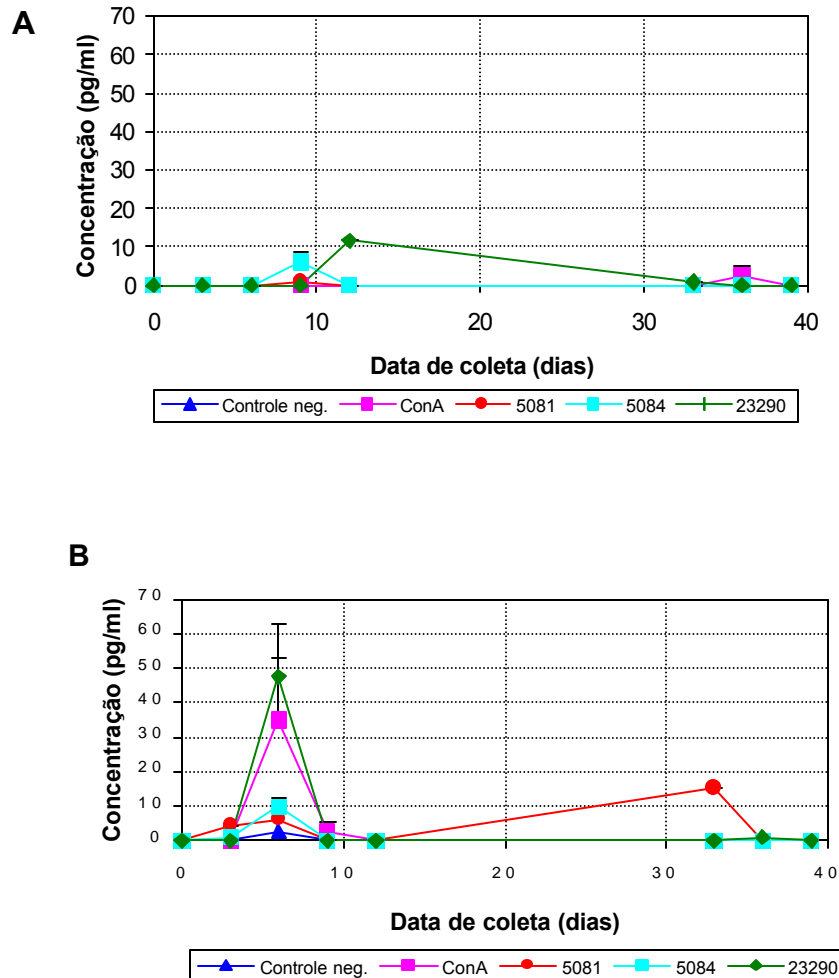


Figura 5 – Cinética de produção e secreção de TNF- α por PBMCs do bovino controle negativo. **A.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

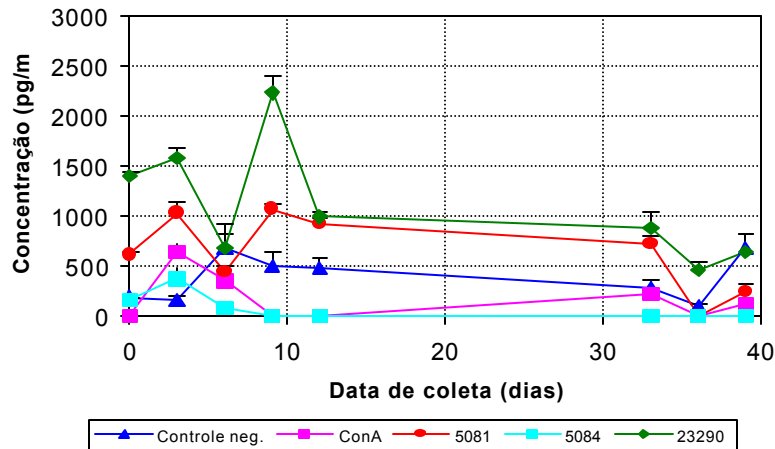
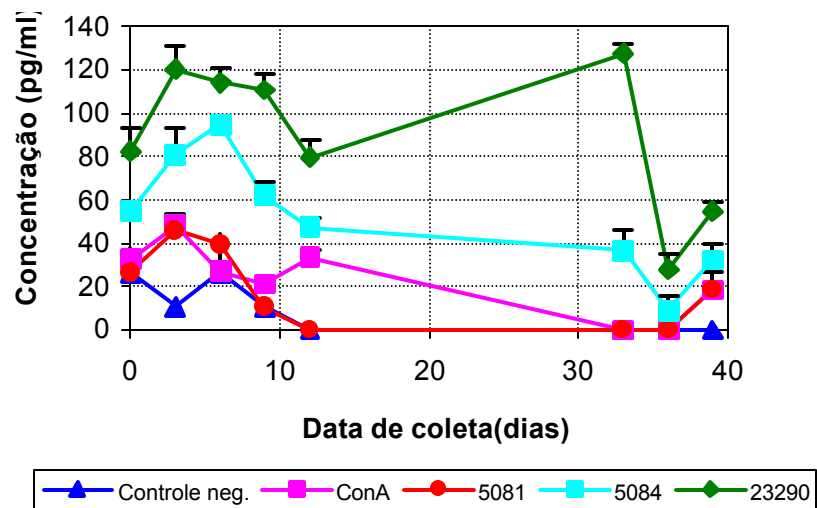
A**B**

Figura 6 – Cinética de produção e secreção de TNF- α por PBMCs do bovino 2. **A.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

induziram maiores níveis de TNF- α nesse animal aos três dias de estímulo, enquanto que, em sobrenadantes coletados após cinco dias de estímulo os melhores resultados foram obtidos com os peptídeos 5084 e 23290, embora com valores absolutos de concentração mais baixos quando comparado ao tempo de estímulo de três dias (Figura 6b).

Os maiores níveis de TNF- α entre os animais vacinados foram detectados em sobrenadantes de cultivo coletados após três dias de estimulação *ex vivo*, com exceção do animal 3 (Figuras 6, 7 e 8). Em células de todos os animais o peptídeo 23290 se destacou induzindo as maiores concentrações de TNF- α . Em células do bovino 1 o perfil de TNF- α é similar entre todos os tratamentos aplicados, principalmente quando as células foram estimuladas pelos peptídeos 5084 e 23290 após três dias de estímulo *ex vivo* (Figura 7a). Os níveis de TNF- α detectados após cinco dias de estimulação foram menores do que aos três dias (Figura 7b).

Os níveis de TNF- α , assim como, de IL-12 estimulados pela ConA foram menores quando comparados à indução pelos peptídeos sintéticos, principalmente, pelo 5084 e 23290.

No animal 3 os clones estimulados reconheceram, principalmente o peptídeo 23290, o qual induziu os maiores níveis de produção de TNF- α , sendo baixa ou não detectável os níveis de TNF- α induzidos pelos demais estímulos (Figura 8a,b).

Os peptídeos 5084 e 23290 se destacaram na indução de IFN- γ produzido por PBMCs. Os gráficos revelam uma maior produção de IFN- γ entre o período pós-vacinal e a re-inoculação, com exceção dos resultados observados após 5 dias de estímulo *ex vivo* referentes ao bovino 3 (Figura 12b).

O animal controle negativo não produziu níveis detectáveis de IFN- γ após três dias de estímulo, entretanto, após cinco dias em cultivo os níveis de IFN- γ secretado aumentaram, sendo que, a cinética de produção foi similar entre

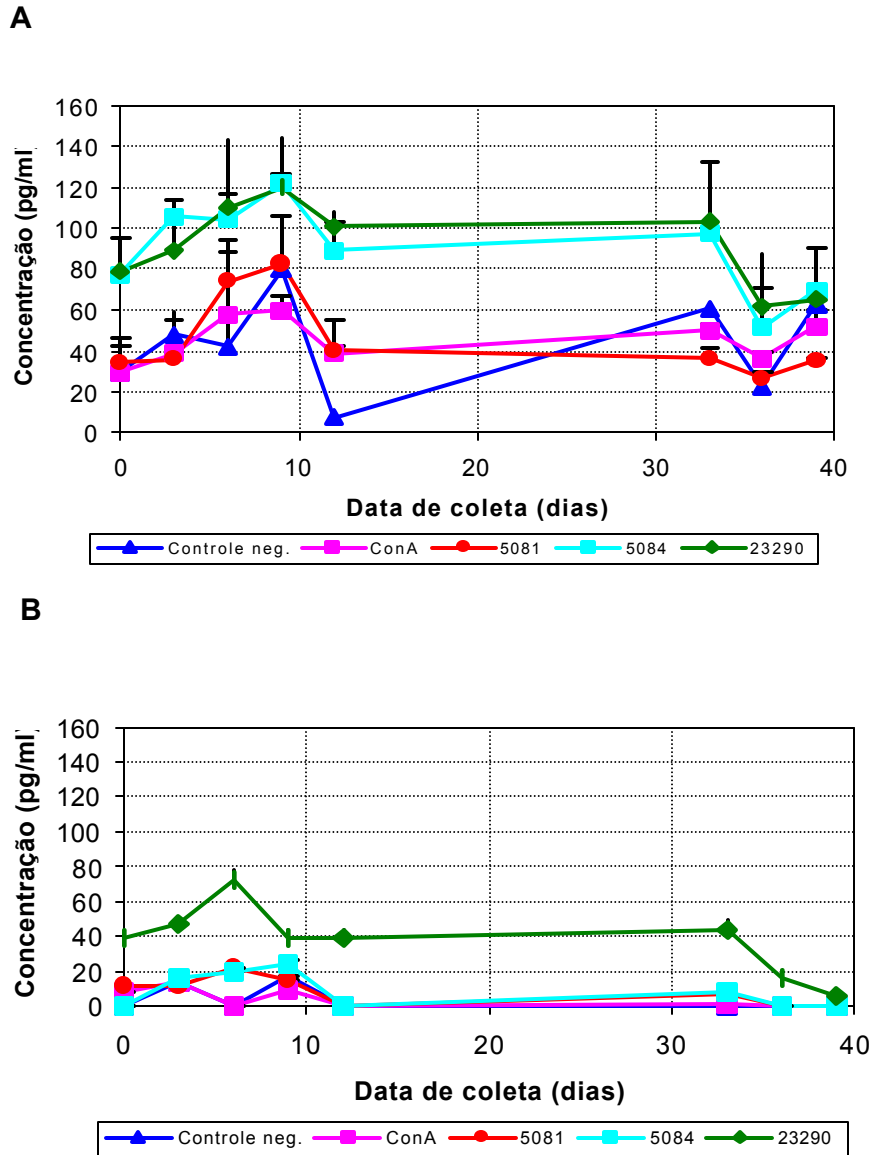


Figura 7 – Cinética de produção e secreção de TNF- α por PBMCs do bovino 1. **A.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

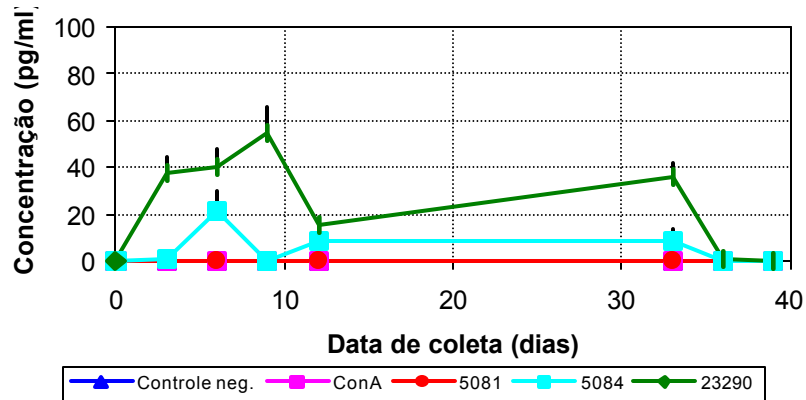
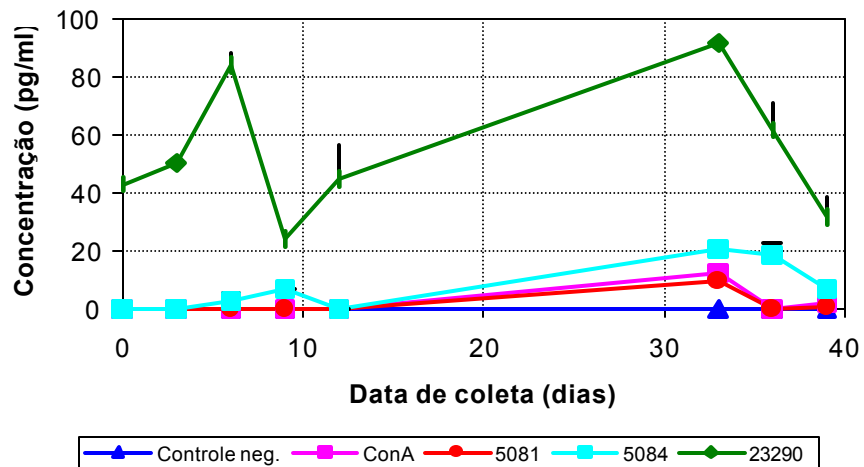
A**B**

Figura 8 – Cinética de produção e secreção de TNF- α por PBMCs do bovino 3. **A.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

os diversos tratamentos (Figura 9). As PBMCs do bovino 2 produziram níveis mais elevados de IFN- γ quando estimuladas durante cinco dias (Figura 10b), enquanto que, os resultados obtidos após três dias em cultivo revelam picos de reatividade nos seis primeiros dias pós-inoculação dependentes do estímulo antigênico, de forma que o peptídeo 23290 foi o que gerou uma resposta mais duradoura, perdurando até o 12º dia pós-inoculação (Figura 10a).

A produção de IFN- γ por PBMCs aumentou após a inoculação dos animais, principalmente, quando estimuladas *ex vivo* pelos peptídeos 5084 e 23290. O perfil do IFN- γ assemelha-se ao da IL-12 em alguns animais, ou seja, aumenta nos primeiros dias após a primeira inoculação e diminui entre os 9 e 12 dias pós-inoculação. Em bovinos a IL-12 também se apresenta como um potente indutor da produção de IFN- γ (BROWN *et al.*, 1998a), e é possível que exista um *feedback* positivo na produção destas citocinas em bovinos através do reconhecimento antigênico dos peptídeos sintéticos.

Altos níveis de IFN- γ produzidos pelas células do animal 1 foram claramente estimulados pelo peptídeo 23290, sendo que, os demais estímulos induziram a produção de baixas concentrações de IFN- γ quando detectável. Após cinco dias de estímulo *ex vivo* o IFN- γ foi detectado apenas nos dias 3, 6 e 9 de coleta quando estimulado pelo peptídeo 23290 (Figura 11a,b).

Vários parâmetros podem ser analisados em testes de memória imunológica, sendo um deles a produção de determinadas citocinas envolvidas com a proteção do hospedeiro (BROWN *et al.*, 1993c; RODRIGUEZ *et al.*, 1996). Segundo TANCHOT e ROCHA (1998), a produção e secreção de citocinas qualifica uma célula como efetora, sendo que, a quantificação destas

proteínas constitui-se em um método eficaz de estudo dos mecanismos efetores envolvidos na resposta imune.

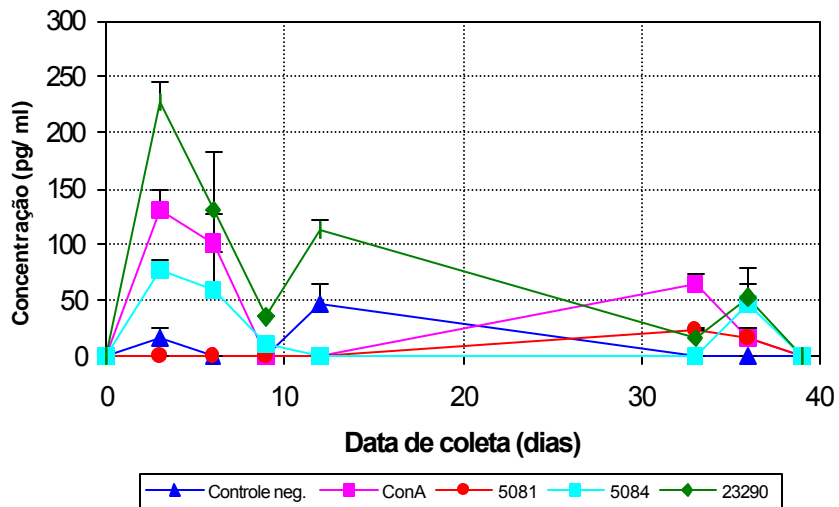
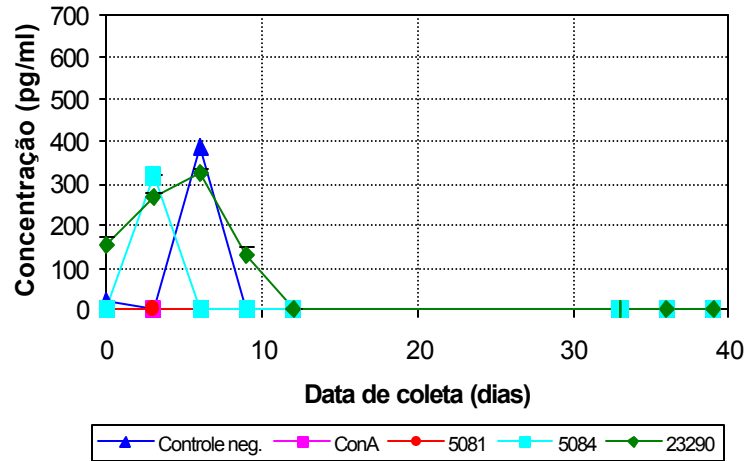


Figura 9 – Cinética de produção e secreção de IFN- γ por PBMCs do bovino controle negativo. Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões. Não foram detectados níveis de IFN- γ em

sobrenadante de PBMCs do bovino controle negativo após três dias de estímulo *ex vivo*.

A



B

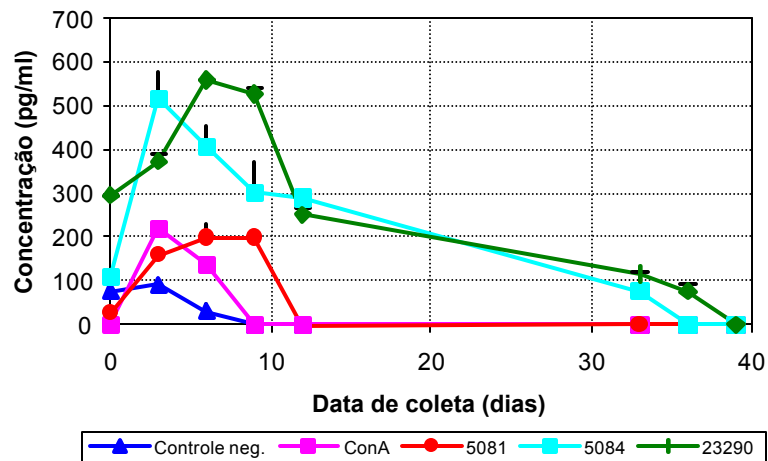


Figura 10 – Cinética de produção e secreção de IFN- γ por PBMCs do bovino 2. **A.** Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de

cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

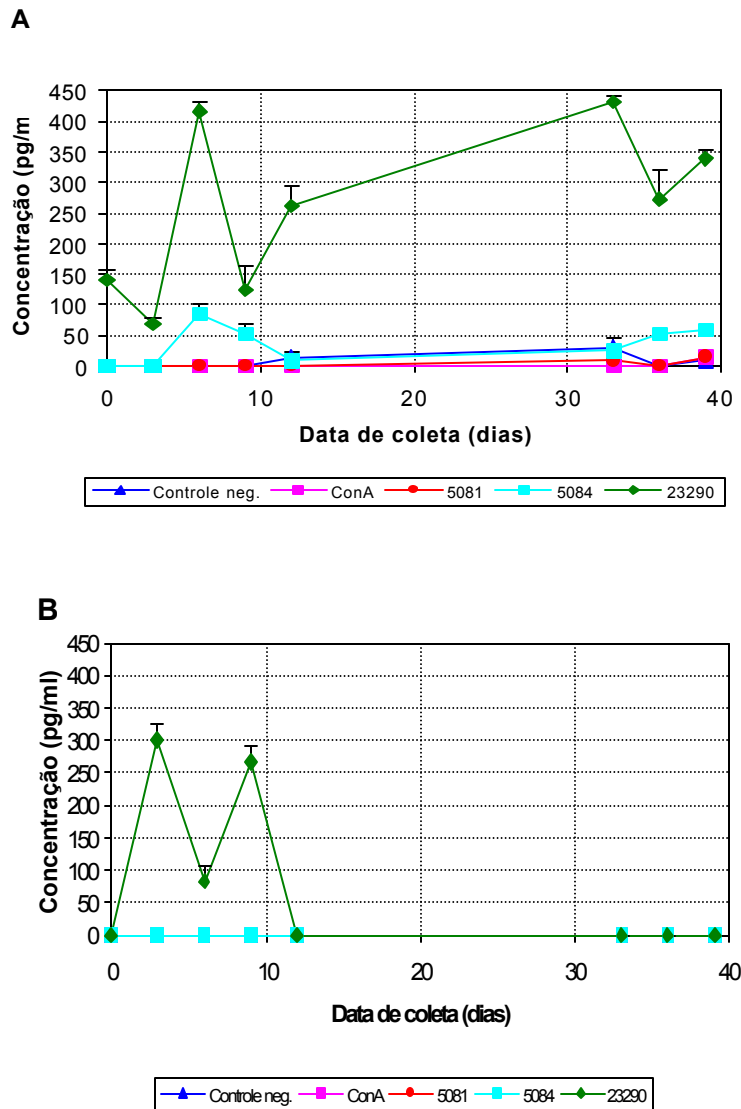


Figura 11 – Cinética de produção e secreção de IFN- γ por PBMCs do bovino 1. **A.** Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultivo celular após três dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de

cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras representam os desvios padrões.

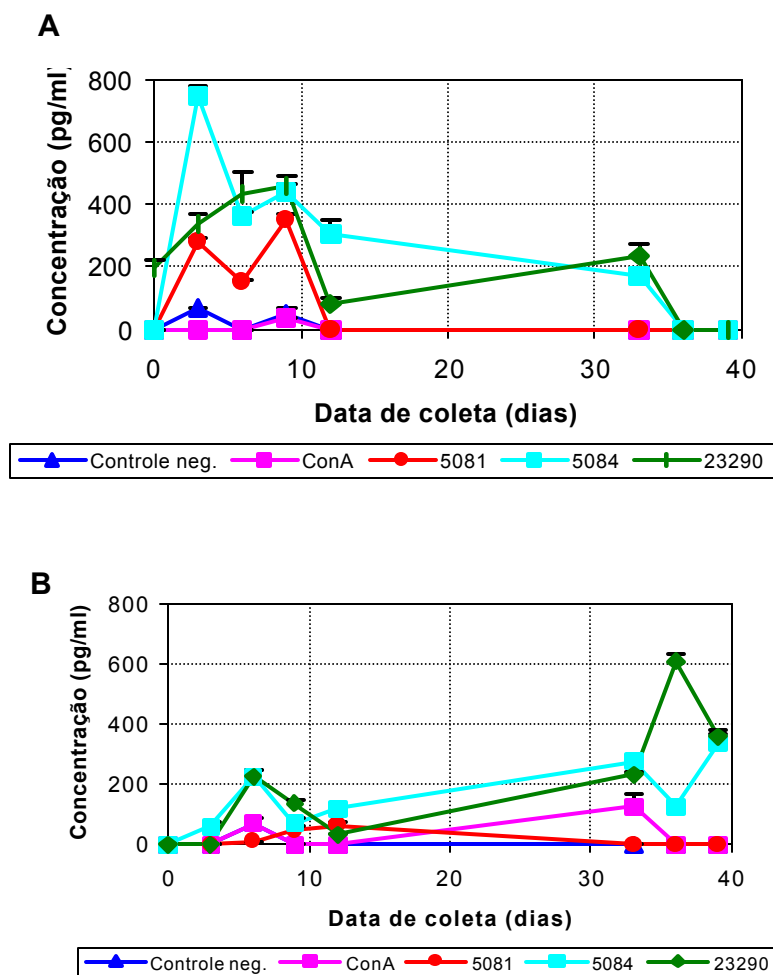


Figura 12 – Cinética de produção e secreção de IFN- γ por PBMCs do bovino 3.
A. Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultivo celular após três

dias de estímulo *ex vivo*. **B.** Dosagem de IFN- γ em sobrenadante de cultivo celular após cinco dias de estímulo *ex vivo*. As barras verticais indicam os desvios padrões.

A indução da produção e secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por PBMCs estimuladas *ex vivo* com os peptídeos sintéticos vêm demonstrar o reconhecimento por células previamente estimuladas com amostra atenuada de *B.*

bovis. Sendo os peptídeos 5084 e 23290 provenientes da proteína RAP-1 de *B. bovis*, o reconhecimento *ex vivo* dos mesmos caracteriza a ativação da memória imunológica induzida pela inoculação experimental da amostra atenuada de *B. bovis*. Os níveis elevados de citocinas detectados nos animais vacinados, confirmam a ativação da memória imunológica através da resposta imune secundária, quando comparados aos baixos níveis detectados no bovino controle negativo.

O peptídeo sintético 23290, sendo resultado da hibridização dos peptídeos 5081 e 5084, assume uma conformação espacial distinta das conformações apresentadas pelos seus peptídeos de origem, além de possuir um maior número de aminoácidos em sua estrutura, provavelmente, apresentando novos epítomos em sua estrutura resultando em uma maior antigenicidade.

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a resposta ao peptídeo híbrido 23290 foi caracterizada pelas maiores taxas de produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por PBMCs ($p < 0,05$) de acordo com o exposto no quadro 3, sendo este então, o peptídeo que apresentou maior imunogenicidade e reconhecimento celular. O estímulo pelo peptídeo 23290 difere estatisticamente ao nível de significância de $p < 0,05$ pelo Teste de Tukey dos demais tratamentos aplicados às PBMCs *ex vivo* para todas as citocinas dosadas. O reconhecimento, neste caso, está diretamente relacionado à ativação e estímulo de memória imunológica,

indicando que o peptídeo 23290 possui epítomos capazes de atuar em células Th previamente estimuladas por antígenos íntegros contidos na amostra atenuada de *B. bovis*.

A ConA não apresentou o efeito esperado, a qual deveria constituir-se no controle positivo para a detecção de IFN- γ , TNF- α e IL-12. Ao analisar-se os gráficos, observa-se que a ConA, de forma geral, induziu níveis mais baixos de

Quadro 3 – Médias das concentrações de citocinas (pg/ml), segundo análise de medidas repetidas, produzidas por PBMCs provenientes dos animais inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

	IFN- γ		TNF- α		IL-12	
Controle neg.	17,693	a	73,237	a	32,827	a
ConA	12,491	a	40,129	a	82,556	a b
5081	31,278	a	116,748	a	88,388	a b
5084	115,170	b	39,452	a	180,526	b
23290	188,138	c	233,856	b	269,351	c

produção das citocinas pelas PBMCs quando comparados à estimulação pelos peptídeos 5081, 5084 e 23290. O efeito “inibidor” gerado pela ConA pode estar relacionado a alta concentração do mitógeno que foi adotada no experimento (12,5µg/ml).

A heterogeneidade no perfil das citocinas traçado entre os animais experimentais estão de perfeito acordo com trabalhos de KELSO (1995) e BROWN *et al.* (1998a), os quais afirmam que o perfil da produção de citocinas é diversificado devido à composição heterogênea da população de linfócitos Th, no entanto, existe uma predominância da resposta do tipo Th1 ou Th2 contra um determinado patógeno ou antígeno.

De acordo com a Análise de Medidas Repetidas, o tempo de estímulo do antígeno sobre as células teve efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre a produção e secreção de TNF- α , sendo que, as concentrações desta citocina foram maiores quando coletadas após três dias de estímulo *ex vivo* ($p < 0,05$). Entretanto, a data de coleta de sobrenadante não exerceu influência nos níveis de IFN- γ e IL-12 dosados ($p < 0,05$).

Os resultados do presente trabalho, principalmente referentes a estimulação com o peptídeo sintético 23290, estão de perfeito acordo com o exposto por RODRIGUEZ *et al.* (1996), os quais demonstraram que a estimulação com extratos brutos de *B. bigemina* ou com rRAP-1 *ex vivo* de linfócitos T de memória isolados de linfonodos, induz preferencialmente uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela alta produção de IFN- γ .

Concordando com BROWN e PALMER (1999), a proteína RAP-1 de *B. bovis*, oriunda do complexo apical de merozoítos, da qual se originou o peptídeo 23290, é uma das proteínas que melhor potencial apresenta como candidata a um imunógeno protetor. Nossos resultados, dado o perfil de citocinas mensuradas *ex vivo*, sugerem que o peptídeo sintético em questão é um imunógeno com excelentes perspectivas para continuar estudos que compreendam testes clínicos em bovinos.

5.4 – Avaliação histopatológica e imunohistoquímica de linfonodos bovinos inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*

De maneira geral, o exame microscópico dos linfonodos dos animais inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*, corados com Hematoxilina/Eosina, demonstra que a partir dos três dias pós-inoculação já é possível constatar reatividade de CGs e também hiperplasia de áreas paracorticais onde aparecem macrófagos e células dendríticas (Figura 13a).

Estes resultados mostram os primeiros eventos celulares, a nível tecidual, de uma resposta imune caracterizados por hiperplasia das áreas paracorticais e aparecimento de CGs, o que indica que o imunógeno utilizado induziu uma resposta imune adaptativa do tipo T-dependente, já que a reatividade dos CGs ocorre em todos os órgãos linfóides periféricos quando antígenos não solúveis são utilizados como imunógenos. Apesar de que a reação do CG é estritamente T-dependente, alguns antígenos T-independentes, tais como lipopolissacarídeos ligados a haptenos e alguns surfactantes, entre outros, podem induzir à formação de CGs ou reações semelhantes a CGs (KELSOE, 1995). Entretanto, substâncias como as referidas não estavam presentes no imunógeno ou no veículo utilizados, corroborando mais uma vez tratar-se de um antígeno indutor de resposta imune T-dependente.

Nos folículos com reatividade de CGs aparece uma área basal acidófila, constituída por células grandes, mais ou menos arredondadas, com

citoplasma escasso, núcleo volumoso, cromatina ora frouxa ora mais ou menos condensada e nucléolos evidentes, ocasionalmente observam-se figuras mitóticas, principalmente próximas à periferia desta área. Sobre esta área acidófila nota-se uma região cuja população celular é de tamanho menor embora mais numerosa, homogênea e com citoplasma escasso, a cromatina esta mais ou menos condensada. Estas duas regiões estão claramente delimitadas por uma população celular homogênea, com células pequenas e núcleo hiper

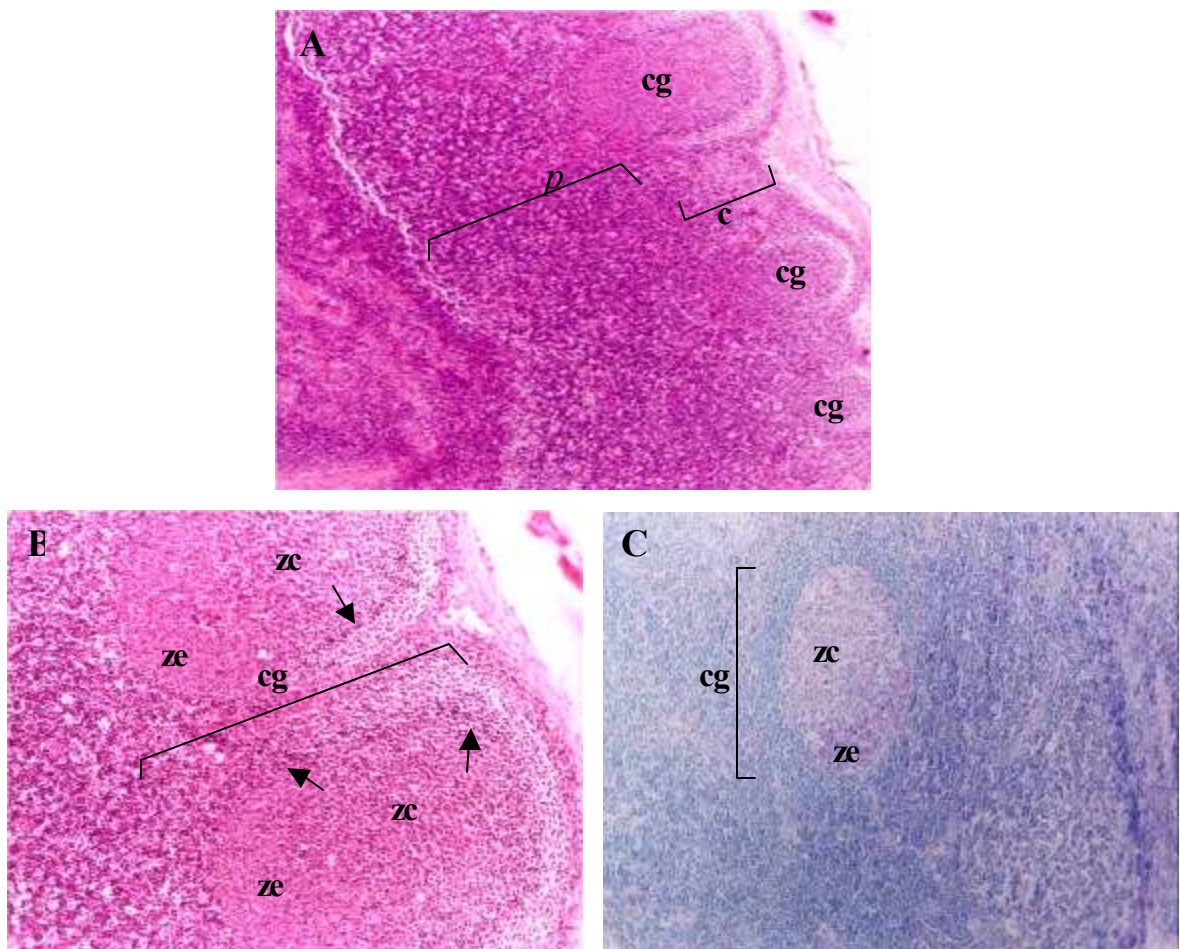


Figura 13 - Alterações histopatológicas em cortes de linfonodos cervicais de bovinos inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis*. A. Seis dias pós-vacinal apresentando reatividade positiva com formação de

centros germinais (cg) na região cortical externa (c) e hiperplasia da região paracortical (p), coloração H&E, 90X. **B.** Centro germinal (cg) após 12 dias de inoculação caracterizado pela zona clara (zc) e zona escura (ze) delimitado por células do manto (setas), coloração H&E, 215X. **C.** Centro germinal (cg) mostrando a zona clara (zc) e a zona escura (ze) após três dias de inoculação, coloração Verde Metil Pironina, 215X.

cromático à semelhança de um manto (Figuras 13b,c) Macrófagos e células dendríticas foliculares também são observadas.

Em algumas regiões dos linfonodos observa-se também hiperplasia de áreas interfoliculares e de cordões medulares, principalmente aqueles mais próximos das áreas paracorticais profundas. Nas regiões interfoliculares se observam células dendríticas, ao redor das quais agrupam-se células cujo citoplasma cora-se intensamente de vermelho com Verde Metil Pironina, semelhantes àquelas que se encontram nos cordões medulares. Embora, nestes últimos se dificulta a sua individualização já que as células se apresentam muito agrupadas (Figuras 14a,b).

Aos seis dias pós-inoculação é mais evidente a hiperplasia das áreas paracorticais, onde nitidamente são observados os seios interfoliculares. A reatividade dos CGs continua semelhante a que foi observada aos três dias pós-inoculação. As células que apresentam citoplasma vermelho intenso são também observadas em áreas próximas a foliculos primários.

Aos nove e 12 dias pós-inoculação evidencia-se um maior número de CGs. Em alguns deles, a região acidófila se mostra menos espessa, às vezes não sendo possível defini-la completamente. As células da região localizada acima da área eosinofílica são mais homogêneas e o núcleo corado mais intensamente em verde pelo Verde Metil Pironina. As células que mostram citoplasma corado em vermelho intenso já podem ser visualizadas com

características semelhantes a plasmócitos, não só nos cordões medulares como também naquelas que se agrupam ao redor das células dendríticas. Estas células são mais numerosas nos cordões medulares que se continuam com os cordões paracorticais profundos.

A cinética de formação dos CGs que foi observada nos linfonodos é semelhante ao que foi descrito por outros autores, quando utilizaram antígenos T-dependentes, uma vez que na resposta imune primária eles aparecem ao redor do

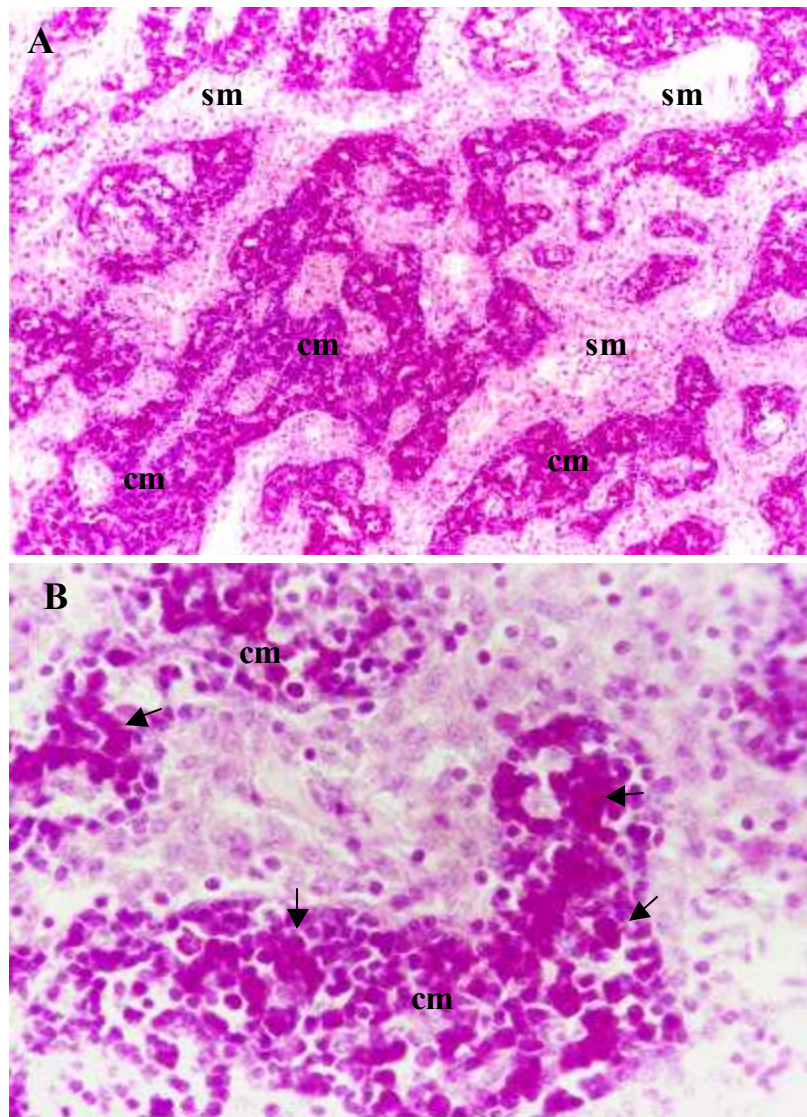


Figura 14 – Hiperplasia da região medular em linfonodos de bovinos inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis*. **A.** A coloração avermelhada indica a alta atividade de síntese protéica nos cordões medulares (cm) interpostos aos seios medulares (sm), coloração Verde Metil Pironina, 215X. **B.** Plasmócitos (setas) com grande quantidade de rRNA no citoplasma localizados nos cordões medulares (cm), coloração Verde Metil Pironina (860X).

quarto dia pós-imunização, chegando ao seu máximo número pelo dia 10-12 e declinam após três semanas (JACOB *et al.*, 1991; GULBRANSON-JUDGE *et al.*, 1997; HAN *et al.*, 1997; KENNETH *et al.*, 1997; CAMACHO *et al.*, 1998). Concordando com os autores anteriormente citados, os dados apresentados no presente trabalho confirmam a cinética dos CGs, já que o seu aparecimento foi constatado a partir do terceiro dia, com aumento evidente entre 9-12 dias após a inoculação.

As características histológicas dos CGs que foram constatadas neste estudo também têm sido descritas por vários autores em órgãos linfóides periféricos de humanos, tais como: baço, tonsilas, placas de Payer e linfonodos. GULBRANSON-JUDGE *et al.* (1997) consideram que os CGs característicos se desenvolvem em resposta a antígenos T-dependentes, nos folículos primários onde estão as células B, os quais são encontrados em todos os órgãos linfóides secundários. Também, REARDON e PIERCE (1981), em trabalho experimental com *Ehrlichia canis*, afirmaram que as alterações histológicas dos CGs e das áreas paracorticais visualizadas nos linfonodos eram semelhantes às que observaram no baço.

Então, baseado no anteriormente exposto, pode-se considerar que a reatividade dos CGs que foi observada nos linfonodos dos animais imunizados

corresponde a um evento celular de uma resposta imune típica de órgãos linfóides periféricos, independentemente do órgão linfóide que está sendo analisado.

O aparecimento de duas zonas claramente definidas nos CGs, bem como a presença de células dendríticas nestas áreas, está de acordo com as observações relatadas por MacLENNAN (1994), já que este autor afirma que os centros germinativos maduros são divididos em zona clara e zona escura. Além disto, a zona clara contém uma rica rede de células foliculares dendríticas que têm a capacidade de captar o antígeno, expondo-o sobre sua superfície por mais de um ano. Isto significa que a área basal acidófila que foi observada neste estudo corresponderia à zona escura, e a região com células menores e homogêneas, localizada sobre a anterior, corresponderia à zona clara, onde também se observaram células dendríticas e macrófagos. Já, MORRISON *et al.* (1986) consideram que, nos linfonodos de bovinos, os centros germinativos ativos são demarcados por duas zonas distintas, a mais interna, geralmente distal ao seio vascular adjacente, a qual contém principalmente linfoblastos com uma alta atividade mitótica e a zona mais externa, a qual é menos ativa, contendo poucos linfoblastos e numerosas células não linfocíticas. A descrição relatada por estes autores assemelha-se, em parte, à que foi aqui constatada. Entretanto, em nosso estudo foi possível observar que na área central dos CGs havia duas regiões com afinidade tintorial diferentes à Hematoxilina/Eosina e que o manto que as delimitava constituía-se de numerosas células linfocíticas.

HOLLOWOOD e GOODLAD (1998) comentam que a reatividade típica dos CGs, provavelmente só ocorra durante a primeira imunização e que esta reação inicia-se pela ativação de pequenas células B em locais extrafolículos, migrando para os folículos primários e aparecendo nestes locais 2-4 dias após a primeira imunização. Observaram também que aos 4-6 dias, os CGs sofrem profundas alterações morfológicas com compartimentalização da população de células blásticas, os centroblastos, e de sua progênie, os centrócitos, em zona escura e zona clara, respectivamente. Estes resultados também são

semelhantes aos observados nos linfonodos dos bovinos imunizados já que, concomitantemente, houve formação de CGs e áreas extrafoliulares de ativação de células B, as quais foram caracterizadas neste estudo como células linfoblásticas associadas às células dendríticas. Porém, nesta pesquisa, as alterações dos CGs já foram observadas no terceiro dia pós-inoculação.

MORRISON *et al.* (1986) comentam que há consideráveis evidências que mostram que a produção de anticorpos nos linfonodos, durante a resposta imune humoral, não ocorre nos folículos senão nas áreas perifolículos e nos cordões medulares, antes que ocorra a formação dos CGs.

KENNETH *et al.* (1997), analisando as células formadoras de anticorpos, localizadas nas áreas extrafoliulares, demonstraram que estas células produzem anticorpos com baixa afinidade, os quais são codificados por segmentos do gene V que ainda não foram alterados por hipermutação somática. Acrescentam, ainda, que na medida que progride a resposta imune primária, estas células não seriam as responsáveis pela produção de anticorpos de alta afinidade e que a involução destes focos, durante a segunda semana, significaria que a produção continuada de anticorpos com alta afinidade, após este período, poderia ser devido à presença destas células em outros locais.

Então, a hiperplasia de cordões medulares que mostravam numerosas células, facilmente caracterizadas como plasmócitos quando coradas com Verde Metil Pironina devido à afinidade da Pironina pelo RNA ribossômico, a partir do terceiro dia pós-inoculação e em maior número a partir do nono dia após a imunização, corresponderiam a linfócitos B que migraram para os cordões medulares e se transformaram em plasmócitos produtores de imunoglobulinas, o que segundo ZHENG *et al.* (1996) e TARLINTON e SMITH (1997) é observado durante a resposta imune humoral.

No linfonodo do animal não imunizado observam-se alguns folículos secundários, porém em menor número que os observados nos animais

inoculados, não há hiperplasia de áreas interfoliculares e nem de cordões medulares.

A formação de CGs que foi observada neste animal parece corresponder a uma resposta imune não específica, já que a reatividade dos CGs não era regular e não se acompanhava de outros eventos celulares que indicassem uma resposta imune adaptativa induzida por antígenos T-dependentes, tais como hiperplasia de áreas paracorticais e de cordões medulares. Esta afirmação é baseada nas observações de MORRISON *et al.* (1986), uma vez que eles constataram que nos linfonodos periféricos de bovinos saudáveis, com idade entre 6-12 meses de idade, em torno de 30-70% dos folículos linfóides podem conter centros germinativos. O que segundo eles indicaria que os linfonodos de animais normalmente saudáveis são extremamente ativos.

Nos animais imunizados, aos três e seis dias após re-inoculação a reatividade dos CGs é mais intensa, embora parece haver uma inversão das zonas clara e escura, as células que as constituem mostram-se com morfologia semelhante, igual àquela que é observada ao redor dos seios interfoliculares. A hiperplasia dos cordões medulares também é evidente.

A maior reatividade dos CGs, bem como a hiperplasia de cordões medulares e de áreas T-dependentes que foi observada três dias após a re-inoculação. Fato que comprova que a resposta imune secundária foi mais rápida e efetiva em relação à primária devido à memória imunológica. As observações de LIU *et al.* (1997), corroboram nossos achados, no que diz respeito à hiperplasia dos cordões medulares, porque eles demonstraram que as células B de memória originam massivas reações plasmocitárias extrafoliculares após re-estimulação, o que é devido à diferenciação terminal das células B de memória em plasmócitos, com maior rapidez que as células B “naive”, originando de 5-8 vezes mais plasmócitos e secretando 3-4 vezes mais imunoglobulinas. Por outro lado, a hiperplasia que foi observada em áreas T-dependentes após a re-inoculação, está de acordo com os relatos de BOUSSO e KOURILSKY (1999), já que segundo

estes autores a resposta de células T após um segundo desafio, geralmente é mais rápida e efetiva do que o desafio antigênico inicial, como consequência do aumento no número de células antígeno-específicas e também pelas alterações qualitativas das células de memória que respondem mais eficazmente que as células “*naive*”.

Os nossos achados também indicam que o imunógeno utilizado, embora não tenha produzido um quadro clínico de doença, foi capaz de evocar uma resposta imune com produção de células de memória, uma vez que segundo MORRISON *et al.* (1986), as duas principais funções dos CGs formados são a produção de células de memória e a regulação do nível e duração da resposta de anticorpos.

Quando se analisam as amostras de linfonodos coradas pelo método de TUNEL (TdT) se observam numerosas células TUNEL+ aos três e seis dias pós-inoculação, localizadas não só nos cordões medulares como também nos CGs e nas áreas interfoliculares. Porém, quando se observam nos CGs geralmente se localizam nas áreas eosinofílicas (Figura 15a). Estas células TUNEL+ são mais numerosas nos cordões medulares a partir do nono dia pós-inoculação (Figura 15b).

No animal não imunizado, as células TUNEL+ se localizam ora nos CGs ora nos cordões medulares e geralmente aparecem como células isoladas (Figura 15c), a diferença dos animais inoculados nos quais os linfonodos mostram grupos de células TUNEL+.

Aos três e seis dias após re-inoculação a frequência de células TUNEL+ é semelhante à observada aos nove dias pós-inoculação.

A constatação de células TUNEL+ a partir do terceiro dia pós-inoculação, localizadas tanto nos CGs quanto nos cordões medulares e nas áreas T-dependentes, já foi descrito por vários autores, embora não tão precocemente quanto o que foi observado nesta pesquisa (MacLENNAN, 1994; THORBECKE

et al., 1994; KENNETH *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997; HOLLOWOOD e GOODLAD, 1998; SEGUNDO *et al.*, 1999; HUR *et al.*, 2000).

O aparecimento de células TUNEL+, durante a formação dos CGs, está relacionado com a rápida proliferação das células B e sua relação com as células dendríticas e linfócitos T, o que significa que estas células foram selecionadas negativamente e induzidas à morte por apoptose. Esta afirmação baseia-se no fato de que a rápida proliferação das células B, durante a formação dos CGs, elimina células auto-reativas e aquelas que não foram capazes de interagir com o antígeno presente nas células dendríticas. A este respeito,

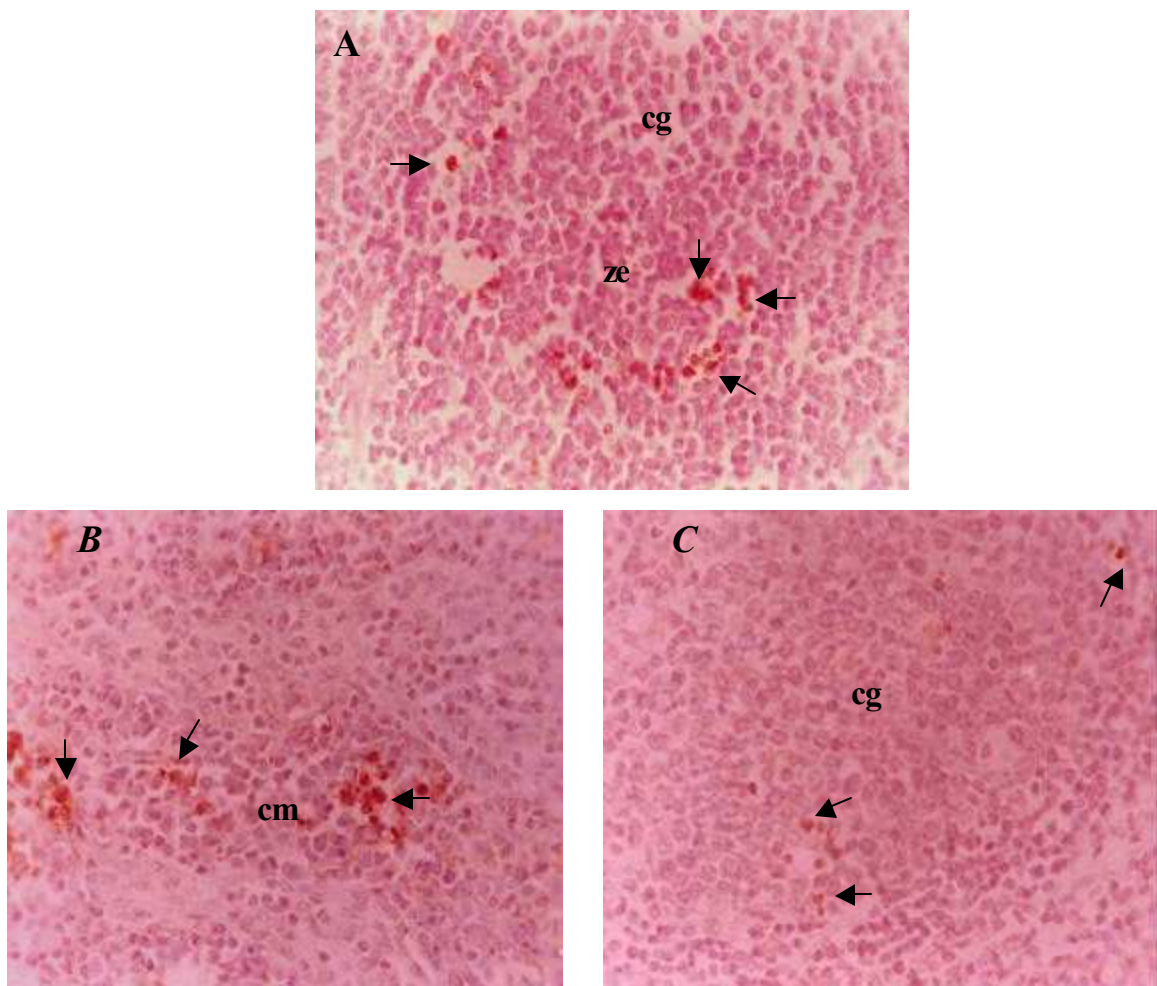


Figura 15 – Resultados do Teste de hibridização *in situ* pela técnica de TUNEL em linfonodos cervicais de bovinos para detecção de apoptose. **A.** Células TUNEL⁺ (setas) localizadas, principalmente, na zona escura (ze) do centro germinal (cg) após três dias de inoculação da amostra atenuada, TUNEL, 860X. **B.** Células TUNEL⁺ (setas) localizadas, principalmente nos cordões medulares (cm), após 12 dias de inoculação, TUNEL, 860X. **C.** Centro germinal (cg) em linfonodo do animal controle negativo, mostrando um reduzido número de células TUNEL⁺ difusas (setas), TUNEL, 860X.

THORBECKE *et al.* (1994), relacionam a apoptose de células B nos CGs à intensa e rápida proliferação destas células. Consideram, também que pelo fato dos CGs serem um microambiente tanto para proliferação quanto para morte, eles representariam o local ideal para seleção e expansão de células de memória com alta afinidade contra o antígeno que as induziu. Igualmente, MacLENNAN (1994) afirma que durante a formação dos CGs, os centrócitos, que ocupam a zona clara, parecem ser selecionados pela sua capacidade de interagir com o antígeno presente nas células dendríticas, observando-se por tanto uma alta taxa de morte destas células *in vivo*.

O maior número de células TUNEL⁺ na região basal das zonas escuras que foram observadas nos linfonodos dos animais imunizados, também foi descrito por THORBECKE *et al.* (1994) quando analisaram centros germinativos de tonsilas humanas. Estes autores postularam que à semelhança do que acontece no timo, dentro dos CGs haveria duas fases de seleção: uma seleção negativa de centroblastos na zona escura, como consequência das células não estarem próximas às células Th ou à rede de células dendríticas que estão expondo o antígeno, e a seleção positiva no estágio de centrócito, na zona clara, onde o antígeno e as células T atuariam como mediadores, protegendo-as contra a morte celular programada ou apoptose. Isto significa que não houve interação

entre as células B que foram ativadas nas áreas extrafoliculares e que migraram para os folículos linfóides, para iniciar a formação do CG, com as células dendríticas, sendo então induzidas a apoptose. Este achado também encontra explicação nos trabalhos de LIU *et al.* (1997), já que segundo estes autores os eventos genéticos que disparam a morte celular por apoptose são iniciados antes que se produza a mutação somática. Acrescentam, ainda, que este mecanismo pode levar a três conseqüências funcionais que asseguram um processo eficiente de seleção: primeiro, entre as células encontradas nos CG, unicamente aquelas que apresentem receptores para o antígeno sem mutação e com alta afinidade serão selecionadas a sofrerem mutação somática; segundo, aquelas células B que entrem ao CG deverão fazer a mutação e mostrar rapidamente a afinidade de seus receptores para poderem sobreviver; terceiro, a mutação somática deverá ser seguida imediatamente de seleção.

Segundo, HUR *et al.* (2000) a seleção negativa de células B não é mais do que a ausência de um sinal de sobrevivência, o qual é dependente da afinidade pelo antígeno original. Estes mesmos autores, utilizando dupla coloração com PNA (*peanut agglutinin*) e o mesmo kit comercial de detecção *in situ* de apoptose utilizado no presente trabalho, demonstraram que a maioria das células TUNEL+ localizava-se na zona escura e na parte basal da zona clara e que as mesmas pareciam estar em íntimo contacto com as células dendríticas.

Se considerarmos que no início da resposta imune as células B que proliferam produzem imunoglobulinas com baixa afinidade, então as células que mostraram reatividade positiva à coloração de TUNEL podem ser aquelas cujo receptor para o antígeno também era de baixa afinidade e não sofreram a mutação somática quando entraram à zona escura do CG, confirmando assim o seu aparecimento já ao terceiro dia pós-inoculação. Também é provável que antígenos circulantes tenham se ligado ao receptor sobre as células B, quando estas faziam hipermutação somática ou mesmo quando produziam anticorpos

antígeno-específicos com alta afinidade, o que induz ao programa de morte celular programada.

HOLLOWOOD e GOODLAD (1998) comentam que a morte das células não selecionadas produz um aumento massivo de morte por apoptose ao redor do sétimo dia pós-imunização e que a seleção negativa de células B parece contribuir para a alta taxa de apoptose nos CGs durante o estabelecimento da fase de reatividade. A semelhança do reportado por estes autores, em nosso estudo constatou-se maior número de células TUNEL+ no sexto dia após a inoculação da amostra atenuada de *B. bovis*. Por outro lado, KENNETH *et al.* (1997), observaram que, durante a segunda semana da resposta imune, os focos extrafoliculares produtores de anticorpos envolvem provavelmente devido à morte *in situ*, caracterizada por apoptose intensa ocorrendo nessas áreas. Então, as numerosas células TUNEL+ que foram observadas nos cordões medulares, nos linfonodos dos animais imunizados representariam um processo de involução destas áreas.

Ainda, HOLLOWOOD e GOODLAD (1998) consideram que o nível de apoptose é menor durante a reatividade dos CGs na resposta secundária, sugerindo que isto seja devido a uma hipermutação somática menor nesta resposta. Conseqüentemente, a regressão da reatividade dos CGs está associada com declínio de apoptose, implicando que este fato é restringido pela diminuição da proliferação e a contínua migração, mais do que a morte massiva de células. Estes achados concordam com os resultados deste estudo, já que não houve maior número de células TUNEL+ nos CGs após a re-inoculação do imunógeno.

Se a via apoptótica está envolvida na fisiologia das células B dos centros germinativos então a visualização de algumas células TUNEL+ nos CGs do animal não imunizado, seriam consideradas como sendo um mecanismo de caráter homeostático.

Ao exame dos fragmentos de linfonodos, corados pelo método de PAP, dos animais imunizados foi possível detectar reatividade fracamente

positiva em células dendríticas dos CGs aos 12 dias pós-inoculação, o mesmo não sendo observado no animal negativo (Figuras 16a, b). Entretanto, três dias após a re-inoculação observaram-se, nos cordões medulares, células dendríticas com reatividade fortemente positiva (Figura 16c).

KOSCO-VILBOIS *et al.* (1997) constataram que a reatividade dos CGs, com produção de clones de células B com alta afinidade pelo antígeno é precedida pela ativação extrafolicular de células B que produzem IgG entre 10-12 dias após imunização, eventualmente sofrendo apoptose e desaparecendo. O papel destas imunoglobulinas de baixa afinidade é formar complexos com antígenos circulantes para serem conseqüentemente seqüestrados dentro das células dendríticas foliculares. Estes achados corroboram o que foi observado no

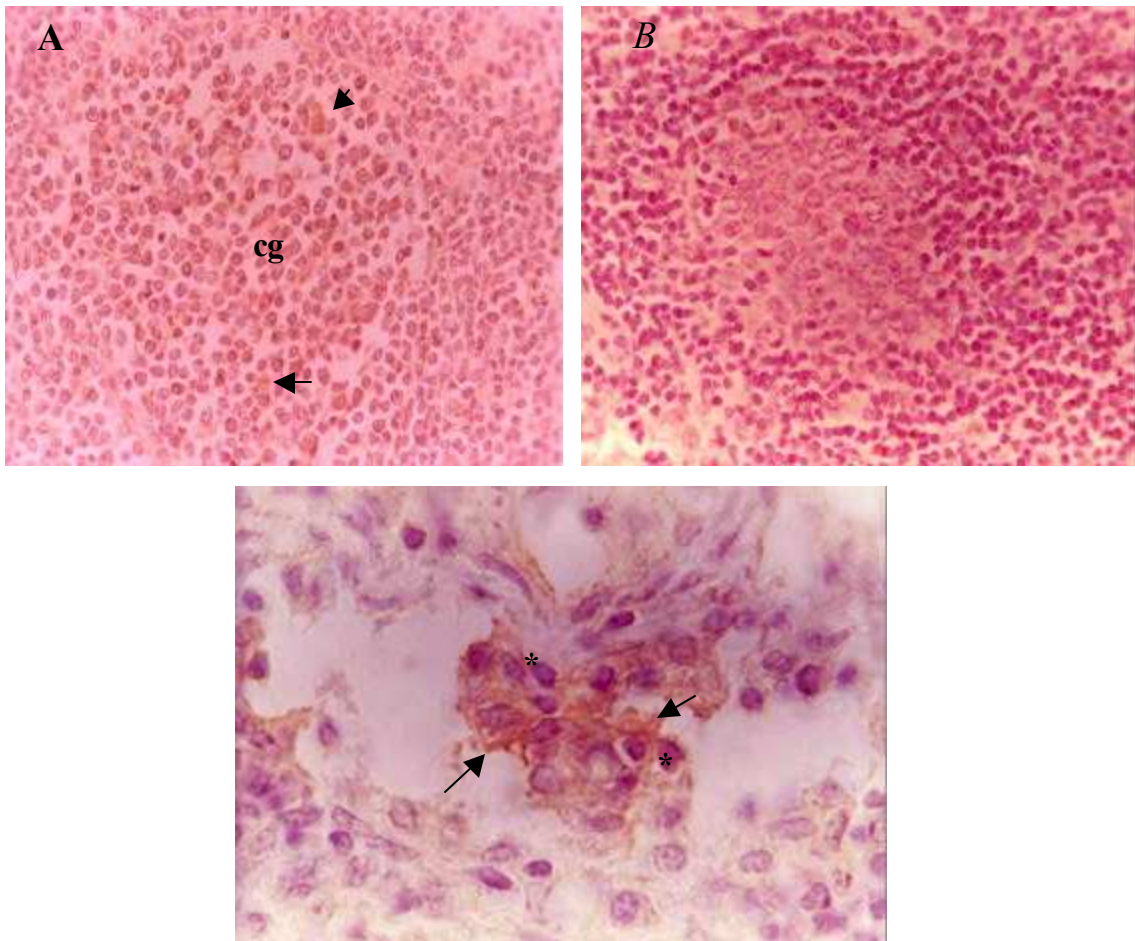


Figura 16 – Resultados do teste de peroxidase anti-peroxidase para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em linfonodos cervicais de bovinos. **A.** Baixa reatividade do PAP em células dendríticas foliculares (setas) localizadas no centro germinal (cg) após 12 dias de inoculação da amostra atenuada, PAP, 860X. **B.** Ausência de reatividade positiva em linfonodo do bovino negativo, PAP, 860X. **C.** Células foliculares dendríticas positivas (setas) apresentando antígenos de *Babesia bovis* a linfócitos (*) aos três dias após à re-inoculação, PAP, 2150X.

presente estudo já que, ao exame dos fragmentos de linfonodos corados pelo método de PAP dos animais inoculados com a amostra atenuada de *B. bovis*, constatou-se reatividade positiva, aos 12 dias pós-imunização, em células dendríticas foliculares indicando presença do antígeno. A intensidade e a velocidade da resposta ao antígeno detectada pelo PAP na reinoculação, pode ser devido ao processo de maturação das células dendríticas ocorrido entre a primeira e segunda inoculação, o que seguramente foi devido a endocitose de antígenos de *B. bovis*, já que não houve amostragem intermediária que nos levasse a ter dados de cinética de maturação destas células. Por outro lado, os resultados da IgG anti-*B. bovis*, mensurada aos 12 dias após inoculação e aos sete dias da re-inoculação confirmam a intensidade da maturação das células dendríticas e a apresentação de antígenos.

7 - CONCLUSÕES

- A amostra atenuada de *Babesia bovis* (Bbo UFV-1) é capaz de estimular o sistema imune de bovinos, através do reconhecimento por células do tipo T e induzir a geração de memória imunológica.
- Os peptídeos sintéticos 5081, 5084 e 23290 foram reconhecidos por PBMCs estimulados pela amostra atenuada de *B. bovis*.

- O peptídeo 23290 induziu os maiores níveis de produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12.
- A maior expressão de citocinas elicítadas pelo peptídeo 23290, indicam o reconhecimento *ex vivo* de epítópos ativadores de memória imunológica, comprovando seu potencial imunogênico.
- As alterações histopatológicas em linfonodos de bovinos inoculados com amostra atenuada de *B. bovis* são mais intensas aos 12 dias após a primeira inoculação, caracterizada por formação de centros germinativos, hiperplasia da região paracortical e aumento da síntese de imunoglobulinas pelos plasmócitos.
- A apoptose é mais intensa nos cordões medulares e nos centros germinativos de animais inoculados com amostra atenuada de *B. bovis*.
- O modelo humano de dosagem de IFN- γ , TNF- α e IL-12 adotado no presente experimento se adequa a pesquisa de citocinas bovinas.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.K., POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000. 553p.
- AFONSO, L.C.C., SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- ANDERER, F.A., SCHLUMBERGER, H.D. Properties of different artificial antigens immunologically related to tobacco mosaic virus. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 97, n. 2, p. 503-509, 1965.

- ARNON, A., LEVI, R. Synthetic recombinant vaccines against viral agents. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 108, n. 4, p. 321-326, 1995.
- BEN-YEDIDIA, T., ARNON, R. Design of peptide and polypeptide vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 442-448, 1997.
- BOCK, R.E., DE VOS, A.J., KINGSTON, T.G., SHIELS, I.A., DALGLIESH, R.J. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. **Vet. Parasitol.**, v. 43, n. 1-2, p. 45-56, 1992.
- BOUSSO, P. KOURILSKY, P. A clonal view of $\alpha\beta$ T cell responses. **Semin. Immunol.**, v. 11, p. 423-431, 1999.
- BROWN, W.C., LOGAN, K.S., WAGNER, G.G., TETZLAFF, C.L. Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 7, p. 2418-2426, 1991.
- BROWN, W.C., PALMER, G.H., McELWAIN, T.F., HINES, A.S., DOBBELAERE, D.A. *Babesia bovis*: characterization of the T helper cell response against the 42 kilodalton merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p. 97-110, 1993a.
- BROWN, W.C., ZHAO, S., WOODS, V.M., DOBBELAERE, D.A.E., RICE-FIGHT, A.C. *Babesia bovis*-specific CD4+T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 46, n. 1-2, p. 65-69, 1993b.
- BROWN, W.C., WOODS, V.M., DOBBELAERE, D.A.E., LOGAN, K.S. Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis*-specific bovine CD4+ T cell clones activated *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 8, p. 3273-3281, 1993c.
- BROWN, W.C., LOGAN, K.S., ZHAO, S., BERGMAN, D.K., RICE-FICHT, A.C. Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous-flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper T cell clones derived from *B. bovis*-immune cattle. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 8, p. 3106-3116, 1995.
- BROWN, W.C., RODRIGUEZ, S.D., HOTZEL, I., RUEF, B.J., CHITKO-McKOWN, C.G., McELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Characterization of

- helper T cell responses against rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) of babesial parasites. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 271, p. 128-135, 1996a.
- BROWN, W.C., DAVIS, W.C., TUO, W. Human IL-12 upregulates proliferation and IFN- γ production by parasite antigen-stimulated Th cell clones and γ/δ T cell of cattle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, p. 321-324, 1996b.
- BROWN, W.C., RICE-FICHT, A.C., ESTES, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.63, p. 45-55, 1998a.
- BROWN, W.C., SHKAP, V., ZHU, D., McGUIRE, T.C., TUO, W., McELWAIN, T.F., PALMER, G.H. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998b.
- BROWN, W.C., PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 7, p. 275-281, 1999.
- BROWN, W.C., McELWAIN, T.F., PALMER, G.H., CHANTLER, S.E., ESTES, D.M. Bovine CD4+ T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 1, p. 155-164, 1999.
- BURKITT, H.G., YOUNG, B., HEATH, J.W. **Wheater – Histologia Funcional**. 3^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994. 409 p.
- CALLOW, L.L., MELLORS, L.T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. **Aust. Vet. J.**, v. 42, p. 464-465, 1966.
- CALLOW, L.L., MELLORS, L.J., MCGREGOR, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomised calves. **Int. J. Parasitol.**, v. 9, p. 333-338, 1979.
- CALLOW, L.L., DALGLIESH, R. J., DE VOS, A.J. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis – the longest field trial? **Int. J. Parasitol.**, v. 27, n. 7, p. 747-767, 1997.
- CAMACHO, S.A., KOSCO-VILBOIS, M.H., BEREK, C. The dynamic structure of the germinal center. **Immunol. Today**, v. 19, n. 11, p. 511-514, 1998.

- CHITKO-McKOWN, C.G., RUEF, B.J., RICE-FICHT, A.C., BROWN, W.C. Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 and interferon- γ but not interleukin-2 or interleukin-4 by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle cronicly infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 15, p. 915-922, 1995.
- CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. Prediction of the secondary structure of pteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 47, p. 45-148, 1978.
- COLLINS, R.A., HOWARD, C.J., DUGGAN, S.E., WERLING, D. Bovine interleukin-12 and modulation of IFN- γ production. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 68, p. 193-207, 1999.
- COURT, R.A., SITTE, K., OPPEBEECK, J.P., EAST, I.J. Mapping T cell epitopes on the *Babesia bovis* antigen 12D3: implications for vaccine design. **Parasite Immunol.**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 1998.
- COURT, R.A., JACKSON, L.A., LEE, R.P. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 19, p. 29-37, 2001.
- COX, F.E. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 1147-1157, 1997.
- DeLISI, C., BERZOFSKY, J.A. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, p. 7048-7052, 1985.
- ESTES, D.M., HIRANO, A., HEUSSLER, V.T., DOBBELAERE, D.A.E., BROWN, W.C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. **Cell. Immunol.**, v. 163, p. 268-279, 1995.
- FIorentino, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.
- FELL, A.H., CURRIER, J., GOOD, M.F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. **Parasite Immunol.**, v. 16, p. 579-586, 1994.

- FELL, A.H., SMITH, N.C. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? **Parasitol. Today**, v. 14, p.364-369, 1998.
- FU, Y-X, CHAPLIN, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 399-433, 1999.
- FULLER, K.A., KANAWA, O., NAHM, M.H. T cells within germinal centers are specific for the immunizing antigen. **J. Immunol.**, v. 151, p. 4505-4512, 1993.
- GALE, K.R., GARTSIDE, M.G., DIMMOCK, C.M., ZAKRZEWSKI, H., LEATCH, G. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. **Parasitol. Res.**, v. 82, p. 551-562, 1996.
- GOFF, W.L., JOHNSON, W.C., CLUFF, C.W. *Babesia bovis* immunity – *in vitro* and *in vivo* evidence for IL-10 regulation of IFN- γ and iNOS. **Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 849, p. 161-180, 1998.
- GORDON, D.M., McGOVERN, T.W., KRZYCH, V., COHEN, J.C., SCHNEIDER, I., LaCHANCE, R., HEPPNER, D.G., HOLLINGDALE, M., SLAOVI, M. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 576-585, 1995.
- GRAU, G.E., PIGUET, P.F., VASSALI, P., LAMBERT, P.H. Tumor necrosis factor and other cytokines in malaria: experimental and clinical data. **Immunol. Rev.**, v. 112, p. 49-70, 1989.
- GULBRANSON-JUDGE; A., MacLENNAN, I.C.M. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1830-1837, 1996.
- GULBRANSON-JUDGE, A., CASAMAYOR-PALLEJA, M., MacLENNAN, I.C.M. Mutually dependent T and B cell responses in germinal centers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 815, p. 199-210, 1997.
- HAN, S., ZHENG, B., TAKAHASHI, Y., KELSOE, G. Distinctive characteristics of germinal center B cells. **Semin. Immunol.**, v. 9, p. 255-260, 1997.

- HARDIE, D.L., JOHNSON, G.D., MacLENNAN, I.C.M. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments in germinal centers. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 997-1004, 1993.
- HINES, S.A., PALMER, G.H., JASMER, D.P., GOFF, W.L., McELWAIN, T.F. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 1, p. 349-352, 1995.
- HOLLOWOOD, K., GOODLAD, J.R. Germinal centre cell kinetics. **J. Pathol.**, v. 185, p. 229-233, 1998.
- HOOP, T.P., WOODS, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 6, p. 3824-3828, 1981.
- HUGHES, A.L., YAGER, M. natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annu. Rev. Genet.**, v. 32, p. 415-435, 1998.
- HUR, D.Y., KIM, D.J., KIM, S., KIM, Y.I., CHO, D., LEE, D., HWANG, Y-I., BAE, K-W., CHANG, K.Y., LEE, W.J. Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. **Immunol. Letters**, v. 72, p. 107-111, 2000.
- IGARASHI, I., SUZUKI, R., WAKI, S., TAGAWA, Y., SENG, S., TUM, S., OMATA, Y., SAITO, A., NAGASAWA, H., IWAKURA, Y., SUZUKI, N., MIKAMI, T., TOYODA, Y. Roles of CD4+ T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4143-4148, 1999.
- JACKSON, D.C., FITZMAURICE, C.J., BROWN, L.E., ZENG, W. Preparation and properties of totally synthetic immunogens. **Vaccine**, v. 18, p. 355-361, 2000.
- JACOB, J., KASSIR, R., KELSOE, G. *In situ* studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1165-1175, 1991.
- JOHNSON, W.C., CLUFF, C.W., GOFF, W.L., WYATT, C.R. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and polyamine degradation products are babesiacidal *in vitro*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 791, p. 136-147, 1996.

- KENNETH, G.C.S., AMANDA, L., NOSSAL, G.J.V., TARLINTON, D.M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, v. 16, n. 11, p. 2996-3006, 1997.
- KELSO, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? **Immunol. Today**, v. 16, p. 374-379, 1995.
- KELSOE, G. *In situ* studies of the germinal center reaction. **Adv. Immunol.**, v. 60, p. 267-288, 1995.
- KIRBERG, J., BRUNO, L., VON BOEHMER, H. CD4+8- help prevents rapid depletion of CD8+ cells after transient response to antigen. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 1963-1967, 1993.
- KLEIN, J., TAKAHATA, N., AYALA, F.J. MHC Polimorphism and human origins. **Sci. Am.**, v. 269, n. 6, p. 78-83, 1993.
- KOSKO-VILBOIS, M.H., ZENTGRAF, H., GERDES, J., BONNEFOY, J-Y. To 'B' or not to 'B' a germinal center? **Immunol. Today**, v. 18, n. 5, p. 225-229, 1997.
- KUMARATILAKE, L.M., FERRANTE, A. Il-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro. A possible parasite-immune evasion mechanism. **J. Immunol.**, v. 149, p. 194-199, 1992.
- KYTE, J., DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.
- LEVY, M.G., RISTIC, M. *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. **Science**, 207: 1218-1220, 1980.
- LINTON, P-J., LAI, L., LO, D., THORBECKE, G.J., KLINMAN, N.R. Among naive precursor cell subpopulations only progenitors of memory B cells originate germinal centers. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 1293-1297, 1992.
- LIU, Y.J, ZHANG, J., LANE, P.L.J., CHAN, E. Y-T., MacLENNAN, I.C.M. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p. 2951-2962, 1991.

- LIU, Y.J., BOUTEILLER, O., FUGIER-VIVIER, I. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p. 256-262, 1997.
- LOSOS, G.J. **Infections tropical diseases of domestic animals**. New York: Churchill Livingstone, 1986, 1938p.
- MacLENNAN, I.C.M. Germinal Centers. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 117-139, 1994.
- MAHONEY, D.F., WRIGHT, I.G. *Babesia argentina*: immunization of cattle with a killed antigen against infection with heterologous strain. **Vet. Parasitol**, v. 2, p. 273-282, 1976.
- MAHONEY, D.F., WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infection with parasites of various origin. **Aust. Vet. J.**, v. 55, p. 10-12, 1979.
- MAHONEY, D.F. In **The ruminant immune system in health and disease** (Morrison, W.I., ed.), Cambridge University Press, p. 539-545, 1986.
- MANETTI, R., GEROSA, F., GIUDIZI, M.G., BIAGIOTTI, R., PARRONCHI, P., PICCINI, M.P., SAMPAGNARO, S., MAGGI, E., ROMAGNANI, S., TRIANCHIERI, G. Interleukin-12 induces stable priming for interferon- γ (IFN- γ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- γ production in established Th2 cell clones. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1273-1283, 1994.
- McGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, v. 38, p. 249-256, 1979.
- MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149, 1963.
- MORRISON, W.I.; LALOR, P.A.; CHRISTENSEN, A.K. e WEBSTER, P. Cellular constituents and structural organization of bovine thymus and lymph node. In: **The ruminant immune system in health and disease** (Morrison, W.I.), Cambridge University, 1986.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIELDIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone: I. Definition

- according two profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- NEURATH, A.R., KENT, S.B. Requiriments for successfull synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur/Virol**, v. 137E, p. 513-514, 1986.
- NOSSAL, G.J.V., KARVELAS, M., PULENDRAN, B. Soluble antigen profoundly reduces memory B-cell number even when given after challenge immunization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 3088-3092, 1993.
- OLIVEIRA, R.O. **Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos.** Viçosa: UFV, 1998. 63p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- ORINDA, G.O., GALE, K.R., WRIGHT, I.G., PARRODI, F. Bovine babesiosis: failure to induce interferon gamma production in response to *Babesia bovis* antigens in cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 22, n.3, p. 395-398, 1992.
- PALMER, G.H., McELWAIN, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 233-253, 1995.
- PATARROYO, G., FRANCO, L., AMADOR, R., MORILLO, La, ROCHA, C.A., ROGHA, M., PATARROYO, M.E. Study of the safety and immunogenicity of synthetic malaria SPf66 vaccine in children age 1-14 years. **Vaccine**, v. 10, p. 175-178, 1992.
- PATARROYO, J.H., PRATES, A.A., TAVARES, C.A.P., MAFRA, C.L., VARGAS, M.I. Exoantigens of na attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v. 59, n. 3-4, p. 189-199, 1995.
- PATARROYO, J.H, VARGAS, M.I., FREITAS, C.M., MACEDO, P.A., PRATES, A.A., PORTELA, R.W., CAETANO, B.C. Mapeamento de epítapos T-reativos da proteína Bv 60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária.** Salvador, p.197, 1999.
- PORTELA, R.W.D. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógenos no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).** Viçosa: UFV, 2000. 87p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2000.

- PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology.** Washington, 1992. 274p.
- REARDON, M.J., PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Pathol.**, v. 18, p. 48-61, 1981.
- RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis.** London: Academic Press, 1981. 589p.
- RODRIGUEZ, S.D., PALMER, G.H., McELWAIN, T.F., McGUIRE, T.C., RUEF, B.J., CHITKO-McKOWN, C.G., BROWN, W.C. CD4+ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2079, 2087, 1996.
- SCAFFIDI, C., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 277-285, 1999.
- SEGUNDO, C., MEDINA, F., RODRIGUEZ, C., MARTINEZ-PALENCIA, R., LEYVA-COBÍAN, F., BRIEVA, J.A. Surface molecule loss and B1b formation by human germinal center B cells undergoing apoptosis: role of apoptotic clebs in monocyte chemotaxis. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1012-1020, 1999.
- SPOUGE, J.L., GUY, H.R., CORNETTE, J.L., MARGALIT, H., CEASE, K., BERZOFSKY, J.A., DeLISI, C. Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. **J. Immunol.**, v. 138, n. 1, p. 204-212, 1987.
- STICH, R.W., SHODA, L.K.M., DREEWES, M., ADLER, B., JUNGI, T.W., BROWN, W.C. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 9, p. 4130-4136, 1998.
- STICH, R.W., RICE-FIGHT, A.C., BROWN, W.C. *Babesia bovis*: common protein fractions recognized by oligoclonal *B. bovis*-specific CD4+ T cell lines from genetically diverse cattle. **Exp. Parasitol.**, v. 91, p. 40-51, 1999.
- STREICHER, H.Z., BERKOWER, I.J., BUSCH, M., GURD, F.R.N., BERZOFSKY, J.A. Antigen conformation determines processing requirements for T-cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, p. 6831-6835, 1984.
- SUAREZ, C.E., PALMER, G.H., HINES, S.A., McELWAIN, T.F. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct

- from sequences conserved between species. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 8, p. 3511-3517, 1993.
- SUAREZ, C.E., PALMER, G.H., HOTZEL, I., McELWAIN, T.F. Structure, sequence and transcriptional analysis of the *Babesia bovis rap-1* multigene locus. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 93, p. 215-224, 1998.
- TANCHOT, C., ROCHA, B. The organization of mature T-cell pools. **Immunol. Today**, v. 19, n. 12, p. 575-579, 1998.
- TARLINTON, D.M., SMITH, K.G. Apoptosis and the cell response to antigen. **Int. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 53-71, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, A.W. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 334-342, 1995.
- THORBECKE, G.J., AMIN, A.R., TSIAGBE, V.K. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. **FASEB J.**, v. 8, p. 832-840, 1994.
- TIMMS, P., DALGLIESH, R.J., BARRY, D.N., DIMMOCK, C.K., RODWELL, B.J. *Babesia bovis*: comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. **Aust. Vet. J.**, v. 60: 75-77, 1983.
- TIMMS, P., STEWARD, N.P. Immune responses of cattle following vaccination with living and non-living *Babesia bovis* antigens. **Vet. Parasitol.**, v. 16, n. 3-4, p. 243-251, 1984.
- TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology**, 2th ed., Saunders WBCo, 2000, 482p.
- TODOROVIC, R.A. Bovine babesiasis: its diagnostic and control. **Am. J. Vet. Res.**, v. 35, n. 8, p.1045-52, 1974.
- TOGNA, A.R., DEL GIUDICE, G., VERDINI, A.S., BONELLI, F., PESSI, A., ENGERS, H.D., CORRADIN, G. Synthetic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite peptides elicit heterogeneous L3T4+ T cell proliferative responses in H-2^b mice. **J. Immunol.**, v. 137, n. 9, p. 2956-2960, 1986.
- TSIAGBE, V.K., LINTON, P-J., THORBECKE, G.J. The path of memory B cell development. **Immunol. Rev.**, v. 126, p. 113-141, 1992.

- TUO, W., ESTES, D.M., BROWN, W.C. Comparative effects of interleukin-12 and interleukin-4 on cytokine responses by antigen-stimulated memory CD4⁺ T cells of cattle: IL-12 enhances IFN- γ production, whereas IL-4 has marginal effects on cytokine expression. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 19, p. 741-749, 1999.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. In: **Babesiosis of domestic animals and man.** (Ristic, M.) CRC Press, p. 99-118, 1988.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., CLARK, I.A. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. **Parasitol. Today**, v. 4, p. 214-218, 1988.
- WRIGHT, I.G., CASU, R., COMMINS, M.A., DALRYMPLE, B.P., GALE, K.R., GOODGER, B.V., RIDDLES, P.W., WALTISBUHL, D.J., ABETZ, I., BERRIE, D.A. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. **Vet. Parasitol.**, v. 44 (1-2), p. 3-13, 1992.
- ZHENG, B., HAN, S., ZHU, Q., GOLDSBY, R., KELSOE, G. Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. **Nature**, v. 384, p. 263-266, 1996.
- ZOU, J.J., SCHOENHAUT, D.S., CARVAJAL, D.M., WARRIER, R.R., PRESKY, D.H., GATELY, M.K., GUBLER, U. Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin-12. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5864-5871, 1995.