

CLAUDIA ZULEIDA GONZÁLEZ LOMBANA

**RESPOSTA IMUNE DE BOVINOS VACINADOS COM PEPTÍDEO SINTÉTICO
SBm7462 COM VISTAS AO CONTROLE DO *Boophilus microplus*
(CANESTRINI, 1887)**

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
2003

CLAUDIA ZULEIDA GONZÁLEZ LOMBANA

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

APROVADA: 19 de Dezembro de 2003

Prof^a Marlene I. Vargas Vilória
(Conselheira)

Prof. Olindo Assis Martins Filho

Antonio Marcos Guimarães

Prof. Luis Carlos Crocco Afonso

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

*A Dios,
A mi familia,
Mis padres: Gladys y Jaime.
Mis Hermanas: Lili, Yane, Maga e Ivonne.
Mi soporte,
Y quienes siempre creyeron en mí.
Dedico este trabajo.*

AGRADECIMENTOS

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

Aos quem me ensinaram a nadar contra corrente, meus amados pais, *Gladys e Jaime*;

As minhas irmãs, *Lili, Yane, Maga e Ivonne* e aos meus sobrinhos, pelo amor, e quem sempre me incentivaram, por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus professores Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio pela valiosa orientação, pelo carinho e amizade em todo este tempo e por ser mais que meus professores, meus amigos.

Ao PRODETAB (Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil), e à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte financeiro e estrutural indispensáveis para a realização deste trabalho.

À *Universidad Del Tolima*, (Colômbia) pela formação dada.

Ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por contribuírem na formação científica.

Ao Dr. Olindo Assis Martins-Filho pela colaboração profissional e por disponibilizar o uso do seu laboratório;

Ao Dr. Luis Carlos Crocó pelas valiosas sugestões nesse trabalho e colaboração;

Ao Marcinho e Aline pela amizade e a assessoria técnica nos momentos de dificuldade.

Ao José Carlos, Cauzinho e Waldir por toda a colaboração e cuidados

nos tratos com os animais no isolamento;

Ao Policarpo pela sua amizade e por sobre todo pela sua paciência comigo .

Aos amigos do laboratório de Biologia e controle de Hematozoários (BIOAGRO): Ana Paula, Carla, Carlos, Dani, Fabi, Ferdinan, Jorge, Larissa, Liza, Michelle, Priscilla, Raul e Sidimar pela colaboração e principalmente pela amizade;

Aos Amigos do Laboratório de Imunoparasitologia da UFOP: Juaciane, Cássio, Eduardo, Roberta, Juliana, Érika pela disposição e acolhida.

Aos amigos do laboratório de Doenças de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou, Ana Paula, Danielle, Renato, Maria Luisa, Lili pela amizade, agradável convivência.

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

Aos funcionários dos Laboratórios de Histopatologia e Clínica do Departamento de Veterinária.

À Rose pela valiosa ajuda e disposição em todo momento.

As minhas melhores amigas Alba, Glória, Irma, Mayra e Pilar Ximena pela convivência e apoio único e incondicional nos momentos difíceis.

A minha amiga Carol pelo sorriso sempre amigo, e pela sua disposição para me ajudar.

Ao Ramón pela sua amizade incondicional e por ter me dado a força no momento certo.

Aos amigos da Colômbia que ainda estão aqui Cármen, Catalina, Dina, Everaldo, Juan José, Lucho, Omar, e aos que já foram embora, Claudia, Fabio, Leonardo, Liliana, Juan Carlos, Mônica, Teresa e Rodrigo , pelo companheirismo e a amizade.

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

BIOGRAFIA

CLAUDIA ZULEIDA GONZÁLEZ LOMBANA, filha de Jaime González Garcia e Maria Gladys Lombana, nascida em 16 de novembro de 1975, na cidade de Ibagué-Tolima-Colômbia.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da *Universidad del Tolima* na Colômbia em 1994, concluindo sua graduação no ano 2000.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2001.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 Resposta imune induzida por antígenos	6
3.1.1 Resposta em tecido Linfóide.....	9
3.2 Resposta imune ao carrapato	11
3.2.1 Imunidade contra antígenos convencionais.....	11
3.2.2 Imunidade a antígenos ocultos.....	13
3.3 Populações celulares circulantes nas respostas imunes: Distribuição e Função.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Imunização dos animais	19
4.2 Determinação Sorológica.....	20
4.2.1 Teste de ELISA anti-SBm7462 para mensuração da resposta imune humoral.....	20
4.2.2 Teste de ELISA para detecção de IgG1 e IgG2 bovina específica.	21
4.3 Estimulação de células monocíticas de sangue periférico Bovino (PMBC).....	22
4.4 Dosagem de IFN- γ e TNF- α a partir de sobrenadante de cultivo de PBMC através do teste de ELISA.....	23
4.5 Histologia de linfonodos bovinos.....	24
4.6 Técnica de TUNEL em linfonodos bovinos para detecção de apoptose.....	24
4.7 Imunohistoquímica para identificação do peptídeo sintético SBm7462.....	25

4.8	Imunofenotipagem de linfócitos do sangue periférico (PBL).....	26
4.9	Análise Estatística.....	28
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Resposta de anticorpos anti-SBm7462 em bovinos imunizados ..	31
5.2	Avaliação Histológica dos linfonodos pré-escapulares.....	35
5.3	Avaliação imunohistoquímica dos linfonodos pre-escapulares.....	42
5.3.1	Apoptose.....	42
5.3.2	Imunohistoquímica para detecção de antígeno SBm7462.	45
5.4	Efeitos da imunização com SBm7462 nas subpopulações de linfócitos circulantes bovinos.....	50
5.4.1	Distribuição de linfócitos T, B e células não T não B (NTNB)	50
5.4.2	Distribuição de dos linfócitos T CD4 ⁺ ,CD8 ⁺ e WC1 ⁺ em sangue periférico.....	52
5.4.3	Relação de linfócitos T/B e TCD4 ⁺ /CD8 ⁺ em sangue periférico.....	55
6.	CONCLUSÕES.....	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido Etileno diamino tetracético
APC	Célula apresentadora de antígeno
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
Bm86	Proteína do intestino medio de <i>Boophilus microplus</i>
CD21	Grupo de diferenciação antigenico 21
CD28	Grupo de diferenciação antigenico 28
CD40	Grupo de diferenciação antigenico 40
CD40L	Ligante de CD40
CF	Citometria de Fluxo
CGs	Centros Germinais
Con-A	Concanavalina A
CXCR5	Receptor celular 5 de quimiocina CXC
DO	Densidade óptica
DVT	Departamento de Veterinária
Fc	Fração cristalizável
FDC	Célula Dendrítica Folicular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>g</i>	Gravidade
H/Z	Holandês por zebú
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
Igs	Imunoglobulinas
IL-4	Interleucina 4
LBCH	Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIP1a	proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
ml	mililitros
mM	milimolar
NK	Células matadoras naturais
OPD	Orto fenildiamine
OX40	Molécula de superfície OX40
OX40L	Ligante da molécula de superfície OX40
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PBL	Linfócitos de sangue periférico
PBMC	células mononucleares de sangue periférico

PBS	Tampão fosfato salino
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
q.s.p	quantidade suficiente para
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
SBm7462	<i>Synthetic Boophilus microplus 7462</i>
SCID	Imunodeficiência severa combinada
SFB	Soro Fetal Bovino
SMF	Sistema monocítico fagocitário
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
Th1	Resposta imune tipo 1
Th2	Resposta imune tipo 2
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI	Unidades Internacionais
WC1	<i>Workshop cluster 1</i>

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Perfil dos leucócitos periféricos bovinos obtidos de sangue periférico congelado após a lise de eritrócitos com solução de lise (FACS™ Lysing Solution). R1 população linfocítica analisada.	29
Figura 2: Representação gráfica da intensidade na fluorescência de linfócitos bovinos obtidos de PBL congelado após a imunofenotipagem. Linfócitos sem adição de anticorpo A . A população marcada com anticorpos específicos para linfócitos T CD4 ⁺ (B), CD8 ⁺ (C), WC1 ⁺ (D) e CD21 ⁺ (E) está apresentada como porcentagem de células fluorescentes no quadrante inferior direito. FL 1 fluorescência 1 e FL 2 Fluorescência 2.	30
Figura 3: Cinética da produção de IgGs e isotipos IgG1, IgG2 em bovinos imunizados com SBm7462. A . Valores em médias das absorvâncias dos anticorpos IgGs antígeno-específicos em imunizados e controles. B . Valores em médias das absorvâncias de IgG1 e IgG2 em animais imunizados. As barras em T representam os desvios padrões para mais e para menos e as setas indicam os dias das inoculações.	34
Figura 4: Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. A Hiperplasia da região paracortical (pc) sete dias após primeira imunização. H&E, 100X. B . Controle negativo. C . Região medular (rm) sete dias após primeira imunização. D . Região medular cinco dias após segunda imunização com evidente hiperplasia de cordões medulares (cm.. H&E, 200X. (sm) seios medulares.	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5:** Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. Sete **(A)** e quinze **(B)** dias após primeira imunização, mostrando hiperplasia folicular com formação de Centro Germinal caracterizado pela zona clara (zc) e zona escura (ze) delimitadas por células do manto (m), H&E, 400X. **C.** Região da zona escura correspondente à figura B, com células em mitose (setas) e células blásticas (b). H&E, 1000X. 39
- Figura 6:** Linfonodos de Bovinos imunizados com SBm7462. Quinze dias após primeira inoculação **A.** Células TUNEL⁺ (setas) localizadas, na zona escura do centro germinal (cg) 200X.. e nos cordões medulares (cm) TUNEL 200X **(B).** (c) cortical. 46
- Figura 7:** Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. **A.** Células TUNEL⁺ Nas zonas T-dependentes da região paracortical, sete dias após primeira imunização. TUNEL 1000X. **B.** Células TUNEL⁺ na região medular profunda (setas) cinco dias após segunda imunização. TUNEL 1000X. 47
- Figura 8:** Linfonodos de Bovinos imunizados com Sbm7462 apresentando células Dendríticas Foliculares **PAP+** (setas). **A.** Sete dias após primeira imunização. **B.** Cinco dias após segunda imunização. **C.** Controle. PAP, 1000X. 49
- Figura 9:** Representação das mudanças de populações de leucócitos circulantes em bovinos após a imunização com SBm7462 ($n=3$). **A.** Células T, B e NTNB. **B.** linfócitos T WC1 T $\gamma\delta$, CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados estão apresentados como médias das percentagens de células circulantes obtidas de PBL congelado e analisadas por citometria de fluxo. 60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Anticorpos Usados	28
Tabela 2: Médias das porcentagens das células T totais (CD4 ⁺ +CD8 ⁺ + WC1 ⁺), B CD21 ⁺ e NTNB de leucócitos do sangue periférico (PBL) congelado proveniente de bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As imunizações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.	53
Tabela 3: Médias das porcentagens dos linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e WC1 ⁺ obtidos de PBL congelado de Bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As inoculações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.	57
Tabela 4: Médias da relação das porcentagens dos linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ e T/B obtidos de PBL congelado de bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As inoculações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.	58

RESUMO

GONZÁLEZ LOMBANA, Claudia M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003. **Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *boophilus microplus* (CANESTRINI,1887)**. Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e João Carlos Pereira da Silva.

Bovinos entre três e quatro meses de idade, que receberam, por via subcutânea, três imunizações alternadas a cada 30 dias, do SBm7462 emulsionado em saponina, foram avaliados quanto ao desenvolvimento da resposta imune humoral e celular. Para isto foram realizados a identificação de isotipos IgG1 e IgG2 antígeno-específicos, determinação do perfil de linfócitos circulantes (CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e WC1⁺) por citometria de fluxo e seguimento dos eventos microscópicos ocorridos em linfonodos através de técnicas diferenciais e de imunohistoquímica. A análise sorológica mostrou que o SBm7462 estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isótipo IgG1 sobre o isótipo IgG2 ($p < 0.05$). Os estudos histológicos mostraram ativação da resposta imune a partir do sétimo dia após a primeira imunização e reatividade evidente de centros germinativos quinze dias após a primeira imunização. A hiperplasia dos cordões medulares foi mais evidente cinco dias após a segunda imunização. Os grupos de células apoptóticas foram detectados em todas as regiões dos linfonodos dos animais imunizados e em maior proporção em relação aos animais controle. O antígeno SBm7462

foi detectado em células SBm7462 positivas durante todo o experimento, e concomitantemente às alterações histológicas em órgãos linfóides. Quando foi determinada a composição fenotípica dos linfócitos de sangue periférico circulantes, observou-se um aumento progressivo de linfócitos CD21+ no decorrer do experimento. Não houve variação estatisticamente significativa no número total de linfócitos T, embora tenha sido observado um incremento de linfócitos TCD4+ e WC1⁺ cinco dias após a segunda imunização. Sobre esses achados, pode se considerar que o peptídeo sintético SBm7462 induz eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolve mecanismos do sistema imune tanto celulares quanto humorais.

ABSTRACT

GONZÁLEZ LOMBANA, Claudia M.S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2003. **Immune response of vaccinated bovine with synthetic peptide SBm7462 to the control of the *Boophilus microplus* (CANESTRINI,1887)**. Advisor: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilória and João Carlos Pereira da Silva.

Bovines of three and four month of old age received monthly and subcutaneously, three immunizations of synthetic peptide SBm7462 emulsified in saponin. The development both cellular and humoral immune response were evaluated. It's was achieved identifying the IgG1 and IgG2 antigen specific isotypes, determining of the profile of circulating lymphocytes (CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ and WC1⁺) by flow citometry and following of the microscopic events in lymphonodes using histology and immunochemistry techniques. Serologic analysis showed stimulation of the production of antigen-specific immunoglobulin by SBm7462, with predominance of the IgG1 isotype over IgG2 isotype ($p < 0.05$). The histology analysis revealed the activation of the response immune beginning at the seventh day after the first immunization and reactivity evident of germinal centers fifteen days after first immunization. Medullars cords hyperplasia was more evident five days after the second immunization. Clusters of apoptotics cells were detected in entire of the lymphonodes of immunized animals and were more abundant that in control animals. SBm7462antigen was detected in SBm7462 positive cells during whole experiment, and simultaneous to the histology alterations in

lymphonodes. Evaluating phenotypic composition of the of peripheral blood lymphocytes, a progressive increase of CD21⁺ lymphocytes was detected. The variation in total number of T lymphocytes were not statistically significant, although an increment of TCD4⁺ and WC1⁺ lymphocytes was observed five days after second immunization. It's suggested that the SBm7462 synthetic peptide induces an antigen-specific immune response which involves mechanisms of the immune system cellular and humoral.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) é considerado o principal ectoparasita de importância econômica, não só pela sua capacidade de causar danos sobre o hospedeiro, devido à hematofagia, inoculação de toxinas, depreciação do couro e transmissão de múltiplos patógenos, como hemoparasitas (PATARROYO, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 1998), causando taxas elevadas de morbidade e mortalidade, como também pela sua ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais.

Cerca de 80% da população mundial de gado bovino está exposta a este parasita e às enfermidades por ele transmitidas. Estima-se que os custos com o seu combate e as perdas de produtividade têm aumentado consideravelmente com o tempo. Só no Brasil, os prejuízos na produtividade causados por este parasita atingem a cifra de um bilhão de dólares anuais, e o gasto com acaricidas representa 15% do gasto total do país em defensivos (HORN & ARTECHE, 1985)

De muitas décadas atrás, até a atualidade, o controle do carrapato *B. microplus* tem sido restrito principalmente ao uso de diferentes agentes químicos. Não obstante, o alto custo da sua aplicação sistemática, a emergência de cepas resistentes aos fármacos e a presença de resíduos de

implicação ambiental, tem gerado um grande questionamento sobre o uso destes nos animais domésticos.

De fato a dependência exclusiva de compostos químicos se tornou uma das principais preocupações científicas, econômicas e sociais, e enfatizou a necessidade de desenvolver e introduzir métodos alternativos que sejam consistentes com os princípios da agricultura sustentável. Entre eles se incluem programas de manejo de habitat, seleção genética de hospedeiros e, mais promissoramente, o desenvolvimento de vacinas capazes de induzir imunidade do hospedeiro aos ixodídeos.

As vacinas oferecem esses requisitos e vantagens como a especificidade das espécies alvo, ausência de resíduos e incremento da resistência conferida pela imunidade.

Sobre esta premissa, a partir de 1980, quando foi definido o conceito de “antígenos ocultos” (ACKERMAN *et al.*, 1980), o qual está relacionado com a indução de uma resposta imune contra um antígeno alvo não exposto na inter-relação natural parasita-hospedeiro (WILLADSEN *et al.*, 1989), tem sido induzida a imunidade protetora em bovinos.

Essa imunidade foi primeiramente obtida após inoculação de antígenos do intestino médio de *B. microplus* (JOHNSTON *et al.*, 1986; OPDEBEECK *et al.*, 1988), e posteriormente com o uso de uma glicoproteína de 89 kDa (Bm86), purificada das microvilosidades das células epiteliais do intestino do carrapato (WILLADSEN *et al.*, 1989; GOUGH e KEMP, 1993) ou com sua produção em massa como vacina recombinante (RAND *et al.*, 1989; TURNBULL *et al.*, 1990; TELLAM *et al.*, 1992).

Foi com essa vacina recombinante que desde 1994 estabeleceram-se programas de vacinação contra o carrapato, e a qual induziu diferentes índices de eficiência (SMITH *et al.*, 1995; WILLADSEN, 1997). No entanto foram demonstrados graus variáveis de susceptibilidade nas vacinações com Bm86 (COBON *et al.*, 1995), e evidências de pequenas variações da proteína nativa entre diferentes cepas (DE LA FUENTE *et al.*, 2000).

Atualmente têm sido desenvolvidos outros antígenos protetores, como os peptídeos sintéticos, capazes de controlar populações de *B. microplus*, oferecendo vantagens tais como alto grau de pureza, completa caracterização

química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade, baixo custo de produção, estabilidade (NEURATH e KENT, 1986), ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes e de evasão, típicos de microrganismos.

Nesse contexto, pesquisas desenvolvidas por PATARROYO *et al.* (2002) demonstraram uma eficiência de 81,05% para o peptídeo SBm7462¹ e confirmaram ainda interações *in situ* dos anticorpos por ele induzidos, no intestino do carrapato.

A partir desta pesquisa, PIMENTEL (2002) avaliou o peptídeo SBm7462 como imunógeno em diferentes doses para o controle do *B. microplus* em animais de raça holandesa no campo e estabulados, utilizando a cepa “Porto Alegre” de *B. microplus*. Confirmando mais uma vez, que o peptídeo SBm7462 induz uma resposta imune protetora contra esta cepa nos bovinos, com uma eficácia de 53,29%, considerando os parâmetros biológicos do *B. microplus*.

O conhecimento do ambiente imunológico no qual a resposta imune é processada, é de vital importância no aprimoramento da eficiência de uma vacina, uma vez que as vias de inoculação, os adjuvantes e as doses escolhidas, são dependentes deste conhecimento.

Tendo em vista o exposto anteriormente, o intuito deste trabalho foi iniciar estudos sobre os diferentes eventos que poderiam estar envolvidos nos mecanismos da resposta imune a imunógenos sintéticos.

¹ Pedido de Patente Nacional = PI 0001717-5. Pedido de Patente Internacional = PCT/BR01/00057

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a resposta imune humoral e celular em bovinos imunizados com o peptídeo sintético SBm7462.

2.2 Objetivos específicos

-Determinar a dinâmica da resposta humoral por IgG e o isotipo predominante induzido pela inoculação do peptídeo sintético SBm7462.

-Identificar cronologicamente o desenvolvimento da resposta imune em linfonodos bovinos imunizados com o SBm7462.

-Estudar a dinâmica das alterações microscópicas dos folículos linfóides e centros germinais de linfonodos periféricos em animais imunizados.

-Constatar a apoptose *in situ* induzida pelo SBm7462 sobre células linfocíticas.

-Identificar a presença de antígeno em nódulos linfóides de animais imunizados.

- Analisar o efeito do SBm7462 no perfil leucocítico de sangue periférico em animais submetidos a imunização.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resposta imune induzida por antígenos

Em geral, a imunorregulação a qualquer antígeno do tipo protéico difere em relação aos tipos celulares envolvidos, às citocinas, mediadores secretados e efeitos supressores ou indutores destes sobre as respostas imunes (COX, 1997; BROWN *et al.*, 1998). Considera-se também que a influência de fatores ambientais e genéticos que atuam em nível de apresentação do antígeno, determinado por sua vez, pela via de exposição e forma física (TOELLNER *et al.*, 1998), além do tipo e dose do adjuvante associado são fatores responsáveis pela polarização da resposta imune específica dentro de um perfil dominante Th1/Th2 (ROMAGNANI, 1997).

É por isso que toda resposta imune dependente de células T encontra-se relacionada com a eficiente captura e internalização do antígeno e a sua apresentação às células TCD4⁺, o qual permite a montagem da resposta imune através da produção de citocinas.

Vários trabalhos têm desenvolvido técnicas de mensuração da expressão de citocinas em bovinos, devido ao fato de que o INF- γ e a IL-4 são fortes indicadores de respostas Th1 e Th2 e que a maneira na qual os animais são vacinados pode ter um impacto significativo sobre o estado desta resposta.

Dessa maneira, o reconhecimento ou não de complexos peptídeo-MHC-II pela célula TCD4+ e a indução de uma resposta primária com produção de citocinas IL-4 produzidas por linfócitos TCD4+, encontra-se diretamente associada com o tipo de resposta e a produção de isotipos específicos de imunoglobulinas IgG1(Th2) mais do que de anticorpos específicos IgG2 (Th1) (TOELLNER,1998)

Embora em camundongos e humanos a IL-12 tenha uma ação imunorreguladora diferencial sobre as células T CD4⁺, existem trabalhos que sumarizam efeitos não relacionados dessas interleucinas nas populações de células T bovinas quando comparadas com camundongos e o homem. Assim, em camundongos, a IL-12 seletivamente aumenta a proliferação e produção de INF γ por clones Th1, sem efeito nos clones Th0 ou Th2; em oposição, clones Th1 ou Th2 humanos incrementam a expressão de INF γ . Não obstante, em células T bovinas, devido ao efeito imunorregulador das citocinas IL-10 e IL-4, os efeitos da IL-12 sobre estes clones diferem dos casos murinos e de alguns casos humanos (BROWN *et al.*, 1996)

As citocinas desempenham importantes funções imunorreguladoras sobre células T diferenciadas. Com efeito 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) (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.

A resposta imune de humanos e bovinos contra determinados antígenos é heterogênea, existindo uma predominância da resposta do tipo Th1 ou Th2 (BROWN *et al.*, 1993). Essa heterogeneidade relaciona-se com o perfil de citocinas produzidas e secretadas. Pesquisas realizadas com clones específicos de células T CD4+ bovinas contra *Babesia 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.*, 1998).

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 a produção de IFN- γ em todos os subtipos de clones Th analisados (Th0, Th1 e Th2), embora, não tenha sido observado aumento significativo na taxa de proliferação celular (MANETTI *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1996). 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 podia inibir, ou não apresentava efeito algum e em alguns casos aumentava sutilmente a produção de IFN- γ . ESTES *et al.* (1995) afirmaram que esta interleucina não é um fator de crescimento de células Th2, sendo diferente do observado em camundongos. No entanto, em relação à linhagem B, muitas das atividades reguladoras são conservadas.

Então, esses resultados parecem mostrar que em humanos e bovinos o paradigma das respostas Th1/Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986), 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 *Babesia bovis*, foi analisado 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).

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 desta última por linfócitos B é induzida pela interleucina-4 (IL-4) enquanto 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 , 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.

3.1.1 Resposta em tecido linfóide

Nos órgãos linfóides secundários, a resposta imune a peptídeos, caracteriza-se por ser T-dependente, requerendo estritamente a interação cognata de células APC, T e B.

A diferenciação de células B reguladas por linfócitos T começa com a ativação e migração de células dendríticas às zonas T dos linfonodos que drenam as áreas do tecido exposto ao antígeno protéico. A captação do antígeno, processamento e sua apresentação dentro do contexto MHC II, permitem a interação da célula dendrítica ativada e a célula T auxiliar não primada e o posterior início de uma sinapse imune, a qual gera a expansão de clones antígeno-específicos tanto de células T quanto B (GULBRANSON-JUDGE *et al.*, 1996).

A interação entre células T e B antígeno-específicas ativadas progride com a proliferação de células B, algumas, prematuramente, se diferenciam em plasmócitos nas zonas parafoliculares, com a conseqüente produção de anticorpos de vida curta não diversificados somaticamente, enquanto outras, junto com as células TCD4⁺ são induzidas a migrarem aos folículos linfóides primários, estimulando a formação de centros germinais (CGs) antígeno-específicos altamente reativos.

WALKER *et al.* (2000), destacam o papel que tem a presença do linfócito TCD4⁺ na geração de uma resposta imune de memória e notavelmente antígeno-específica e a participação da célula dendrítica na migração da célula T ao folículo. Trabalhos *in vitro* feitos em camundongos, sustentam que a ativação das células TCD4⁺, pelo CD28 e pelo TCR não é um estímulo suficiente para iniciar a migração dos linfócitos TCD4⁺ CXCR5-dependente aos folículos linfóides, se fazendo necessária também a sinalização mediada pelo co-estimulador OX40 e o seu ligante OX40L, o qual, segundo BROKER *et al.* (1999) é predominantemente expresso em linfoblastos

TCD4 + ativados por CDs nas áreas T-dependentes. Esta mesma sinalização estimula a expressão do CXCR5 nas células T.

SECOR *et al.* (1996), afirmam que linfócitos Th2 CD4+ favoreceriam mais efetivamente a formação de CGs do que linfócitos Th1, isto relacionado diretamente com a expressão de moléculas co-estimuladoras dependentes da IL-4 (FLYNN *et al.*, 1998). Embora outros trabalhos publicados nesse mesmo ano, sugerem que a ótima formação de CGs depende da influência dos dois perfis de citocinas, de qualquer forma concordam com que a presença das células T exigida para tal processo, assim como a geração de células B de memória e a diferenciação em plasmócitos nos CGs, requer a interação de moléculas expressas em linfócitos B e T (ARPIN *et al.*, 1995; MCHEYZER-WILLIAMS, 2003).

A formação dos CGs freqüentemente é caracterizada pela estratificação de subpopulações linfocíticas em regiões proliferativas e não proliferativas bem conhecidas como zonas escura e clara respectivamente (MACLENNAN, 1994; CAMACHO *et al.*, 1998). Em bovinos essa formação têm sido claramente observada e o tempo de aparecimento dos mesmos parece depender do imunógeno utilizado (FREITAS, 2000 e RESENDE 2003).

Nesses trabalhos se descreve que essa compartimentalização se estende à presença de células dendríticas foliculares as quais permanecem nas regiões claras dentro dos CGs, ainda relacionam estes eventos com maturação dos mesmos.

Outros autores afirmam que as células mitóticas não se limitam à zona escura, á que têm sido encontradas dentro de zonas claras células B interagindo com FDC, o que segundo eles sugere que as células proliferantes não deixam de estar sob a influência das moléculas associadas com FDC e a suas membranas durante todo o desenvolvimento dos CGs. (KOSCO VILBOIS, 1997).

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

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

O antígeno mantido como um complexo imune em uma forma nativa não processada nas FDC é reconhecido com alta afinidade pelos centrócitos os quais podem processá-los e apresentá-los como complexo MHC-peptídeo às células TCD4+ antígeno-específicas. Os centrócitos parecem ser selecionados a partir de sua capacidade de interação com o antígeno nas FDCs. Quando as concentrações de antígeno livre decrescem, esta interação assegura a sobrevivência das células altamente específicas de forma que as células de baixa afinidade não estimuladas morrem (WALKER *et al.*, 2000) devido à ausência de sinais antiapoptóticos mediados pela ligação CD40-CD40L e são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais. Nesse contexto, nos CGs a apoptose ocorre como um mecanismo típico de seleção de centrócitos onde são conferidas características de memória, capacidade de processamento antigênico, e de apresentação às células T somente a células altamente específicas aos complexos que permanecem nessas estruturas.

FREITAS (2000) e RESENDE (2003) ao trabalharem em bovinos inoculados com *Babesia bovis* ou *Anaplasma marginale*, respectivamente, evidenciaram esse mecanismo de seleção dentro dos centros germinais na primeira semana após a inoculação.

3.2 Resposta Imune ao carrapato

3.2.1 Imunidade contra antígenos convencionais

As reações imunológicas do hospedeiro que se seguem a repetidas infestações de carrapatos são produzidas a partir de antígenos das glândulas salivares ou das peças bucais do parasita que entram em contato com a pele do hospedeiro. Essa imunidade que outorga resistência pode ser expressa

como uma redução no número de fêmeas ingurgitadas, peso, fecundidade, e prolongamento no tempo de alimentação do parasita .

Porém, existe um fato importante a considerar neste tipo de imunidade adquirida naturalmente. Os antígenos do carrapato são moléculas expostas continuamente ao hospedeiro durante a interação parasita-hospedeiro. É provável que essa exposição gere uma compatibilidade seletiva entre parasita e hospedeiro na evolução. De fato, vários autores concordam em afirmar que as infestações com carrapatos medeiam imunossupressão na maioria dos mecanismos relacionados à resistência adquirida, inibindo a atividade de moléculas biologicamente ativas, das células efetoras (NK, macrófagos) e das respostas proliferativas de linfócitos T que estão envolvidas com a resposta Th1 (WIKEL *et al.*, 1996d; 1997).

Nesse sentido FERREIRA & SILVA (1998) constataram que a saliva de *Rhipicephalus sanguineus* inibiu a resposta proliferativa de células T provenientes de camundongos repetidamente infestados tanto a antígeno-específicas quanto a mitógenos embora não teve efeitos sobre a apresentação antigênica.

De fato estes e outros autores concordam, ao indicar que a saliva do carrapato pode modular a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para o sucesso e favorecendo a transmissão de patógenos por este ixodídeo (WIKEL, 1996a; WIKEL, 1996b; WILLADSEN *et al.*, 1999)

A resposta imune à infestação natural de carrapatos tem sido caracterizada pela presença de anticorpos específicos a antígenos salivares (WILLADSEN *et al.*, 1978), reações celulares e de hipersensibilidade (LEMOS, 1986; WILLADSEN, 1987; SONENSHINE,1991), ou como um fenômeno tipicamente imunológico no qual as células e moléculas do sistema imune teriam uma intervenção direta (BROSSARD & WIKEL, 1989).

Com isto, nos locais de fixação do parasita em hospedeiros resistentes, desenvolvem-se, freqüentemente, além de infiltrados celulares basofílicos e eosinofílicos, degranulação dos mastócitos mediada por anticorpos específicos que se encontram circulantes e que foram gerados previamente após a

estimulação dos linfócitos por meio das células de Langherans nos órgãos linfóides drenantes (ALLEN, 1973; BROSSARD, 1982).

Trabalhos realizados em camundongos mostraram a importância dos linfócitos TCD4+ na geração da imunidade adquirida à exposição natural do carrapato (MBOW *et al.*, 1994) e a participação direta desta população na resistência adquirida dependente da hipersensibilidade cutânea (WIKEL, 1996c; WIKEL *et al.*, 1997). Neste caso, os linfócitos T, são considerados como reguladores e efetores nas respostas imunes do hospedeiro ao carrapato (WIKEL *et al.*, 1996d) e dos quais depende a resistência à infestação.

De fato as citocinas mensuradas durante repetidas infestações demonstram que o perfil destas muda de um inicial Th2 a um predominante Th1 (WIKEL, 1999), concomitantemente ao incremento e predominância da população de células CD4+ nos sítios de fixação do parasita (MBOW *et al.*, 1994).

FERREIRA *et al.* (2003) concordam com o anterior, ao descrever que animais susceptíveis a infestações por carrapatos não desenvolvem respostas celulares protetoras e as relacionam com alteração dos mecanismos efetores nos tecidos de exposição, uma vez que não desenvolvem respostas de hipersensibilidade tardia. Além disso, segundo FERREIRA & SILVA (1999) a susceptibilidade pode ser devido à modulação seletiva de citocinas Th2 durante as infestações.

3.2.2 Imunidade a antígenos Ocultos “*concealed antigens*”

A imunidade induzida por antígenos protéicos ocultos, provenientes de *B. microplus*, seja naturais, recombinantes ou sintéticos, tem gerado uma variável eficácia em um grande número de experimentos em campo e controlados (MASSARD *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; CANALES *et al.*, 1997; DE LA FUENTE *et al.*, 1998; PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002).

Vários autores coincidem em afirmar que os mecanismos de ação envolvidos nesta eficácia são mediados por anticorpos específicos com envolvimento do complemento e outros mecanismos efetores. (CANALES *et al.*, 1997; DE LA FUENTE *et al.*, 1998). De fato trabalhos anteriores a estes

estabeleceram uma correlação significativa entre complemento, níveis de anticorpos específicos para antígenos de membrana de células de intestino de carrapatos e proteção (JACKSON & OPDEBEECK, 1989; 1990; WONG & OPDEBEECK, 1990)

KEMP (1996) indica que a imunidade efetora de animais imunizados com antígenos ocultos confere proteção com efeitos diretos sobre as células intestinais do carrapato e que esta proteção está associada à ação de anticorpos específicos elicitados após a imunização.

Mais recentemente, trabalhos com imunógenos sintéticos, desenvolvidos por PORTELA (2000), PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002), demonstraram um efeito protetor em animais imunizados relacionando os níveis de imunoglobulinas específicas em soro com a eficácia dos imunógenos, além do que, PATARROYO *et al.* (2002) evidenciaram o reconhecimento *in situ* desses anticorpos.

Até agora, estudos dessas respostas têm-se centrado nos anticorpos e em suas propriedades efetoras e embora vários trabalhos caracterizam os isotipos específicos envolvidos (OPDEBEECK, 1990; VALLE *et al.*, 2001), até o momento na literatura não se encontra descrita uma relação entre essa resposta e outros mecanismos imunes do hospedeiro.

BONA *et al.* (1998), afirmaram que os peptídeos sintéticos, como um novo tipo de subunidades com potencial imunogênico variável, podem ser reconhecidos e processados pelo complexo maior de Histocompatibilidade II (MHC II) como, normalmente, ocorreria com outro antígeno de tipo protéico. Consideram também que os peptídeos sintéticos podem interagir diretamente com a molécula MHC II expressa na superfície das células APC e essa interação pode ser igual ao tempo correspondente à vida média dessa molécula.

3.3 Populações celulares circulantes nas respostas imunes: Distribuição e Função

Durante as respostas imunes primárias, um pequeno número de células T e B sofrem uma marcada expansão clonal seguida de uma diferenciação em células efetoras. Neste processo, muitas células são

selecionadas para morrer pela expressão de moléculas pró-apoptóticas, como um mecanismo auto-regulador, e apenas umas poucas são selecionadas para células de memória (SPRENT,1997) e efetoras, as quais expressam moléculas nas suas superfícies celulares que interagem com fatores inibidores das funções pró-apoptóticas (CORY,1995).

As células efetoras diferentemente das “naive” são mais facilmente ativadas, adquirem a capacidade de produzir rapidamente citocinas após uma nova estimulação, e desenvolvem fenótipos característicos nas suas superfícies celulares o que outorga nelas propriedades de residência ou não.

O padrão de citocinas produzido pela população de células efetoras ao encontro antigênico regula a ativação e o influxo de outros tipos celulares. De fato, as populações de células TCD4+ de memória e ativadas correntemente secretam uma ampla variedade de citocinas e se encontram diferentemente distribuídas nos compartimentos do sistema imune fazendo parte de estruturas que dependem dos fatores solúveis por elas produzidos. Em órgãos linfóides secundários, as células TCD4+ expressam propriedades características de células T auxiliares mostrando elaborar fatores de crescimento para células T e B (BALDWIN *et al.*, 1986; 1987) necessários para a formação dos microambientes em resposta a antígenos T-dependentes que desencadeiam respostas específicas e conseqüentemente protetoras.

Por outro lado, tem sido demonstrado que a distribuição periférica dos linfócitos CD4+ depende da idade do animal, em condições fisiológicas podendo constituir 15-30% das células do sangue periférico em animais adultos.

A maioria dos linfócitos recirculam continuamente do sangue aos tecidos linfóides secundários e retornam a este aproximadamente duas vezes por dia, a circulação não é aleatória, já que é regulada por mecanismos ativos de reconhecimento entre as células endoteliais e os linfócitos, permitido posteriormente, cruzar através da parede vascular. Este processo de circulação é fundamental no sistema imune, controlando o acesso de populações de linfócitos especializados a um tecido em particular e por tanto influenciando a natureza da resposta imune local e/ou a resposta inflamatória.

Esta especificidade depende tanto do fenótipo vascular quanto do fenótipo das células linfocíticas. De fato, DUTTON *et al.* (1999) e CERWENKA

et al. (1999a; 1999b) afirmam que as células de memória centrais e periféricas expressam níveis de moléculas de adesão maiores que as células “naive” permitindo não só que estas alcancem locais que são inacessíveis para as “naive”, como também que respondam, proliferativamente, mais rápido ao desafio antigênico .

Como é de se concluir diferenças fenotípicas entre células de memória, efectoras e “naive” mostram-se refletidas nas características funcionais de cada população. SWAIN *et al.* (1999) reportaram que as células Th1 efectoras foram mais susceptíveis à apoptose induzida por antígeno que as células Th2, enquanto as células de memória de ambas populações mostraram uma menor indução a apoptose. Além do mais, as células de memória mostraram um aumento da secreção de citocinas com uma marcada diferença quando comparada com as não estimuladas tanto para populações CD4+ como CD8+ (CERWENKA, 1999).

Existe uma dicotomia significativa no tráfego de linfócitos no que concerne à distribuição diferencial de populações de células virgens versus efectoras ou de memória (MACKAY *et al.*, 1992). Em geral os linfócitos “naive” são programados a recircular através de tecidos linfóides secundários onde encontram um microambiente linfóide especializado que pode, dependendo do estímulo encontrado, induzir a sua diferenciação ou morte no caso das células auto reativas.

Diferentemente das células “naive”, onde a recirculação é relativamente homogênea dentro de cada classe de linfócitos sejam B ou T, as células de memória e efectoras apresentam uma notável heterogeneidade com diferentes populações que expressam padrões seletivos a tecidos (WOODLAND & DUTTON, 2003).

De fato, uma vez iniciada a resposta imune primária em linfonodos drenantes ao sítio de exposição antigênica, as células T de memória resultantes permanecem no sítio, e quando o antígeno é introduzido de novo, só as células ativadas têm a capacidade de se realocarem nos sítios de exposição antigênica enquanto que as de células de memória continuam sendo recrutadas (BRADLEY *et al.*, 1999).

Se bem que, como descreve PICKER (1994) a regulação de receptores de residência durante a diferenciação de células T de memória e efectoras é

análoga à produção de citocinas efetoras, na qual envolvem-se citocinas imunoreguladoras e sinais co-estimuladores que dependem da natureza antigênica.

Embora muitos dos receptores de localização diferencial pelas células de memória estejam relacionados com a recirculação às mucosas ou à periferia, uma complexidade adiciona-se à presença de subpopulações de células CD4⁺, CD8⁺ e células T $\gamma\delta$, do tipo 1 e tipo 2, onde os fenótipos de superfície e diferenciação são influenciados por perfis de citocinas.

MEEUSEN *et al.* (1996) propuseram que a migração diferenciada de células CD4⁺ de memória é, exclusivamente, consequência da expressão de moléculas de adesão Th1 versus Th2 . Isto pode ocorrer particularmente pela influência de fatores associados à natureza, rota, exposição e dose antigênica, que levam ao desenvolvimento preferencial de subpopulações com a expressão variável de marcadores de superfície que afetam o potencial migratório (DUTTON *et al.*, 1998).

Em bovinos, além dos "*clusters*" CD (CD4 e CD8), há os WC ("*workshop clusters*"), que ainda não têm uma função definida, mas que, segundo HOWARD *et al.* (1999b), podem apresentar uma pluripotencialidade para a apresentação de antígenos a "*clusters*" CD ou WC e que estariam presentes em maior número em animais jovens, circulando do sangue para a pele onde podem interagir com células dendríticas, as quais são células altamente especializadas na apresentação de antígenos e presentes nos linfonodos que drenam a pele de bovinos (HOWARD *et al.*, 1999a).

Embora o envolvimento das células T $\gamma\delta$ ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que essas células circulam em grande número no sangue periférico de bovinos e expressam a molécula de superfície WC1 que não é expresso em células murinas ou humanas (MORRISON *et al.*, 1991).

Em bovinos adultos essa população forma cerca de 10-15% de células T circulantes e em bovinos jovens podem alcançar porcentagens de até de 40% (WYATT *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1996).

Às células T $\gamma\delta$ se atribuem várias funções, entre as que se destacam a capacidade de secretar citocinas tanto do tipo 1 quanto do tipo 2, a capacidade citolítica, o efeito regulador sobre o sistema imune (HOWARD *et al.*, 1999a), a

capacidade de reconhecerem antígenos protéicos (WELSH *et al.*, 2002), apresentarem antígenos às células TCD4+ e induzirem a sua proliferação (COLLINS *et al.*, 1998) e de participarem na maturação das células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002).

Vários autores sugerem que os linfócitos T $\gamma\delta$ podem ter uma ligação com a resposta imune adquirida já que foi demonstrado que células T $\gamma\delta$ humanas estimuladas adequadamente produziam β -quimiocinas, tais como MIP-1 α e MIP-1 β quando (CIPRIANI *et al.*, 2000), quimiocinas que induzem a migração de células T. Nesse contexto BROWN *et al.* (1994) postulam que altos níveis de células T $\gamma\delta$ podem ser um mecanismo precoce de produção de citocinas do tipo 1.

Experimentos para elucidar o papel das células WC1+T $\gamma\delta$ têm sido desenvolvidos em camundongos SCID, os quais foram transplantados com tecidos bovinos selecionados para reconstituir um sistema imune funcional (SMITH *et al.*, 1999) e foi encontrado que a depressão das células WC1+ T $\gamma\delta$ afetavam principalmente a arquitetura e o desenvolvimento de granulomas tuberculosos.

De fato, POLLOCK *et al.* (1996) quando monitoraram populações de células T em bovinos a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) seguido da infecção experimental com *Micobacterium bovis*, mostraram que o número de células WC1+ T $\gamma\delta$ em circulação decresceu durante os dias da infecção sugerindo um possível papel na resposta primária à esta infecção ou segundo SMITH *et al.* (1999), pode estar relacionado ao recrutamento de células efetoras ou ao direcionamento celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Imunização dos animais

Três bovinos, *Bos taurus taurus* da raça holandesa e dois mestiços (H/Z), todos machos jovens com pesos aproximados de 80 a 100 Kg no início do experimento, foram mantidos sob condições de isolamento evitando-se o completo contato com artrópodes ou outros vetores de hemoparasitas, desde seu nascimento e durante todo o experimento, nas dependências do Laboratório de Biologia e controle de hematozoários (LBCH) / Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária / BIOAGRO / DVT da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Além disso, foram verificados sorológica e hematologicamente como negativos para hemoparasitas.

Durante o período experimental os bovinos receberam ração balanceada com 20% de proteína e quantidade definida de volumoso. A água foi oferecida *ad-libitum*.

No grupo vacinado composto por três animais, cada animal recebeu três inoculações subcutâneas, a intervalos de 30 dias cada, de 2.0 mg de peptídeo sintético SBm7462* ressuspensos v/v em PBS pH 7,4(Na₂HPO₄

6,4mM, KH_2PO_4 10mM, NaCl 73mM) contendo 1.5 mg de saponina como adjuvante por inoculação.

Os dois animais mestiços foram mantidos como controle recebendo cada 3 ml de PBS pH 7,4 e administrados como descrito anteriormente.

4.2 Determinação Sorológica.

Os soros de todos os bovinos foram coletados antes, a partir e semanalmente após a primeira inoculação até 28 dias após a terceira inoculação. Nas amostras coletadas, a cinética de imunoglobulinas IgG anti-SBm7462 foi determinada pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), de acordo com a técnica rotineiramente utilizada no LBCH e adaptada para peptídeos sintéticos.

Para analisar os isotipos de imunoglobulinas bovinas IgG1 e IgG2 nos animais imunizados, o soro dos bezerros obtidos antes e semanalmente pós-imunização foram analisados pela técnica de ELISA .

4.2.1 Teste de ELISA anti-SBm7462 para mensuração da resposta imune humoral

As placas de ELISA MaxSorp Nunc®² foram sensibilizadas à 4°C durante 18 horas com antígeno SBm7462 (2µg/well) produzido pelo LBCH e diluído em Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159g de Na_2CO_3 ; 0,293g de NaHCO_3 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 NaCl; 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 Na_2HPO_4 ; 0,16g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 h a

temperatura ambiente, as placas foram lavadas seis 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 h. Realizaram-se mais seis lavagens das placas com tampão de lavagem. Para a revelação do teste, adicionou-se o substrato, composto de uma solução contendo 4mg de orto-fenildiaminobenzeno (OPD), 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 reação foi interrompida com 30µl de ácido sulfúrico 1:20 e, lida imediatamente em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492nm (Titertek Multiskan® PLUS).

4.2.2 Teste de ELISA para detecção de IgG1 e IgG2 bovina específica a SBm7462

A cinética da produção de IgG1 e IgG2 SBm7462-específica em bovinos inoculados e nos animais controle foi avaliada por meio de teste de ELISA desenvolvido pela BETHYL Laboratories® e modificada pelo LBCH. Os testes foram realizados em duplicatas, sempre utilizando-se soros do bovino negativo e do grupo vacinal, para cada data de coleta.

Foi seguido o protocolo como descrito no item 4.2.1, no entanto as placas foram bloqueadas com solução de gelatina 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 e as amostras foram diluídas 1:100 e o conjugado (ovelha anti-IgG1 ou IgG2 bovina conjugado com peroxidase (BETHYL)) 1:30000 em tampão de incubação (100ml de PBS pH 7,6; gelatina 0,25% e Tween 20 ao 0,05%).

² Placas de ELISA de 96 wells – Nunclon MaxiSorp - USA

4.3 Estimulação de células monocíticas de sangue periférico Bovino (PMBC)

PBMC foi isolado de sangue heparinizado obtido da veia jugular de todos os animais do experimento, 7 e 14 dias após cada inoculação. Imediatamente após a coleta, o material foi mantido a temperatura ambiente até ser separado por gradiente de densidade celular utilizando-se Ficoll-Paque (Pharmacia) (BROWN *et al.*, 1991). O sangue foi centrifugado v/v com Ficoll (300g por 40 minutos a 18°C), e o anel de células obtido foi lavado por centrifugação (300g por 10 minutos a 4°C) duas vezes com 3v de 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) Os eritrócitos que permaneciam no material leucocítico foram homogeneizados com 3ml de uma solução de lise pH 7,4 (KHCO₃ 10mM; NH₄Cl 155mM; e EDTA 0.1mM) durante 8 min e depois as células foram centrifugadas adicionando HBSS até um volume final de 40ml. Finalmente o pellet celular foi 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), , NaHCO₃ (2,0g/l). Antes do uso o meio DMEM foi acrescido com 10% de Soro Fetal Bovino, inativado, L-glutamina 2mM, 2-mercaptoetanol (50μM) e penicillin/streptomycin (SIGMA 100 UI/ml)

O PMBC foi cultivado em duplicatas em placas de 24 wells (Costar, Cambridge, Mass) a uma concentração de 2×10^6 células/ml com um volume final de 2 ml/well. Após 18 h de estabilizados, os linfócitos bovinos foram estimulados diferentemente com concanavalina A (ConA; SIGMA 12.5μg/ml), Peptídeo Sintético SBm7462 (2 μg/ml) ou meio DMEM, para os controles. As placas foram incubadas a 37° C com 5% CO₂ por mais 120 horas.. Posteriormente o sobrenadante de PBL foi coletado após 72 e 120 h de re-estímulo e congelado em eppendorfs a -70° C.

4.4 Dosagem de IFN- γ e TNF- α 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 & SCOTT, 1993). Todos os anticorpos monoclonais e reagentes utilizados no teste foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia – UFOP.

As placas de ELISA Nunclon MaxiSorp, foram sensibilizadas durante 18 horas a 4°C com os anticorpos monoclonais de captura B133.1 (5 μ g/ml) e B154.9.2 (2 μ g/ml), específicos para IFN- γ e TNF- α 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 (1:2000) e B154.7.1 (1:1000), específicos para IFN- γ e TNF- α humanos, respectivamente. Transcorrida 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas para posterior adição de estreptoavidina-peroxidase (Zymed Laboratories) diluída 1:2000 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 (E-max precision microplate reader) e os dados quantificados pelo programa SOFT-max PRO 4.0 Microplate Manager. Os limites inferiores de detecção de IFN- γ , TNF- α foram 15,62 pg/ml e 31,25 pg/ml respectivamente.

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

4.5 Histologia dos linfonodos bovinos

Linfonodos pré-escapulares bovinos foram cirurgicamente removidos, - 1, 7, 15, 35, 45 65 e 72 dias após a primeira inoculação. Os fragmentos de linfonodos seccionados foram fixados, durante 8 h, em paraformaldeído a 4% pH 7,2, e desidratados, por 24 horas em soluções alcóolicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast Plus[®] (Sigma[®]) (PROPHET *et al.*, 1992).

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

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600³.

4.6 Técnica de TUNEL em linfonodos bovinos para detecção de apoptose

A apoptose nos cortes histológicos de linfonodos bovinos foi identificada utilizando o kit de Detecção de Morte Celular *in situ*, POD (Boehringer Mannheim[®]) que emprega a técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick and labeling*).

Após desparafinização e hidratação dos cortes, como descrito no item 4.5, as lâminas foram transferidas para PBS pH 7,4 por 5 minutos e incubaram-se os cortes durante 20 minutos a 37°C com proteinase K (20µg/ml em Tris/HCl 10mM, pH 7,4), após duas lavagens com PBS pH 7,4, foi bloqueada a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio metanólico 0,3% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Os cortes foram novamente lavados e as células permeabilizadas (0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1%) durante dois minutos; sobre

³ Microscópio Óptico – Eclipse E600 – Nikon – Japan

gelo. Em seguida, lavaram-se duas vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e incubou-se durante 60 minutos em câmara úmida a 37°C com 50µl da mistura TUNEL (5µl da enzima terminal desoxirribonucleotidil transferase e 45µl de nucleotídeos marcados com fluoresceína). Após, lavados três vezes com PBS pH7,4, adicionou-se aos cortes 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, lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada e contracolorados 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.

Posteriormente as laminas foram analisadas por meio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600

4.7 Imunohistoquímica para identificação do peptídeo sintético SBm7462 *in situ*.

Para detecção de antígenos de SBm7462 utilizou-se a técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase – PAP (PROPHET *et al.*, 1992). O meio de inclusão foi retirado por duas passagens em xilol de 30 minutos cada, sendo hidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 (1,48g de Na₂HPO₄, 0,43g de NaH₂PO₄, 7,2g de NaCl 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 10 minutos a 37°C.

Em seguida, cobriram-se os cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubou-se em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro

evitando a secagem dos cortes e colocou-se anticorpo primário específico (soro de coelho anti-SBm7462) produzido pelo LBCH/ BIOAGRO-UFV, 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) produzido 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. Os cortes foram lavados novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e foram imediatamente colocados em solução reveladora recém preparada (25 mg de diaminobenzidina (DAB), 200µl de H₂O₂ (30V) em 100 ml de PBS pH 7,4) durante 5 minutos. Finalmente os cortes foram lavados por mais 5 minutos em PBS pH 7,4 e contracolorados 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.

As lamínas foram analisadas por meio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600

4.8 Imunofenotipagem de linfócitos de sangue periférico (PBL)

Sangue total, coletado a vácuo com anticoagulante (EDTA), foi obtido de todos os animais nos dias -1, 15, 35, 63, e 70 após imunização com o SBm7462.

Os leucócitos de sangue periférico foram isolados por centrifugação (300g 15min) e criopreservados [40% albumina sérica bovina a 20%, 60% de solução crioprotetora (FARMOTERÁPICA), 10% da solução final de dimetilsulfoxido (DMSO) e 2UI de heparina sódica/ml] e mantidos em nitrogênio líquido até sua utilização.

Os marcadores de superfície de linfócitos foram analisados por citometria de fluxo. Os anticorpos monoclonais usados, específicos para antígenos de superfície celular bovina CD21, CD4, CD8 e o antígeno de

superfície WC1 das células T $\delta\gamma$ descritos na tabela 1, foram previamente padronizados utilizando-se sangue total bovino e amostras congeladas de PBL bovino.

A titulação específica para cada anticorpo foi determinada por citometria de fluxo, empregando-se quantidades específicas (1,5; 0,75; 0,37; 0,18 μ L) para cada anticorpo diluído em 15 μ L de PBS.

Os leucócitos foram analisados e observou-se que as quantidades de 1,5 μ L de WC1, 0,18 μ L de CD4 e 0,37 μ L de CD8 e CD21, discriminaram mais eficientemente as populações celulares marcadas das não-marcadas (Fig., 2 A a 2E)

As diferentes populações de linfócitos foram analisadas pela emissão de fluorescência após sua marcação, por meio do programa *CellQuest* (Becton Dickinson). A identificação das populações celulares foi baseada em tamanho, granulosidade e marcação de superfície celular em cada 10000 células analisadas por amostra como mostrado na Figura 1.

A porcentagem de células positivas à marcação foi calculada depois de colocado o alvo na população linfocítica, excluindo do cálculo um número variável de monócitos.

O PBL foi descongelado a 37°C e lavado por centrifugação a 300g com PBS (10% SFB e 2 UI Heparina/ml) durante 10 minutos a 4°C. O “*pellet*” foi ressuspenso em PBS (10% SFB) obtendo uma concentração final de 2 x 10⁷ células por ml, 30 μ L dessa suspensão celular foram incubados com cada anticorpo monoclonal por 20 min a temperatura ambiente em tubos de cinco mL contendo 15 μ L de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-WC1 ou anti-CD21 bovino marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após incubação, todas as preparações celulares foram submetidas à lise de eritrócitos, acrescentando-se 2 ml de solução de lise (FACS™ Lysing Solution) e centrifugadas durante 7 minutos 18°C a 300g. Os leucócitos totais foram lavados em PBS pH 7.0 nas mesmas condições de centrifugação, fixados com 200 μ L de solução fixadora (paraformaldeído 1% em tampão cacodilato de sódio 6,63g/L, pH 7,2) e analisados no citômetro de Fluxo FACScan – BECTON DICKINSON.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos das absorvâncias dos soros no teste de ELISA e as porcentagens das populações celulares na citometria de fluxo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de uma comparação entre médias com o movimento do período por meio do teste de Tukey, nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1– Anticorpos Usados

Nome	Especificidade	Diluição	Isótipo	Uso	Origem
	Anti-IgG bovina conjugada- peroxidase	1:20000	Coelho IgG2a	ELI SA	SIGMA
	Anti-IgG1 bovina conjugada- peroxidase	1:30000	Cabra IgG2a	ELI SA	BETHYL Laboratorie®
	Anti-IgG2 bovina conjugada- peroxidase	1:30000	Cabra IgG2a	ELI SA	BETHYL Laboratorie®
MAbs CC8	Anti- CD4 conjugado com FITC	1:80	Camundongo IgG2a	CF	Serotec
MAbs CC63	Anti- CD8 conjugado com FITC	1:40	Camundongo IgG2a	CF	Serotec
MAbs CC21	Anti- CD21 conjugado com FITC	1:40	Camundongo IgG1	CF	Serotec
MabsCC101	Anti- WC1 conjugado com FITC	1:10	Camundongo IgG2a	CF	Serotec

CF: Citometria de fluxo.

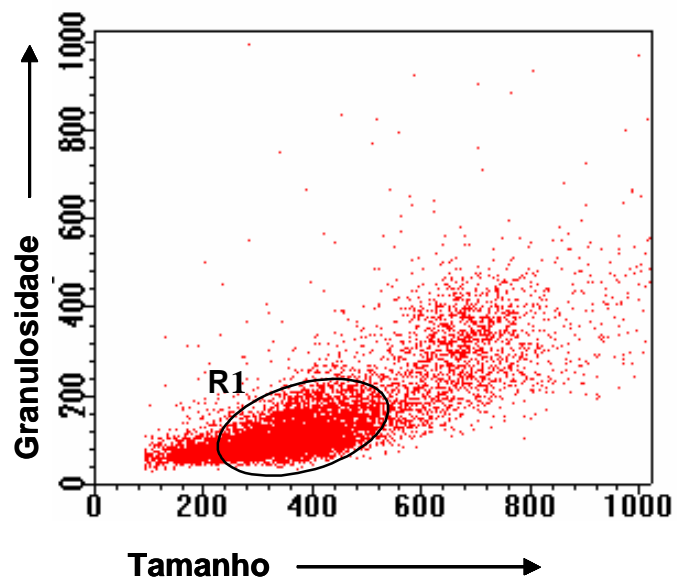


Figura 1- Perfil dos leucócitos periféricos bovinos obtidos de sangue periférico congelado após a lise de eritrócitos com solução de lise (FACS™ Lysing Solution). R1 população linfocítica analisada.

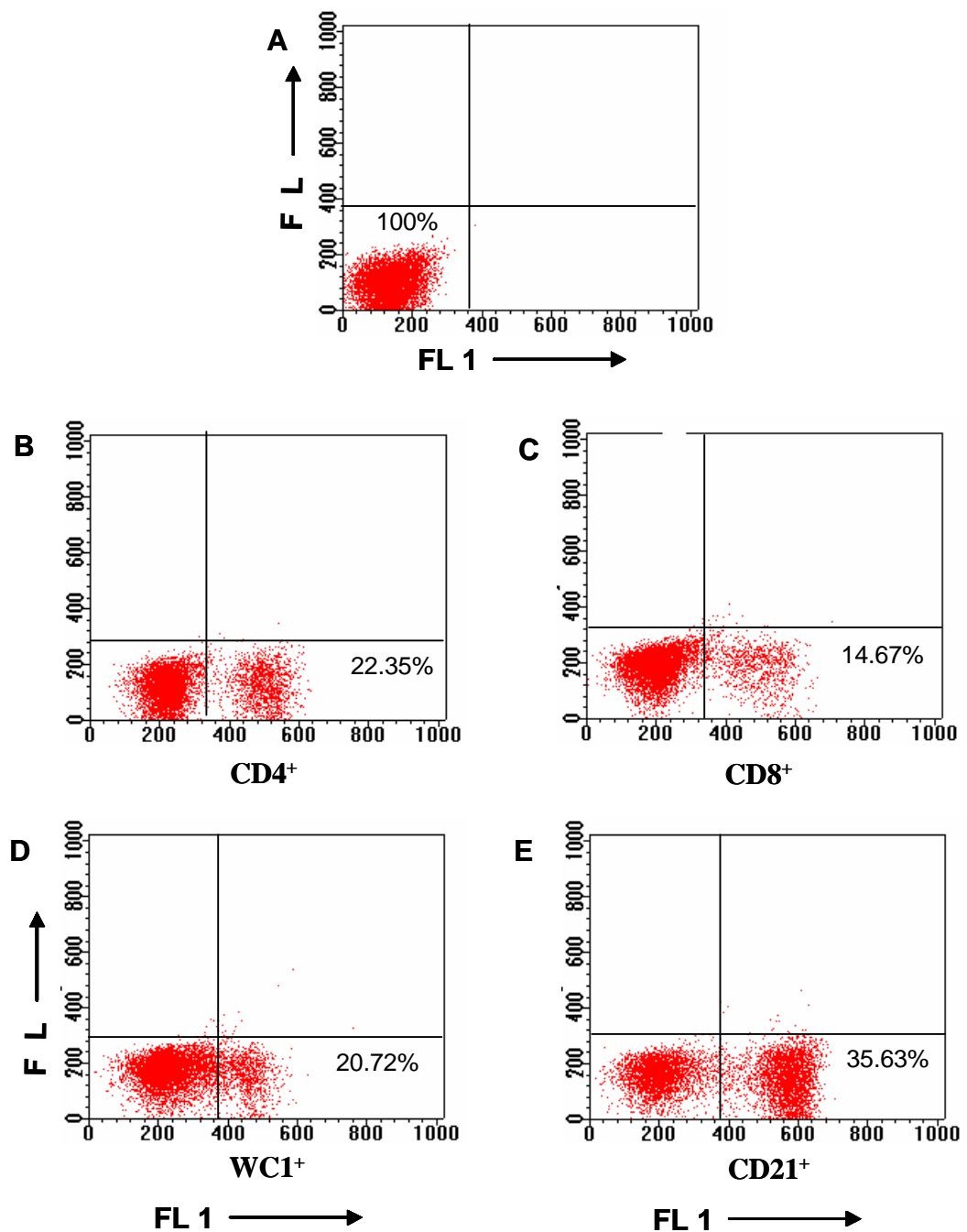


Figura 2 – Representação gráfica da intensidade na fluorescência de linfócitos bovinos obtidos de PBL congelado após a imunofenotipagem. Linfócitos sem adição de anticorpo **A**. A população marcada com anticorpos específicos para linfócitos T **CD4⁺** (**B**), **CD8⁺** (**C**), **WC1⁺**(**D**) e **CD21⁺** (**E**) está apresentada como porcentagem de células fluorescentes no quadrante inferior direito. FL 1 fluorescência 1 e FL 2 Fluorescência 2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resposta de Anticorpos Anti-SBm7462 em Bovinos Imunizados.

A técnica de ELISA empregada no experimento foi eficaz na identificação de anticorpos específicos anti-SBm7462 mostrando uma cinética de resposta imune de IgG clássica. O grupo controle manteve um nível basal de reatividade específica anti-SBm7462 igual aos soros pré-ímmunes (Fig.,3A).

Tanto animais controle como imunizados não apresentaram diferenças nas absorvâncias até uma semana após a segunda imunização, na qual foi observado um aumento progressivo na densidade óptica (DO) para os animais imunizados e com nenhuma soroconversão, e mantendo-se constante durante todo o experimento, para os animais controles.

Nos animais imunizados, os níveis de IgG aumentaram significativamente desde a segunda imunização, sendo mais elevado após a terceira imunização com valor da DO máximo após duas semanas da imunização, como mostrado na Fig., 3A.

Estes dados concordam com os achados de PATARROYO *et al.* (2002), nos quais o pico de produção de IgG para o mesmo peptídeo ocorreu após a terceira imunização .

O fato de não existir uma soroconversão diferente entre os animais imunizados e o controle antes da segunda imunização, provavelmente deve estar associada a uma resposta imune menos intensa na produção de IgG pelos linfócitos B reativos ao peptídeo SBm7462 ou ainda pela ausência de imunoglobulinas específicas antes da formação de estruturas que conferem esta especificidade como os centros germinais (CGs). Ao contrário, a resposta imune secundária foi mais rápida e duradoura, caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos antígeno-específicos (VONDERHEIN & HUNT, 1991), como pode ser observado pelo incremento de IgGs após a segunda e terceira imunização (Fig., 3A).

No intuito de caracterizar a resposta imune humoral quando o teste de ELISA foi usado com anticorpos isótipo-específicos (IgG1 e IgG2) foi constatada a predominância estatisticamente diferente de IgG1, enquanto que, a IgG2 oscilou entre valores próximos aos animais controle. Os níveis de IgG1 aumentaram continuamente, seguindo a cinética de IgG total (Fig., 3B).

A imunoproteção conferida pelo SBm7462 provavelmente se explica pela ação da IgG. Assim a resposta imune humoral protetora contra a infestação de *B. microplus* após a imunização com SBm7462 utilizando-se saponina como adjuvante, está relacionada diretamente com o reconhecimento *in situ* da proteína íntegra pelos isotipos IgG1 produzidos. Tal afirmação está fundamentada nos trabalhos de PORTELA (2000), PATARROYO *et al.* (2002), PIMENTEL (2002) que demonstraram não só uma eficácia de 81,05 % para o SBm7462, quando animais previamente vacinados foram desafiados, como também o reconhecimento *in situ* da proteína completa pelos anticorpos IgG produzidos após a imunização.

Em pesquisas desenvolvidas por JACKSON & OPDEBEECK (1990), onde foram analisados os níveis de anticorpos específicos produzidos em bovinos vacinados com antígenos de intestino médio de *B. microplus*, foi comprovado que a proteção contra a infestação deste parasita está correlacionada com a produção de imunoglobulina IgG1 e, principalmente com a capacidade da sua fração Fc em fixar complemento.

Com isto, é sustentado que a proteção contra a infestação de *B. microplus* em bovinos vacinados com o SBm7462 é conferida pela interação dos mecanismos que envolvem a IgG1, e pelo contrário, segundo VALLE *et al.*

(2001), as respostas IgG2 apresentam efeitos negativos nessa proteção. De fato, como constatado aqui, a relação IgG1/IgG2 foi tão alta que demonstrou a predominância da imunoglobulina IgG1 sobre a produção de IgG2 após a imunização.

Por outro lado, o anterior contrasta com o apresentado por VALLE *et al.* (2001), no que diz respeito ao uso da saponina como adjuvante. Os autores afirmam que a saponina não pode ser considerada como adjuvante de vacinas anti-carrapato devido ao fato de que esta produz um reduzido subtipo de IgG1 e um incremento de IgG2.

Em contraste neste trabalho se demonstra que a imunização com o peptídeo SBm7462 utilizando saponina como adjuvante, induz incrementados níveis de IgG1 e reduzidos níveis de IgG2 antígeno-específicos. Porém, é importante ressaltar que os autores anteriormente citados utilizaram como imunógeno a proteína Bm86 recombinante, um tipo diferente da que foi empregada aqui.

PERTMER *et al.* (1996) consideram que a expressão de subclasses de imunoglobulinas, sem o mensuramento de citocinas, pode não ser um indicador factível de reação tipo Th1 ou Th2. Não obstante, trabalhos desenvolvidos por ESTES *et al.* (1995) e ESTES & BROWN (2002) sugerem que a resposta dominada pela produção de IgG1 é consistente com uma resposta Th2, uma vez que este isótipo se encontra associado à estimulação de clones dos linfócitos B por linfócitos Th2. Os mesmos autores acrescentam que a polarização de células TCD4⁺ a células produtoras de citocinas tipo 2 ocorre durante o estímulo em ausência de suficientes níveis de citocinas polarizadoras como a IL-12 e IL-18.

De fato quando foram quantificadas por ELISA, as citocinas (INF γ e TNF α) em sobrenadantes provenientes de PBMC re-estimulado com SBm7462 nos animais imunizados, não foram detectadas concentrações superiores aos do grupo controle.

Com isto, nesta pesquisa o padrão de expressão IgG1 induzido por SBm7462 poderia estar ligado a uma resposta polarizada das células TCD4⁺ a tipo 2, com produção de citocinas relacionadas a este fenótipo como a IL-4 (ESTES *et al.*, 1995; 1996). Não obstante, é preciso quantificar e comprovar a

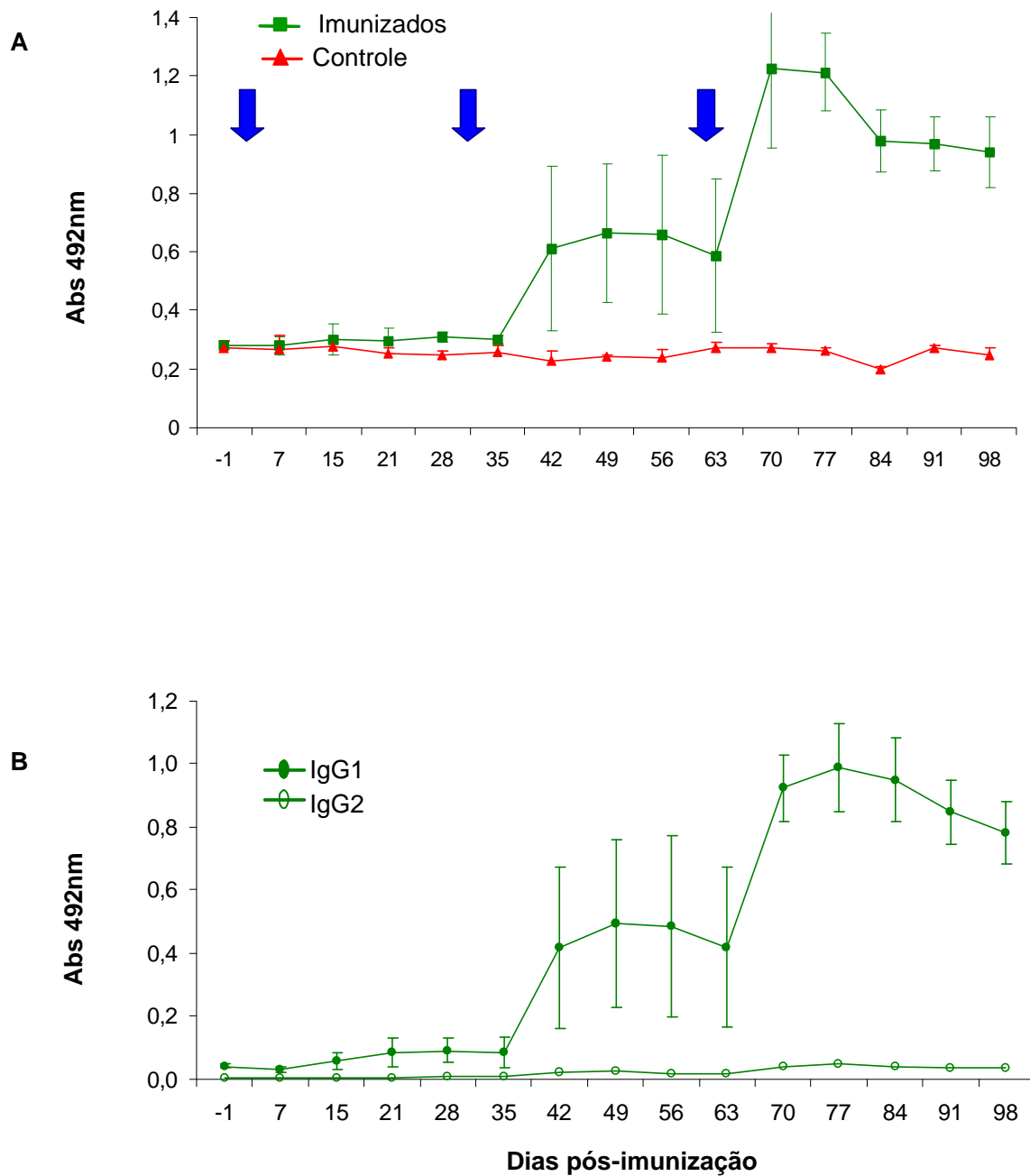


Figura 3 – Cinética da produção de IgGs e isotipos IgG1, IgG2 em bovinos imunizados com SBm7462. **A.** Valores em médias das absorvâncias dos anticorpos IgGs antígeno-específicos em imunizados e controles. **B.** Valores em médias das absorvâncias de IgG1 e IgG2 em animais imunizados. As barras em T representam os desvios padrões para mais e para menos e as setas indicam os dias das inoculações.

presença desta citocina e sua influência sobre a aquisição do fenótipo Th1 ou Th2 das células T CD4⁺.

5.2 Avaliação Histológica dos Linfonodos pré-escapulares

As observações dos nódulos linfáticos na histologia diferencial por hematoxilina e eosina (H&E) revelaram que sete dias após a primeira imunização, as áreas paracorticais (zona T-dependentes) e algumas regiões interfoliculares encontravam-se hiperplásicas constatando-se uma ligeira hiperplasia de cordões medulares e pouca reatividade de CGs (Fig., 4A e 4C). No entanto, 15 dias após a primeira imunização, além de existirem áreas paracorticais hiperplásicas, porém variáveis, observou-se a formação dos CGs delimitadas por uma população linfocítica (Fig., 5B). Nesse mesmo período evidenciou-se hiperplasia dos cordões medulares principalmente aqueles mais próximos das áreas paracorticais profundas, com presença de células dendríticas semelhantes às observadas nas áreas interfoliculares

Poucas mudanças foram observadas nas áreas de células B tanto no controle (Fig., 4B) quanto sete dias após a imunização.

Estes achados concordam com vários autores ao utilizarem antígenos T-dependentes, uma vez que na resposta imune primária a proliferação máxima de células TCD4 nas zonas T ocorreu aproximadamente nesse período (MACLENNAN, 1994; ZHENG *et al.*, 1996; GULLBRANSON-LUDGE *et al.*, 1996). Ainda outros autores sugerem que a regressão das zonas T, e conseqüentemente seu tamanho, possa estar relacionada à infiltração de células T aos centros germinais e sua migração aos cordões medulares (FU, Y. *et al.*, 2000).

A presença de células plasmáticas nos cordões medulares dos linfonodos dos animais imunizados só aumentou em número a partir do dia 15, concordando com a soropositividade antígeno-específica evidenciada no ELISA.

De fato a observação de células plasmáticas antes do aparecimento de anticorpos específicos no soro, pode estar relacionada inicialmente ao

crescimento extrafolicular dos plasmócitos, ocorrido tipicamente nos cordões medulares dos linfonodos antes da formação de CGs (MORRISON *et al.*, 1986)

KENNETH *et al.* (1997) analisando as células formadoras de anticorpos, localizadas nas áreas extrafoliculares, demonstraram que estas células produzem anticorpos com baixa afinidade, devido as suas regiões variáveis não serem diversificadas somaticamente. 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 a células procedentes de outros locais.

Por outro lado, a hiperplasia de cordões medulares com o aparecimento de numerosas células, facilmente caracterizadas como células plasmáticas e linfocíticas, a partir do dia 15 após a primeira imunização e em maior número a partir do quinto dia após a segunda e terceira imunização (Fig., 4D), corresponderiam tanto a linfócitos B diferenciados em plasmócitos produtores de imunoglobulinas altamente específicas, quanto a linfócitos T maduros que migraram para os cordões medulares para o sistema circulatório linfático, o que segundo diferentes autores é observado durante a resposta imune humoral (ZHENG *et al.*, 1996; TARLINTON & SMITH, 1997). Isto provavelmente não significa que as populações nos dois períodos apresentem a mesma afinidade.

Uma resposta imune tecidual distinguida pela hiperplasia das áreas paracorticais e aparecimento de CGs, é característica de um imunógeno T-dependente a qual é considerada como uma resposta imune adaptativa que exige a interação entre células T e B (LIU *et al.*, 1992). Embora alguns antígenos T-independentes, tais como lipopolissacarídeos ligados a haptenos e alguns surfactantes, entre outros, possam induzir à formação de CGs ou reações semelhantes a CGs (KELSOE, 1995), não há dúvida que o indutor dessa resposta neste experimento foi o SBm7462, já que substâncias como as referidas não estavam presentes no imunógeno ou no veículo utilizados.

Neste estudo, os CGs reativos nos folículos caracterizam-se por apresentar uma área basal constituída por células grandes, com citoplasma

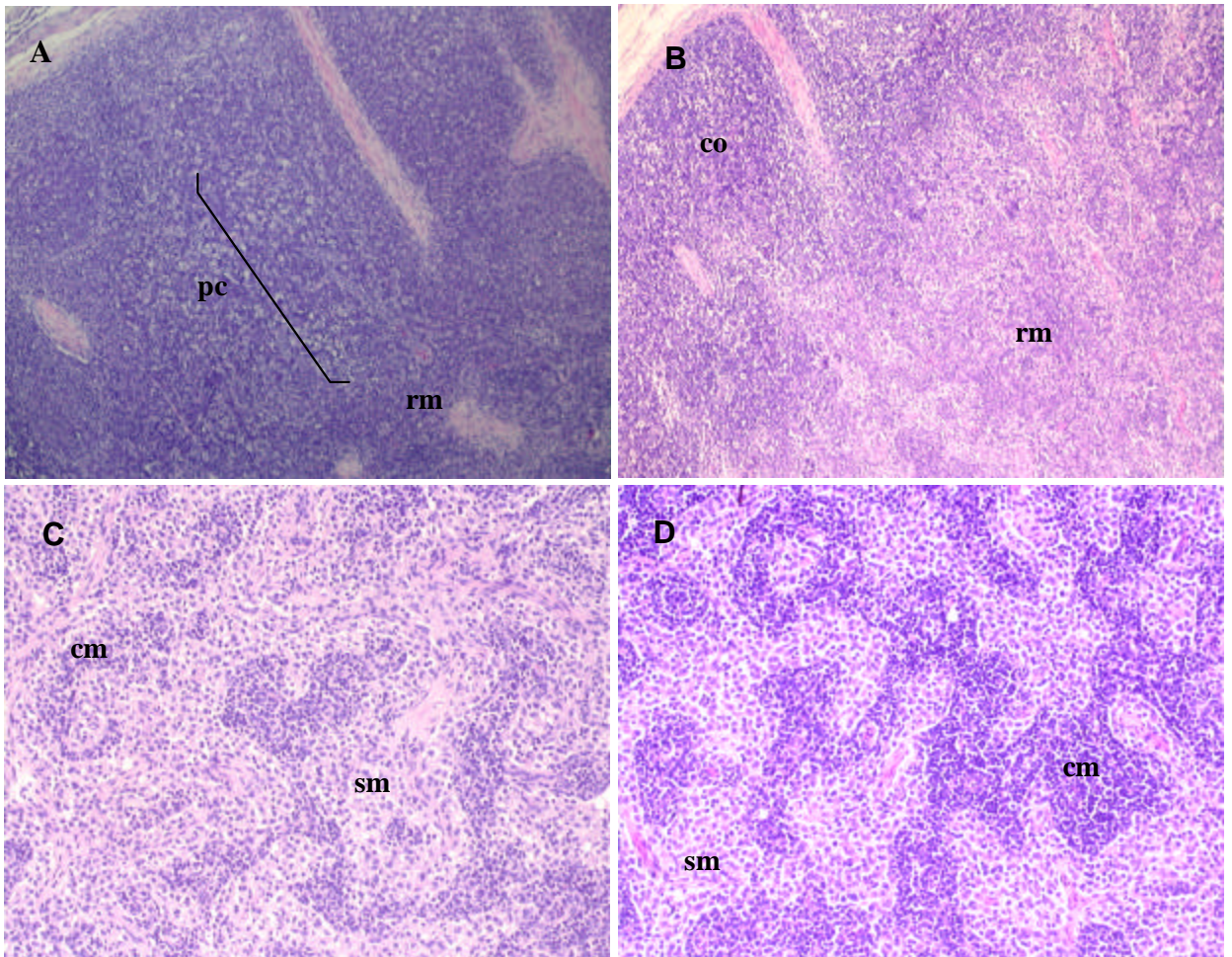


Figura 4 —Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. **A.** Hiperplasia da região paracortical (pc) sete dias após a primeira imunização. H&E, 100X. **B.** Controle negativo. **C.** Região medular (rm) sete dias após a primeira imunização. **D.** Região medular cinco dias após a segunda imunização com evidente hiperplasia de cordões medulares (cm). H&E, 200X. (sm) seios medulares

escasso, núcleo volumoso, cromatina relaxada ou ligeiramente condensada e nucléolos evidentes. Ocasionalmente observa-se transformação blástica de linfócitos, principalmente próximas à periferia desta área. Sobre esta área basal nota-se uma região cuja população celular dispersa é de tamanho menor embora mais numerosa, homogênea e com citoplasma escasso e a cromatina estando mais ou menos condensada. Estas duas regiões estão claramente delimitadas por uma população celular homogênea, com células pequenas e núcleo hiper cromático à semelhança de um manto. Macrófagos e células dendríticas foliculares também são observadas.

Isto pode ser explicado com base no trabalho de MACLENNAN (1994), já que este autor afirma que após as células B alcançarem os CGs, desenvolvem-se duas regiões caracteristicamente definidas como zona clara e escura, com presença de FDC dentro da zona clara que têm capacidade de captar e expor o antígeno por prolongados períodos. Isto significa que a área basal 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.

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 à que foi aqui constatada, entretanto, neste estudo também foi constatada a formação de um manto que delimitava as duas regiões, o qual constituía-se de numerosas células linfocíticas (Fig., 5B e 5C).

No grupo controle observam-se alguns folículos secundários, porém sem reatividade e em menor número que os observados nos animais imunizados, com presença de poucas células linfocíticas. Não há hiperplasia de áreas interfoliculares, paracorticais e nem de cordões medulares (Fig., 4B).

A formação de CGs que foi observada neste animal parece corresponder a uma resposta imune não específica ao SBm7462, 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

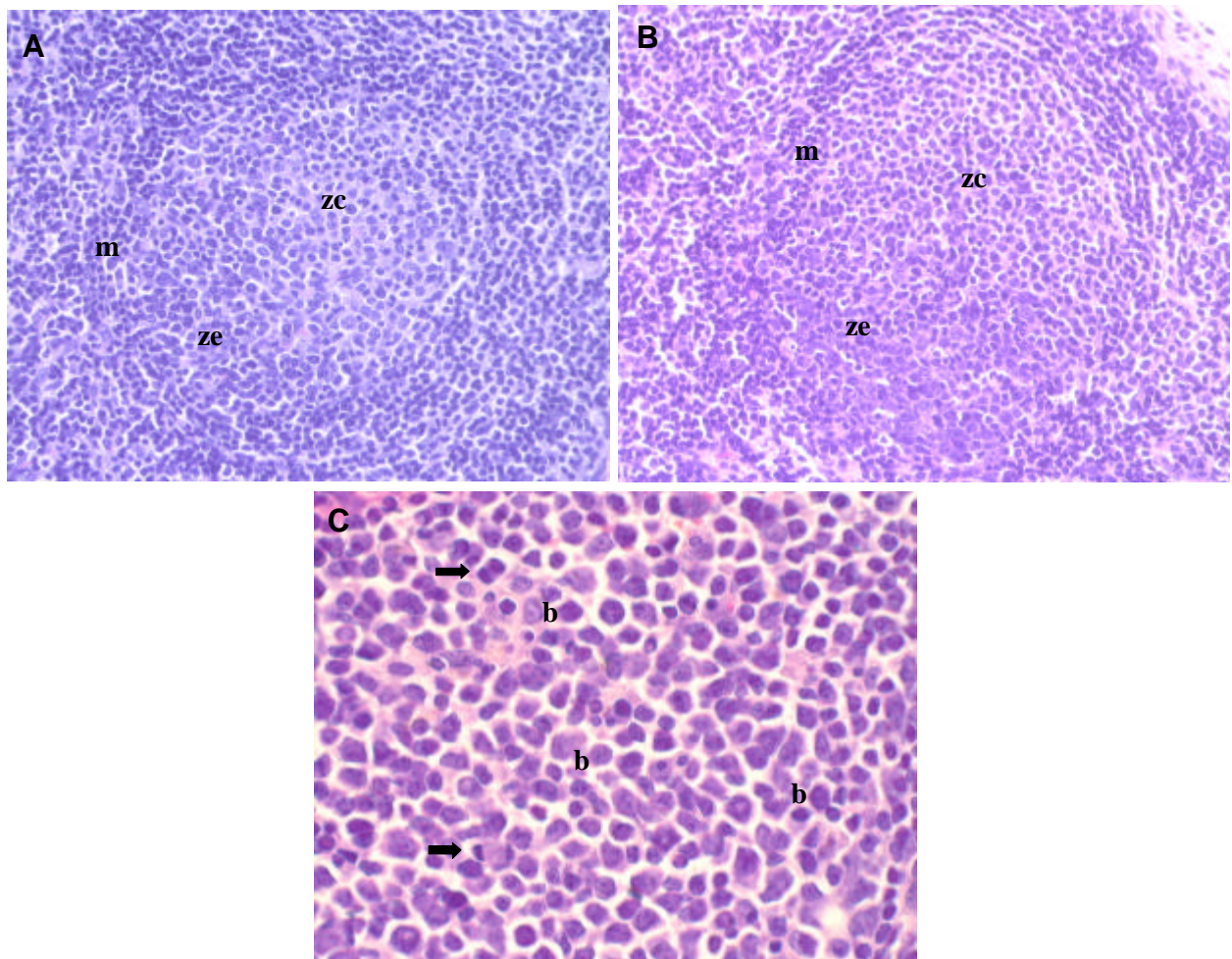


Figura 5 – Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. Sete **(A)** e quinze **(B)** dias após a primeira imunização, mostrando hiperplasia folicular com formação de Centro Germinal caracterizado pela zona clara (zc) e zona escura (ze) delimitadas por células do manto (m), H&E, 400X. **C.** Região da zona escura correspondente à figura B, com células em mitose (setas) e células blásticas (b). H&E, 1000X.

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 estes autores 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, e que, segundo os mesmos autores, indicaria que os linfonodos de animais normalmente saudáveis são extremamente ativos nos quais poderia estar-se refletindo uma relativa proteção a antígenos exógenos.

A maior reatividade dos CGs, bem como a hiperplasia de cordões medulares e de áreas T-dependentes observada cinco dias após segunda imunização 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 estes achados, com respeito a hiperplasia dos cordões medulares, já que estes demonstraram que as células B de memória originam massivas reações plasmocitárias extrafoliculares após re-estimulação, o que é devido a diferenciação terminal das células B de memória em plasmócitos com maior rapidez do que as células B virgens, originando 5 a 8 vezes mais plasmócitos e secretando 3 a 4 vezes mais imunoglobulinas.

Por outro lado, a hiperplasia notada em áreas T-dependentes após a segunda imunização, está de acordo com vários autores que afirmam que 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 de memória que respondem mais eficazmente que as células virgens durante as repostas primárias (MACLENNAN *et al.*, 1992; BOUSSO & KOURILSKY, 1999; SAKAMOTO & CABRERA, 2003).

Os achados descritos neste trabalho sugerem também que o imunógeno utilizado foi capaz de provocar uma resposta imune com produção de células de memória, uma vez que segundo MORRISON *et al.* (1986), as duas principais funções dos CGs são a produção de células de memória e a regulação do nível e duração da resposta de anticorpos, além do mais, considera-se que as características histológicas dos CGs constatadas neste estudo, também descritas por vários autores em órgãos linfóides periféricos de bovinos (SAKAMOTO & CABRERA, 2003), são características do

desenvolvimento de CGs em resposta a antígenos T-dependentes (FREITAS, 2001; RESENDE, 2003).

HOLLOWOOD & GOODLAD (1998) explicam 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 quatro-seis 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 parcialmente semelhantes aos observados nos linfonodos dos bovinos imunizados com SBm7462 já que, concomitantemente à formação de CGs houve áreas extrafolículos de ativação de células B, as quais foram caracterizadas pela presença de células linfoblásticas associadas às células dendríticas. Porém, nesta pesquisa, discretas alterações dos CGs foram observadas aos 7 dias após a primeira imunização e tipicamente até o 15º dia (Fig., 5A e 5B).

Considerando o demonstrado por FREITAS (2001) e RESENDE (2003), onde se evidenciou o aparecimento de CGs prematuramente em linfonodos de bovinos quando inoculados com *Babesia bovis* ou *Anaplasma marginale*, e o constatado neste estudo, é aceitável pressupor que, os imunógenos sintéticos sejam mais lentamente processados pelo sistema monocítico fagocitário (SMF) que as proteínas íntegras ou de alto peso molecular. De fato isto pode explicar de alguma maneira o observado neste trabalho com respeito ao desenvolvimento, cronologicamente diferente, dos centros germinais, porém não na intensidade dos mesmos nem na sua funcionalidade. No entanto é importante considerar que as vias e doses foram diferentes às utilizadas neste trabalho.

O argumentado encontra respaldo no relatado por BONA *et al.* (1998) ao inferirem que a imunogenicidade de peptídeos sintéticos vê-se influenciada pelo seu reduzido tamanho molecular e a sua susceptibilidade de degradação por enzimas proteolíticas, além de que segundo BOT *et al.* (1996) se requer um número considerável de complexos MHC II-peptídeo para ativar eficientemente as células T CD4⁺ durante as respostas imunes. O que é mesmo observado

nas respostas a um número variável de patógenos virais, parasíticos e bacteriais, uma vez que apresentam repetidas estruturas que resultam atrativas para os receptores do sistema imune e conseqüentemente induzem uma ativação policlonal.

Os resultados obtidos por PORTELA (2000), PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002) no que se refere a eficiência do peptídeo SBm7462, indicam que este peptídeo poderia cumprir com as premissas anteriormente descritas.

5.3 Avaliação imunohistoquímica dos linfonodos pré-escapulares

5.3.1 Apoptose

Com a Hibridização *in situ* nos tecidos linfóides mediante o método de TUNEL usado para detectar células apoptóticas evidenciou-se, sete dias após a primeira imunização com SBm7462, um considerável número de células apoptóticas na região paracortical as quais se encontravam formando grupos celulares (Fig., 6A). Nos linfonodos, 15 dias após a primeira imunização, observou-se pouca apoptose na região paracortical e um incremento perto da união cortico-medular, nos centros germinativos e na região medular profunda. Porém, quando se observou nos CGs, geralmente localizavam-se nas regiões basais da zona escura (Fig., 7A e 7B).

A partir do quinto dia após a segunda imunização, células TUNEL⁺ foram mais numerosas nos cordões medulares, sendo observadas na sua maioria dispersas (Fig., 6B), contrariamente ao achado nos linfonodos controle nos quais nota-se pouca positividade, tanto nos CGs quanto nos cordões medulares

Aos cinco e quinze dias após segunda e terceira imunizações, a freqüência de células TUNEL⁺ na paracortical e CG é menor do que a observada aos 15 dias da primeira imunização.

O aparecimento de células TUNEL⁺ durante a formação dos CGs após a imunização com o peptídeo sintético SBm7462, certamente está relacionado com a rápida proliferação das células B ativadas após interação com células dendríticas e linfócitos T, o que implica que estas células teriam sido

selecionadas negativamente e induzidas à morte por apoptose, seguramente pela não expressão de moléculas anti-apoptóticas.

É provável que estes mecanismos houvessem garantido a eliminação de células auto-reativas e aquelas que não foram capazes de interagir eficientemente com o SBm7462 presente nas FDC.

A este respeito, THORBECKE *et al.* (1994), relacionam a apoptose de células B nos CGs à intensa e rápida proliferação destas células. Consideram, também, devido ao fato de que os CGs são um microambiente favorável tanto para a proliferação quanto para a morte celular, eles representariam o local ideal para seleção e expansão de células de memória com alta afinidade contra o antígeno que as induziu. Similarmente, 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 portanto uma alta taxa de morte destas células *in vivo* quando não houver este reconhecimento.

THORBECKE *et al.* (1994), avaliando centros germinativos de tonsilas humanas 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 através da interação CD40-CD40L.

Baseado no anterior, é evidente que neste trabalho a presença de células TUNEL⁺ nessas zonas representaria, possivelmente, a não interação entre as células B ativadas nas áreas extrafoliculares e que migraram para os folículos linfóides com as FDC, sendo subsequentemente induzidas à apoptose. Este achado também encontra explicação nos trabalhos de LIU *et al.* (1997) e LEBECQUE *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 consequências 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, as células B que entrarem no 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 região basal da zona clara e que as mesmas pareciam estar em íntimo contato com as células dendríticas.

Neste trabalho as células que mostraram reatividade positiva à coloração de TUNEL nas regiões corticomedulares ou paracorticais profundas podem ser aquelas cujo receptor para o antígeno também era de baixa afinidade e não sofreram a mutação somática por não ter entrado à zona escura do CG, confirmando assim o seu aparecimento já no sétimo dia após a primeira imunização, uma vez que no início da resposta imune as células B que proliferam produzem imunoglobulinas com baixa afinidade.

Neste estudo constatou-se um maior número de células TUNEL⁺ na segunda semana após a primeira imunização com SBm7462, isto discorda com o reportado por HOLLOWOOD & GOODLAN (1998), que ressaltam que a morte das células B não selecionadas nos CGs produz um aumento massivo de morte por apoptose ao redor do sétimo dia pós-imunização, e o constatado por FREITAS (2001) e RESENDE (2003), que evidenciaram apoptose na primeira semana pós-inoculação quando trabalharam com protozoários e rickettsias respectivamente.

Por outro lado as numerosas células TUNEL⁺ que foram observadas nos cordões medulares e nas regiões corticomedulares 15 dias após a primeira imunização provavelmente precedem ao processo de involução das áreas extrafoliculares produtoras de anticorpos, já que segundo KENNETH *et al.* (1997) e SMITH *et al.* (1997), numa resposta T-dependente, esses focos regridem, como consequência de uma alta taxa de morte *in situ*.

Ainda, HOLLOWOOD & 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. Estes argumentos concordam com os resultados deste estudo, ao serem encontradas um menor número de células TUNEL⁺ nos CGs após a segunda imunização com o SBm7462. É possível que este declínio esteja associado com a regressão da reatividade dos CGs, implicando uma restringida proliferação e uma contínua migração de células B ou alternativamente um aumento de diferenciação de células previamente selecionadas, mais do que a morte massiva destas células.

Como 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, seria considerada como sendo um mecanismo de caráter homeostático que mantém a tolerância periférica a antígenos próprios.

A apoptose observada nas regiões paracorticais dos linfonodos, especialmente aos sete dias após a primeira imunização poderia refletir o afirmado por AHMED & GRAY (1996) que expõem que a resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ após o reconhecimento de um antígeno estranho também possui três fases, a ativação e expansão, a morte e a geração de células de memória. Segundo os autores, a primeira fase, durante a qual se observa grande proliferação das células T, tem duração de uma semana. Essa fase é seguida pela morte por apoptose de cerca de 95% das células produzidas, entre sete e 30 dias após o contato com o antígeno, servindo como um mecanismo de regulação do número de células e na conservação da homeostase. Finalmente, a terceira fase é caracterizada pela geração de células de memória, que pode persistir por muitos anos.

5.3.2 Imunohistoquímica para detecção de antígeno SBm7462

Nos animais imunizados foram encontradas células PAP positivas dispersas na região paracortical, interfolicular, cordões medulares e em centros germinais. As células marcadas foram claramente distinguíveis das células não marcadas.

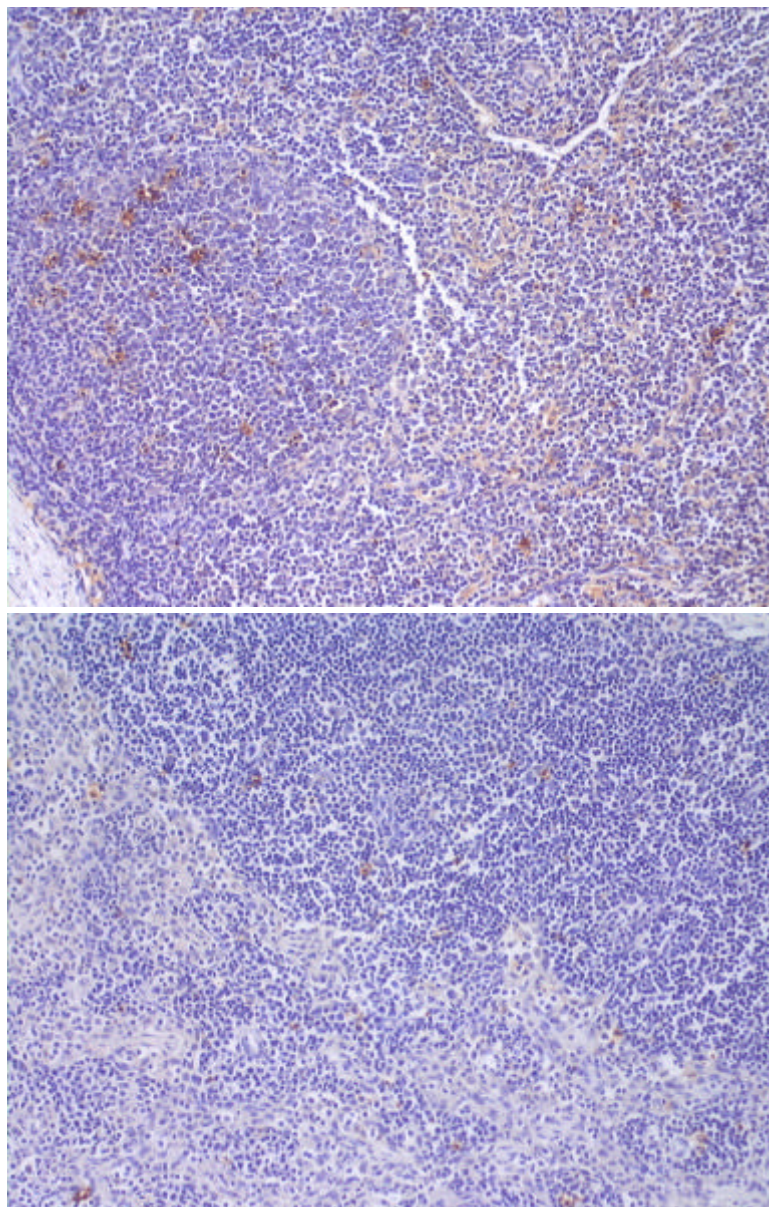


Figura 6 – Linfonodos de Bovinos imunizados com SBm7462 quinze dias após a primeira inoculação **A.** Células TUNEL⁺ (setas) localizadas na zona escura do centro germinal (cg) (200X) e nos cordões medulares (cm) TUNEL 200X **(B).** (c) cortical.

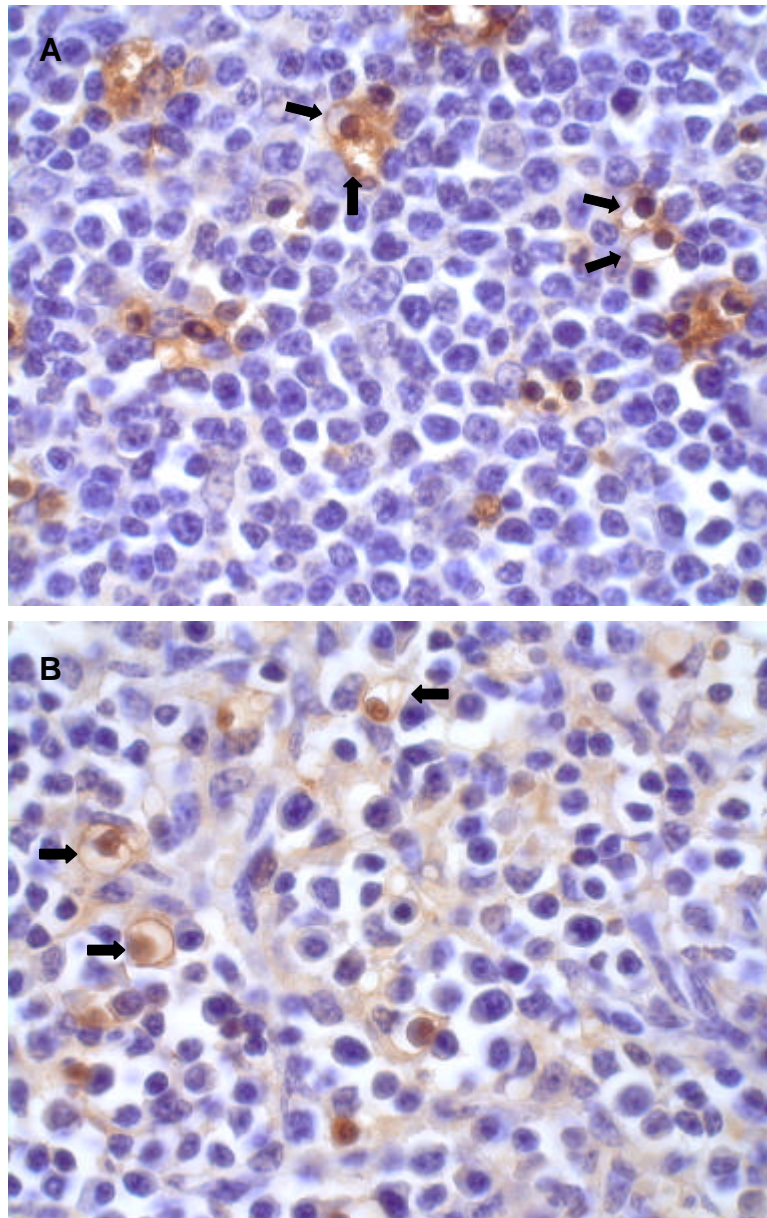


Figura 7– Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462. **A.** Células TUNEL⁺ nas zonas T-dependentes da região paracortical, sete dias após a primeira imunização. TUNEL 1000X. **B.** Células TUNEL⁺ na região medular profunda (setas) cinco dias após a segunda imunização. TUNEL 1000X.

Foi possível detectar positividade de FDC a partir da primeira semana após a primeira imunização, o mesmo não sendo observado no controle (Fig., 8C). Entretanto, cinco dias após a segunda imunização observaram-se, nos cordões medulares, células fortemente positivas.

Algumas das células positivas apresentavam-se com abundante citoplasma e prolongações evidentes à semelhança de células dendríticas, em quanto que outras apresentavam citoplasma escasso semelhante a células linfocíticas (Fig., 8A e 8B).

Geralmente, quando um antígeno é injetado através da via subcutânea, as mais prováveis carregadoras, processadoras e apresentadoras dele são as células dendríticas (HOWARD C.J *et al.*, 1999). No entanto neste trabalho é possível que um tipo celular diferente também esteja envolvido nesta apresentação, já que a existência de células PAP positivas não caracterizadas morfologicamente como dendríticas, poderiam representar ser linfócitos T $\gamma\delta$ WC1 ou B capacitados na apresentação antigênica; se bem que trabalhos desenvolvidos por COLLINS *et al.* (1998) demonstram que as células T $\gamma\delta$ WC1 são capazes de apresentar antígenos protéicos às células CD4⁺ e induzir a sua proliferação.

Ainda que não possa ser claramente evidenciado neste trabalho, o tipo ou derivação da célula envolvida na apresentação antigênica, este processo provavelmente ocorreu na primeira semana após a primeira imunização, já que observaram-se células linfocíticas interagindo com células dendríticas PAP-positivas nos linfonodos como visto nas figuras 6A e 6B, sugerindo que todos estes processos foram elicitados após a imunização com o peptídeo SBm7462.

A intensidade e a velocidade da resposta ao antígeno detectada pelo PAP na segunda imunização, pode ser devido a: primeiro, ao processo de maturação das células dendríticas ocorrido entre a primeira e a segunda imunização, segundo, como resultado do reconhecimento antigênico por células B antígeno-específicas geradas na resposta imune primária, e terceiro ao sequestro de imunoglobulinas ligadas a antígenos dentro das redes de células dendríticas.

Em efeito, assim afirmado por KOSCO-VILBOIS (1993), a interação do antígeno retido pelas FDC com células B, provê sinais que permitem de fato, a expressão da molécula B7-2 e conseqüentemente o incremento da capacidade

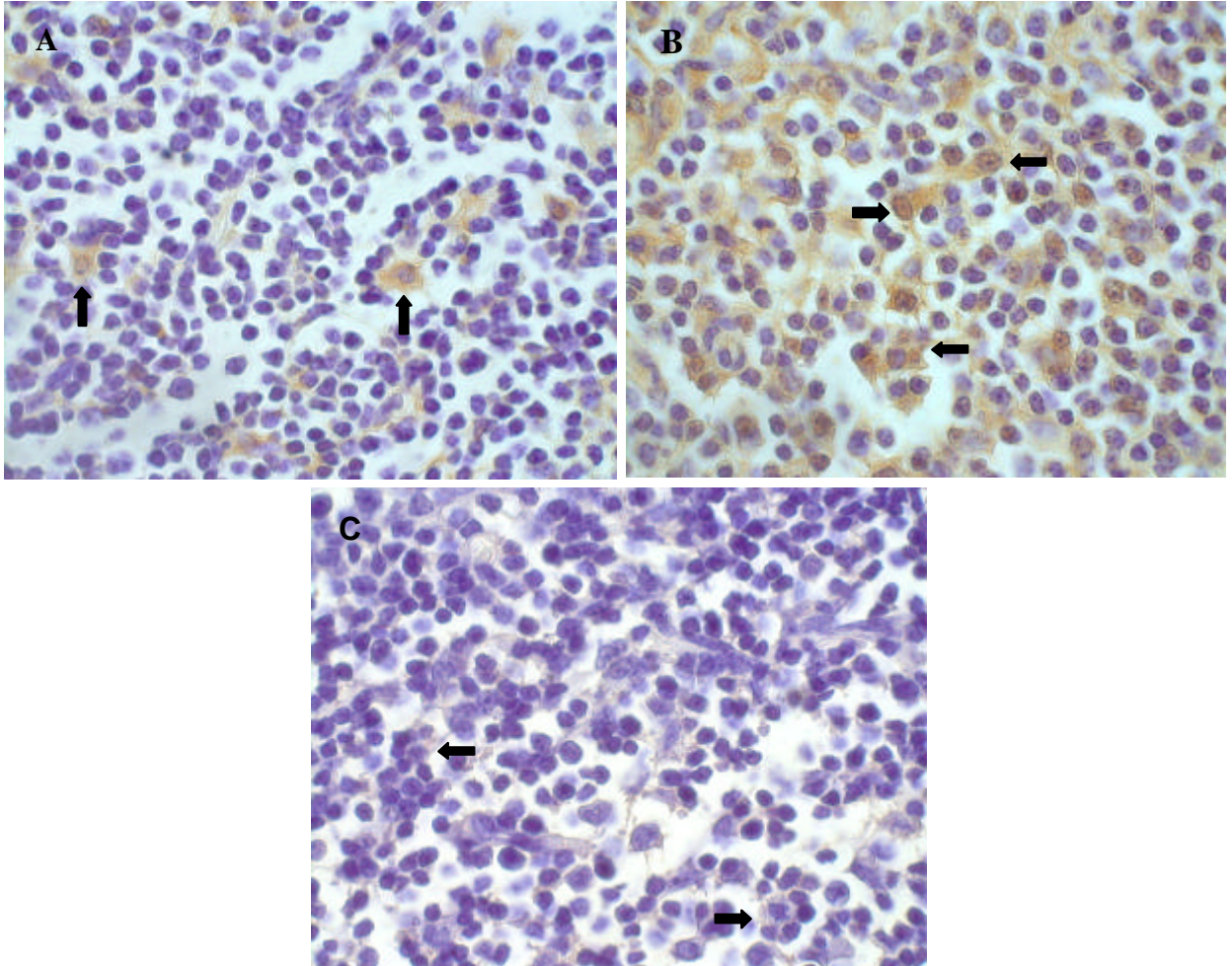


Figura 8 – Linfonodos de bovinos imunizados com SBm7462 apresentando Células Dendríticas Foliculares (setas). **A.** FDC PAP+ sete dias após a primeira imunização. **B.** FDC PAP+ cinco dias após a segunda imunização. **C.** Controle. PAP, 1000X.

APC destas células, o que resulta numa interação antígeno, célula B e T que somada à formação de um microambiente, provê estímulos suficientes para produzir uma resposta rápida.

Desta maneira segundo GRAY *et al.* (1996) a reposição contínua do antígeno pelas células PAP-positivas estaria envolvida na geração de células B de memória a partir de células ativadas logo após a seleção de mutantes somáticos com alta afinidade dentro dos centros germinais.

É factível que a memória gerada pelo imunógeno SBm7462 esteja associada a estes eventos; esta suposição se fundamenta na marcada apresentação de células PAP positivas verificadas neste experimento após cada imunização, somado às prévias evidências onde a re-imunização com SBm7462 em animais inoculados com sete meses de precedência produziu um aumento nos níveis de IgG SBm7462-específicas semelhantes aos apresentados duas semanas após a terceira inoculação (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

5.4 Efeitos da imunização com SBm7462 nas subpopulações de linfócitos circulantes bovinos.

5.4.1 Distribuição de linfócitos T, B e células não T não B (NTNB) em sangue periférico.

Foi observado que o percentual de células T totais não variou significativamente durante todo o período nos animais vacinados, e nos animais controle ($p > 0.05$). Esses valores oscilaram, em média, entre 54,01 a 60,31% e 58,67 a 63,70 % nos grupos imunizados e controles respectivamente (Tab., 2).

Os animais imunizados apresentaram porcentagem de linfócitos T totais (T CD4⁺ + T CD8⁺ + WC1⁺) ligeiramente menores que os controles. Não obstante, em relação aos linfócitos B CD21⁺ estes apresentaram porcentagens maiores ao serem comparados com os controles, esses últimos com porcentagens de linfócitos B CD21⁺ inferiores a 24,28% enquanto que os imunizados obtiveram porcentagens de até 39,51% (Tab., 2).

Trabalhando com esta mesma população foi notado um incremento gradual na porcentagem de células no grupo imunizado após a primeira imunização. Como é mostrado na Tabela 2 e Figura 9A, os valores máximos foram evidenciados 15 dias após a primeira imunização e 10 dias após a terceira imunização com 36,84% e 39,51% respectivamente, se bem que foi notada uma diferença estatisticamente significativa quando comparadas com as médias dos mesmos na pré-imunização ($p < 0.05$) (Tab., 2).

De acordo com os dados anteriormente expostos, é possível indicar que o incremento das células CD21⁺ após a primeira imunização com o SBm7462 possa estar relacionado, principalmente, com mais duas evidências: primeiro com a proliferação antígeno-específica observada nos linfonodos quando formados os CGs nesses mesmos períodos e segundo com a presença de anticorpos antígeno-específicos a partir da segunda semana os quais foram aumentando progressivamente na resposta imune secundária e terciária.

Supõe-se que as células diferenciadas efetoras provêm de células CD21⁺, então é provável que a especificidade das células CD21⁺ ao SBm7462 tenha aumentado após cada imunização. De fato, embora as DO de imunoglobulinas SBm7462-específicas em soro incrementarem progressivamente no decorrer do período, não foi notado um aumento tão marcado de células em PBL na resposta secundária e terciária; isto imunologicamente se encontra ainda confirmado pela discreta apoptose observada nos CGs de linfonodos após a segunda e terceira imunização. Portanto é factível que essa população circulante contenha células altamente afins que saíram dos centros germinais e após se diferenciarem em células de memória, as quais expressam um fenótipo característico de residência, migraram a locais específicos onde desempenharam uma ação efetora. Essa migração, segundo ROTHKÖTTER *et al.* (1999) ocorre como um mecanismo de transporte da informação imunológica entre diferentes compartimentos do sistema imune.

Em relação às células NTNB, percebe-se que houve uma queda de porcentagens nos animais imunizados após a primeira imunização e manteve-se relativamente igual até a última amostragem. É importante ressaltar que essas diferenças são mais evidentes, no dia 35, sugestivamente como resultado do aumento de outros tipos celulares em circulação como as células

CD21⁺ e algumas outras subpopulações de linfócitos T nos animais imunizados, não ocorrendo igual nos controles (Fig., 9A).

Experimentos similares, realizados em bovinos reportaram porcentagens de NTNB maiores aos aqui referidos (BITTAR, 2002). Isto possivelmente se deve a que neste trabalho, além de ser determinada, a população WC1 foi incluída como parte da população total de linfócitos T, por isto, conseqüentemente refletido na porcentagem das células consideradas como não T e não B.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$) entre as porcentagens de células T dos diferentes períodos, notou-se uma predominância desta população circulante com respeito a outras populações. Nesse caso é possível que as variações de células circulantes entre períodos tenham sido tão discretas, não sendo suficientes para marcar esta diferença, ou alternativamente, como conseqüência do alto coeficiente de variação apresentado entre as médias dos animais.

É preciso ressaltar que as diferenças nas porcentagens apresentadas em algumas das populações nos dois grupos ao iniciarem o experimento não afetaram de maneira alguma a análise dos dados, pois as observações comparativas foram feitas sobre o movimento das populações durante todo o período em cada um dos grupos, acrescenta-se que nos controles, as porcentagens permanecem sempre constantes no decorrer do período.

5.4.2 Distribuição dos linfócitos T CD4 , CD8 e WC1 em sangue periférico

Quando monitoradas, células CD4⁺ circulantes mostraram um sutil aumento a partir do quinto dia após a segunda imunização (22,35 %± DP 4,48%) o qual manteve-se até depois da terceira imunização (Tab., 2 e Fig., 8).

Por outro lado, nos fenótipos CD8⁺ não foi evidenciada uma diferença de porcentagens entre períodos e entre animais imunizados e controles. Nestes as médias apresentadas alcançaram 16,22% nos animais imunizados com SBm7462 e 17,88% no grupo testemunha (Tab., 3; fig., 9B).

Tabela 2 – Médias das porcentagens dos células T totais (CD4⁺ +CD8⁺+ WC1⁺), B CD21⁺ e NTNB de leucócitos do sangue periférico (PBL) congelado proveniente de bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As imunizações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.

Grupo	Porcentagem de linfócitos T totais				
	DIAS				
	Pré		Pós-imunização		
	-1	15	35	63	70
Imunizado	55,75 (±6,53)	56,75 (±8,83)	60,31 (±3,74)	57,00 (±3,87)	54,01 (±2,14)
Controle	59,90 (±7,54)	63,15 (±3,13)	63,70 (±0,96)	62,48 (±2,04)	58,67 (±6,3)

Grupo	Porcentagem de linfócitos B CD21 ⁺				
	DIAS				
	Pré		Pós-imunização		
	-1	15	35	63	70
Imunizado	29,85 (±3,10)	36,84* (±3,29)	34,12 (±2,31)	35,73 (±3,36)	39,51* (±6,7)
Controle	23,16 (±0,16)	21,67 (±0,80)	22,37 (±1,75)	24,28 (±1,35)	22,92 (±6,36)

Grupo	Porcentagem de linfócitos NTNB				
	DIAS				
	Pré		Pós-imunização		
	-1	15	35	63	70
Imunizado	14,4 (±9,62)	6,81 (±6,31)	5,57 (±4,44)	7,27 (±5,89)	7,48 (±6,46)
Controle	16,94 (±7,38)	15,19 (±3,93)	13,93 (±0,79)	13,25 (±0,69)	18,42 (±0,06)

* diferentes estatisticamente ($p < 0,05$)

Estes dados concordam com BITTAR (2002), onde foram demonstradas porcentagens celulares muito similares a estes, ao trabalhar em bovinos imunizados com peptídeos sintéticos provenientes de RAP-1 de *B. bovis*.

Na imunidade celular e na proteção gerada por este tipo de resposta, os principais elementos são as células T. De fato as células T CD8⁺ se encontram francamente relacionadas com respostas a parasitas intracelulares, vírus ou antígenos citosólicos que induzem a expressão de moléculas MHC da classe I. Suas propriedades têm sido estudadas a nível de citotoxicidade e como células efectoras (CERWENKA *et al.*, 1999), mais do que como indutoras de uma resposta. Além disso, foi demonstrado que a proteção que este tipo celular pode oferecer a esses antígenos está diretamente relacionada com a sua capacidade de migração e efetividade citolítica aos locais ativos de infecção.

Com isto, e sustentado no argumento anterior é plausível sugerir que o SBm7462 não altera a proporção circulante desta população. Ao contrário de antígenos intracelulares, é factível que o peptídeo sintético tenha entrado numa via diferente de processamento à endocítica e, conseqüentemente tenha sido apresentado no contexto de MHC da classe II às células T CD4⁺ específicas iniciando com isto uma resposta tangível em populações diferentes às CD8⁺ (BONA *et al.*, 1998). Então, pode-se indicar que neste trabalho o aparecimento destas células na circulação ocorre como um processo tipicamente fisiológico o que, segundo MACKALL *et al.* (1997), permite a regeneração do repertório de células T “naive” e a manutenção da diversidade.

Contrariamente ao apresentado anteriormente com a população CD8⁺, os linfócitos T WC1⁺ mostraram variações no decorrer do período; esta população aumentou cinco dias após a segunda imunização e diminuiu nos dias subseqüentes se comparados com as porcentagens da pré-imunização (Tab., 3).

Estudos de respostas imunes bovinas têm demonstrado o envolvimento das células T $\gamma\delta$ e WC1⁺ em infecções com uma variedade de agentes (POLLOCK *et al.*, 1996; SOLTYS e QUINN, 1999). Esse envolvimento pode estar relacionado com a capacidade que estas células têm não só de reconhecerem antígenos de tipo protéico e não protéico; assim como afirmado

por WELSH *et al.* (2002), como também de apresentá-los às células CD4⁺ (COLLINS *et al.*, 1998). A isto, se acrescenta o evidenciado por LESLIE *et al.* (2002) quando trabalharam co-culturas de células T $\gamma\delta$ com células dendríticas e observaram a alta expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície destas últimas. Os mesmos autores afirmam que as células T $\gamma\delta$ WC1⁺ estariam envolvidas na maturação de células dendríticas e na apresentação eficiente de antígenos peptídicos a células CD4⁺ “naive”.

Nesse sentido, é possível que as células T $\gamma\delta$ WC1⁺ exerçam um papel duplo que promova a resposta imune adaptativa ao SBm7462. Por um lado, baseado no afirmado por COLLINS *et al.* (1998), estas células apresentam o peptídeo SBm7462 às células CD4⁺ ou, atendendo ao constatado por LESLIE *et al.* (2002), colaboram diretamente com a maturação de células dendríticas e as capacitam na apresentação antigênica durante a resposta imune primária.

De certa forma isso concorda com o evidenciado neste experimento quando, concomitantemente à queda de células T $\gamma\delta$ em PBL, iniciou-se eficiente apresentação antigênica às células CD4⁺ observadas pela hiperplasia de áreas T dependentes em linfonodos e a presença de células PAP positivas interagindo entre e com células linfocíticas.

O decréscimo progressivo de células T $\gamma\delta$ na resposta imune a partir da segunda imunização até o final do período e a apresentação concomitante de IgG1, pode estar sustentado pelo postulado por KENNEDY *et al.* (2002) ao afirmarem que a depleção destas células resulta na diminuição da produção de INF γ e o aumento da IL-4 com reduzidos níveis de IgG2, e neste trabalho o aumento da IL-4 poderia representar o estímulo necessário, embora não o único, na troca de isotipos no período seguido da segunda imunização.

5.4.3 Relação de linfócitos T/B e T CD4/ CD8 em sangue periférico

A subpopulação de células T CD8⁺ circulantes de bovinos imunizados avaliada em relação à subpopulação de células T CD4⁺ foi menor durante todo o período. Se bem que foi notado um aumento numérico da relação CD4:CD8, cinco dias seguidos da segunda imunização como demonstrado na Tabela 3,

não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas comparativamente entre coletas dos imunizados, e entre imunizados e controle.

Em media, as proporções CD4:CD8 dos animais imunizados e controle estiveram acima das relatadas por outros autores ao trabalharem dados de distribuição de linfócitos em sangue periférico com bovinos jovens *Bos taurus*, que obtiveram relações de 1,1 nas suas análises, ainda que, com porcentagens de linfócitos muito menores aos apresentados neste trabalho (HERMOSILLA *et al.*, 1999). Não obstante a similaridade de TUO W. (1999); POLLOCK *et al.* (2001) e BITTAR (2002), continuaram tendo predominância de células CD4⁺.

Tem-se evidenciado relações CD4/CD8 iguais ou maiores às descritas neste trabalho em animais após de infecção experimental com *Micobacterium bovis*, (POLLOCK *et al.*, 2001; RHODES *et al.*, 2000; VANDEN BUSH, 2003), isto pode de alguma maneira sugerir que o SBm7462 induz uma resposta no sistema imune com efeitos evidentes sobre a expansão da população CD4 mais do que a CD8⁺. De fato, esta se considera a população mais envolvida nas respostas imunes adquiridas na maioria de antígenos protéicos (RHODES *et al.*, 2000), pois a expansão celular inicial em respostas ao reconhecimento antigênico é, principalmente, mediada por uma via de crescimento autócrino gerada a partir das células CD4⁺.

Foi evidenciada uma discreta diminuição da relação T/ B nos animais imunizados ao longo do experimento e uma notável diferença quando comparada com os animais controle.

Apesar da média da relação T/B ser menor desde o começo do experimento nos imunizados do que nos controles (Tab., 4), nestes últimos apresentou-se sem nenhuma variabilidade durante todo o período o que indica que houve um movimento diferente nas populações T/B só dos animais imunizados.

No entanto, em ambos os casos, as porcentagens de LT totais não foram considerados significativamente diferentes. Isto sugere que a diferença de relações T/B está em função, principalmente, do aumento das células CD21⁺. Os dados concordam parcialmente com o descrito em outro trabalho que observou uma diminuição dessa relação após a terceira imunização (BITTAR, 2002), e reforça que a imunidade humoral também é considerada importante na avaliação da resposta a imunógenos peptídicos de tipo sintético

Tabela 3 – Médias das porcentagens dos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e WC1⁺ obtidos de PBL congelado de bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As inoculações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.

Grupo	Porcentagem de linfócitos WC1 ⁺				
	DIAS				
	Pré	Pós-imunização			
	-1	15	35	63	70
Imunizado	22,23 (±5,10)	20,72 (±5,74)	24,93 (±7,28)	19,99 (±3,9)	15,82 (±0,87)
Controle	20,17 (±1,42)	20,81 (±6,19)	20,99 (±7,79)	18,11 (±5,49)	14,57 (±6,44)

Grupo	Porcentagem de linfócitos CD4				
	DIAS				
	Pré	Pós-imunização			
	-1	15	35	63	70
Imunizado	20,38 (±0,80)	20,37 (±5,67)	22,35 (±4,48)	22,33 (±2,94)	22,12 (±3,14)
Controle	23,81 (±6,79)	26,20 (±1,51)	26,06 (±6,02)	28,42 (±3,37)	26,23 (±1,22)

Grupo	Porcentagem de linfócitos CD8 ⁺				
	DIAS				
	Pré	Pós-imunização			
	-1	15	35	63	70
Imunizado	13,15 (±1,74)	15,26 (±4,66)	13,03 (±0,98)	14,67 (±4,19)	16,22 (±5,09)
Controle	15,93 (±2,17)	16,14 (±1,58)	16,66 (±0,81)	15,95 (±0,08)	17,88 (±1,08)

Tabela 4 – Médias da relação das porcentagens dos linfócitos T CD4⁺ /CD8⁺ e T/B obtidos de PBL congelado de bovinos imunizados com SBm7462 e controles. As inoculações foram feitas nos dias 0, 30 e 60.

Grupo	Porcentagem de linfócitos CD4 ⁺ /CD8 ⁺				
	DIAS				
	Pré	Pós-imunização			
	-1	15	35	63	70
Imunizados	1,57 (±0,23)	1,46 (±0,66)	1,73 (±0,43)	1,63 (±0,56)	1,55 (±0,55)
Controles	1,48 (±0,22)	1,63 (±0,06)	1,56 (±0,29)	1,78 (±0,20)	1,47 (±0,16)

Grupo	Porcentagem de linfócitos T/B				
	DIAS				
	Pré	Pós-imunização			
	-1	15	35	63	70
Imunizados	1,87 (±0,03)	1,55 (±0,35)	1,77 (±0,16)	1,60 (±0,16)	1,37 (±0,26)
Controles	2,59 (±0,34)	2,91 (±0,04)	2,86 (±0,27)	2,58 (±0,23)	2,70 (±1,02)

Da mesma forma, estudos em modelos bovinos têm indicado que várias subpopulações de linfócitos T têm um papel potencial nas respostas a antígenos protéicos (RHODES *et al.*, 2000). No entanto, é possível que as subpopulações de células T diferem nas especificidades das suas respostas, as quais estão relacionadas à propriedades do antígeno que determinam o reconhecimento pelos diferentes tipos celulares, com a subsequente ativação, proliferação e migração (GOFF *et al.*, 2002; ESTES & BROWN 2002).

Muitas das propriedades secretoras e migratórias das células estão relacionadas com esse fenótipo ativador, uma vez que, segundo STOOLMAN (1989), a variabilidade no tráfego ou residência seletiva de células é

dependente da expressão de moléculas de superfície que permitem evidentemente, a interação, proliferação e finalmente o movimento.

SALLUSTO & LANZAVECCHIA (1998) afirmam que, em células T efectoras, as moléculas de superfície requeridas para a migração a linfonodos, encontram-se diminuídas, enquanto que, são altamente expressas em células de memória, fato este que determina a recirculação seletiva no sistema linfático.

Neste trabalho, a recirculação seletiva pode se dar de forma diferente nas distintas subpopulações, pois de fato cada subpopulação é ativada e exerce funções efectoras diferentes uma da outra (KLÜNNER *et al.*, 2001).

As variações observadas nas populações T, após a sensibilização com o SBm7462, podem estar relacionadas com a mobilização e migração de células seguida da proliferação específica, no caso que aumentem ou, quando diminuïrem, com o recrutamento nos locais específicos entrando a fazer parte de populações residentes de memória ou, simplesmente como resultado de uma proliferação diminuída.

É importante considerar, na avaliação destes dados, a diferença nas respostas de cada animal, pois apesar de serem mantidos e selecionadas dentro de características as mais homogêneas possíveis, a influência do polimorfismo dos genes que codificam para o MHC entre eles, torna evidente a variabilidade na resposta. Além disso, é óbvio que a significância destes resultados pode ser comprometida pelo limitado número de bovinos utilizados; entretanto a realização deste trabalho pretendia caracterizar a resposta e não o de fazer uma análise extensiva da mesma.

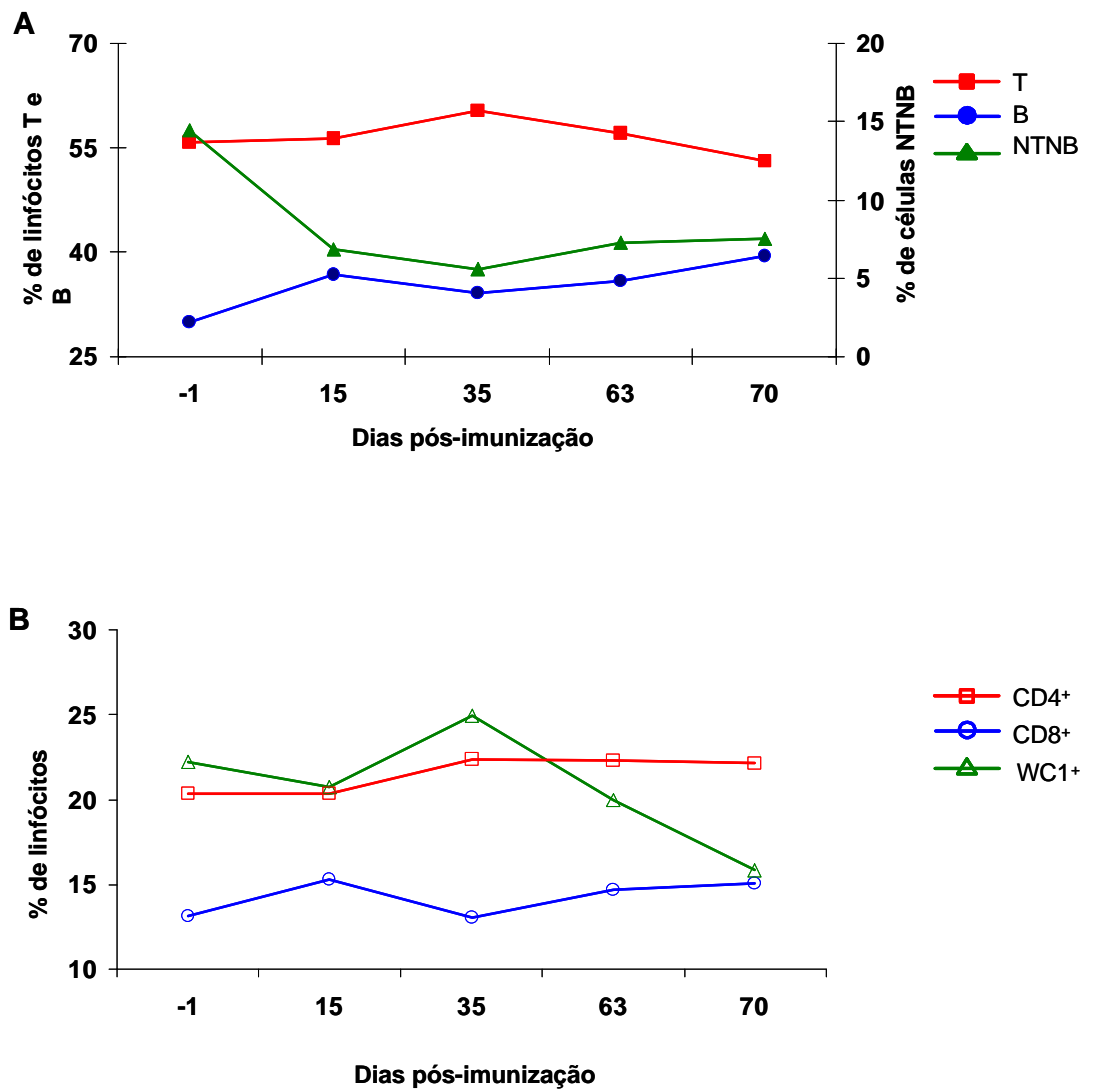


Figura 9 – Representação das mudanças de populações de leucócitos circulantes em bovinos após imunização com SBm7462 ($n=3$). **A.** Células T, B e NTN B. **B.** linfócitos T WC1 $T\gamma\delta$, $CD4^+$ e $CD8^+$. Os resultados estão apresentados como médias das percentagens de células circulantes obtidas de PBL congelado e analisadas por citometria de fluxo

6. CONCLUSÕES

- O peptídeo sintético SBm7462 utilizando saponina como adjuvante, estimulou o sistema imune de bovinos.
- A resposta imune humoral induzida pelo peptídeo sintético foi caracterizada pela geração predominante de anticorpos antígeno específicos da classe IgG1.
- O peptídeo sintético induz uma resposta polarizada tipo 2 com padrão de expressão da subclasse IgG1 e ausência de citocinas do tipo 1.
- A resposta imune induzida pelo SBm7462 se caracteriza nos tecidos linfóides, pela formação típica de estruturas que conferem especificidade e memória quinze dias após a primeira imunização.
- O peptídeo SBm7462 induz apoptose em células linfocíticas residentes em órgãos linfóides secundários.
- Foi demonstrado por imunohistoquímica que o peptídeo SBm7462 é encontrado em órgãos linfóides secundários a partir da primeira semana após a imunização.

- Os animais imunizados com SBm7462 desenvolveram uma resposta imune que promove mudanças nas populações circulantes de linfócitos CD21⁺, CD4⁺ e WC1⁺

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, S., FLOYD, M., SONENSHINE, D. E. Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari: ixodidae): vaccination using tick antigens. **J. Med. Entomol.**, v.17, n.5, p.391-397, 1980.
- 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.
- AHMED R. and GRAY G. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding their Relation. **Science**, v. 272, p.54-59, 1996.
- ALLEN, J. R Tick resistance, basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **Int. J. Parasitol.**, v.3, p.195-200, 1973.
- ARPIN C, DECHANET J, VAN KOOTEN C, MERVILLE P, GROUARD G, BRIERE F, BANCHEREAU J, LIU YJ Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. **Science**, v.,268, p. 720-2, 1995.
- BALDWIN CL, SATHIYASEELAN T, ROCCHI M, MCKEEVER D. Rapid changes occur in the percentage of circulating bovine WC1(+)gamma delta Th1 cells.**Res Vet Sci.**, v.69, n.2, p.175-80, 2000.
- BITTAR F.F. JOELY . Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*: avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral. **TESE** (Doutorado). B.H. UFMG, 88p.,2002

BONA, C. A., CASARES, S., BRUMEANU, T., D. Towards development of T-cell vaccines. **Immunol. Today**, v. 19, n. 3, p.126-132, 1998.

BOT A, BOT S, ANTOHI S, KARJALAINEN K, BONA C. Kinetics of generation and persistence on membrane class II molecules of a viral peptide expressed on foreign and self proteins. **Immunol.**, V.15,n.8, p. 3436-42,1996,

BOUSSO, P. KOURILSKY, P. A clonal view of ab T cell responses. **Semin. Immunol.**, v. 11, p. 423-431, 1999.

BRADLEY LM, HARBERTSON J, WATSON SR. Memory CD4 cells do not migrate into peripheral lymphonodes in the absence of antigen. **Eur J Immunol.** v.103, p. 273-84, 1999

BROCKER T, GULBRANSON-JUDGE A, FLYNN S, RIEDINGER M, RAYKUNDALIA C, LANE P. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. **Eur J Immunol.** V.29, n.5, p.1610-6, 1999.

BROSSARD, M, FIVAZ V. Ixodes ricinus L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested and reinfested rabbits. **Parasitolo**, v.85, p. 583-592, 1982.

BROSSARD, M, WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Exp. Appli. Acarol.*, v. 7, p. 5-13, 1989.

BROWN WC, MCELWAIN TF, PALMER GH, CHANTLER SE, ESTES DM. 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.155-64,1999

BROWN WC, WOODS VM, CHITKO-MCKOWN CG, HASH SM, RICE-FICHT AC Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. **Infect Immun.** V.62, n.11, p. 4697-708,1994.

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

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, 1998.

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, 1993.

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

CANALES M, ENRIQUEZ A, RAMOS E, CABRERA D, DANDIE H, SOTO A, FALCON V, RODRIGUEZ M, DE LA FUENTE J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. **Vaccine**, v.15, n.4, p.414-22, 1997.

CERWENKA A, MORGAN TM, DUTTON RW. Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. **J. Immunol.**;v.163, n. 10):5535-43,1999b.

CERWENKA A, MORGAN TM, HARMSSEN AG, DUTTON RW. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. **Exp. Med.**, v.189, n.2,423-34,1999a.

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-g but not interleukin-2 or interleukin-4 by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 15, p. 915-922, 1995.

CIPRIANI B, BORSELLINO G, POCCIA F, PLACIDO R, TRAMONTI D, BACH S, BATTISTINI L, BROSNAN CF. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. **Blood.**, v. 95, n. 1, p. 39-47, 2000.

COBON, G., HUNGERFORD, WOODROW M., SMITH, D., WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. Recombinant Vaccines for the control of cattle tick. Habana: **Elpos Scientiae**, 280 p., 1995

COLLINS RA, WERLING D, DUGGAN SE, BLAND AP, PARSONS KR, HOWARD Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells. **J Leukoc Biol.** v.63,n.6,p.707-14, 1998.

CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 513-544, 1995.

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

DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., GARCIA-CARCIA, J. C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 916, p.617-621, 2000.

DUTTON RW, BRADLEY LM, SWAIN SL. T cell memory. **Annu Rev Immunol.**, v. 16,p.201-23,1998.

DUTTON RW, SWAIN SL, BRADLEY LM. The generation and maintenance of memory T and B cells. **Immunol Today.**, v.20, n.7, p. 291-31999

ESTES DM, BROWN WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.90, n.1-2, p.1-10, 2002,

ESTES DM. Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.54 n. 1-4, p 61-7,1996.

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. *Cellular Immunology*, v.163, p.268-279, 1995.

FAUSTINO, M. A. G., OLIVEIRA, M. P. B. Eficácia "in vitro" de produtos carrapaticidas em fêmeas ingurgitadas de cepas de *Boophilus microplus* do município de Garanhuns-PE. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Anais**, Goiânia: SOGOVE, p.156, 1996.

FERREIRA BR, SILVA JS. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology.**, v. 96, n.3, p.434-9,1999.

FERREIRA BR, SILVA JS. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Vet Immunol Immunopathol.**, v.64, n.3,p.279-93, 1998.

FERREIRA BR, SZABO MJ, CAVASSANI KA, BECHARA GH, SILVA JS. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Vet Parasitol.**, v.115, p.135-48, 2003.

FLYNN S, TOELLNER KM, RAYKUNDALIA C, GOODALL M, LANE P. CD4 T Cell Cytokine Differentiation: The B Cell Activation Molecule, OX40 Ligand, Instructs CD4 T Cells to Express Interleukin 4 and Upregulates Expression of the Chemokine Receptor, Blr-1. **J Exp Med.**;v.188, n. 2, p. 297-304,1998.

FREITAS, C.M.B. Resposta imune induzida por *Babesia bovis* (Starcovicci, 1983): reconhecimento e ativação ex vivo de PBMC por peptídeos sintéticos e eventos celulares em linfonodos de bovinos. Viçosa: UFV, 2001. 91p. **Tese** (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

FU, Y., SAINT-ANDRÉ, M.I., MARCHAL, T., BOSQUET, G., PETAVY, A.F. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66kDa protein of

Echinococcus granulosus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 74, p. 195-208, 2000.

GOFF WL, JOHNSON WC, PARISH SM, BARRINGTON GM, ELSASSER TH, DAVIS WC, VALDEZ RA. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gamma- and TNF-alpha-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 84, n. 3-4, p. 237-51, 2002.

GOUGH, J. M., KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labelling. **J. Parasitol**, v. 79, p. 900-907, 1993.

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

GUIMARAES, A. M., LIMA, J. D., RIBEIRO, M. F., CAMARGOS, E. R., BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *Boophilus microplus* ticks. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 69-74, 1998.

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

GULBRANSON-JUDGE., and MACLENNAN, I. 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.

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

HOLLOWOOD, K., GOODLAD, J.R. Germinal centre cell kinetics. **J. Pathol.**, v. 185, p. 229-233, 1998.

HORN, S. C., ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Vet.**, v.4, n.1, p.12-32, 1985.

HOWARD, C.J.; BROOKE, G.P.; WERLING, D.; SOPP, P.; HOPE, J.C.; PARSONS, K.R.; COLLINS, R.A. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.72, p.119-124, 1999b.

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

HUR DY, KIM DJ, KIM S, KIM YI, CHO D, LEE DS, HWANG Y, BAE K, CHANG KY, LEE WJ. Role of follicular dendritic cells in the apoptosis of germinal center B cells. **Immunol Lett.**, v. 72, n. 2, p. 107-111, 2000.

JACKSON LA, OPDEBEECK JP. The effect of antigen concentration and vaccine regimen on the immunity induced by membrane antigens from the midgut of *Boophilus microplus*. **Immunology.**, v. 68, n. 2, 272-6, 1989

JACKSON LA, OPDEBEECK JP. Humoral immune responses of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Parasite Immunol.**, v.12, n. 2, p. 141-51, 1990.

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

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

KENNEDY HE, WELSH MD, BRYSON DG, CASSIDY JP, FORSTER FI, HOWARD CJ, COLLINS RA, POLLOCK JM. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. **Infect Immun.**, v. 70, n. 3, p. 1488-500, 2002.

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

KLÜNNER T, BARTELS T, VORDERMEIER M, BURGER R, SCHAFER H. Immune reactions of CD4- and CD8-positive T cell subpopulations in spleen and lymph nodes of guinea pigs after vaccination with *Bacillus Calmette Guerin*. **Vaccine.**, v. 19, n. 15-16, p. 968-7, 2001.

KOSCO-VILBOIS MH, GRAY D, SCHEIDEGGER D, JULIUS M. Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen-presenting cells: induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules. **Exp Med.**, v. 178, n. 6, p. 2055-66, 1993.

KOSCO-VILBOIS MH, ZENTGRAF H, GERDES J, BONNEFOY JY. To 'B' or not to 'B' a germinal center? **Immunol Today.** 1997 May;18(5):225-30

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

LEBECQUE S, DE BOUTEILLER O, ARPIN C, BANCHEREAU J, LIU YJ. Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. **J Exp Med.**v. 185, n. 3, 563-71,1997

LEMOS, A. M. A resistência genética dos bovinos e controle do carrapato. **EMBRAPA –CNPGL**, Documentos, n.6, 42p, 1986.

LESLIE DS, VINCENT MS, SPADA FM, DAS H, SUGITA M, MORITA CT, BRENNER MB. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells.**Exp Med.**, v. 196, n.12, p.1575-84, 2002.

LIU, Y.J.; BOUTEILLER, O.; FUGIER-VIVIER, I. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. **Curr. Opinion Immunol.** , v. 9, p. 256-262, 1997.

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

MACKALL CL, HAKIM FT, GRESS RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. **Immunol Today**., v. 18, n. 5, p. 245-51, 1997.

MACKAY CR, MARSTON WL, DUDLER L, SPERTINI O, TEDDER TF, HEIN WR. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. **Eur J Immunol.**, v. 22, n. 4, p. 887-95,1992.

MACLENNAN M I C. Germinal Centers. **Ann Rev Immunol.** Vol. 12, p. 117-139,1994,

MACLENNAN, I.C.M., LIN, Y-J., JOHNSON, G.D. Maturation and dispersal of B cell clones during T cell-dependent antibody response. **Immunol. Rev.**, v. 126, p. 143-161, 1992.

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-g (IFN-g) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-g production in established Th2 cell clones. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1273-1283, 1994.

MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC” contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.4, p.167-173, 1995.

MATSUMOTO M, LO SF, CARRUTHERS CJ, MIN J, MARIATHASAN S, HUANG G, PLAS DR, MARTIN SM, GEHA RS, NAHM MH, CHAPLIN DD. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. **Nature**.;v.382, p.462-6,1996

MBOW, ML., RUTTI, B., BROSSARD, M. Infiltration of CD4-CD8- T cells and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1 and TNF- in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* L. **Immunol.** v.82, p.596-602, 1994

McGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunol**, v. 38, p. 249-256, 1979.

MCHEYZER-WILLIAMS MG. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol.*, v. 15 n.3, p. 354-61,2003.

MEEUSEN EN, PREMIER RR, BRANDON MR. Tissue-specific migration of lymphocytes: a key role for Th1 and Th2 cells? **Immunol Today.**, v. 17, n.9, p. 421-4,1996.

MORRISON WI, DAVIS WC. Individual antigens of cattle. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4- CD8- T lymphocytes (WC1, WC2).**Vet Immunol Immunopathol.**, v. 27, n.1-3, p. 71-6, 1991

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. H. Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur.Virol.**, v.137E, p.513-514, 1986.

OLIVEIRA, M.A.;PATARROYO, J.H.;PIMENTEL,J.C;SOSSAI, S. Avaliação da resposta imune secundária do peptídeo sintético SBm7462 em bovinos previamente inoculados no controle do carrapato *B.microplus* (CANESTRINI, 1887). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

OPDEBEECK, J. P., WONG, J. Y. M., JACKSON, L. A., DOBSON, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the tick, *Boophilus microplus*. **Immunol.**, v.63, n.3, p.363-367, 1988.

PATARROYO JH, PORTELA RW, DE CASTRO RO, PIMENTEL JC, GUZMAN F, PATARROYO ME, VARGAS MI, PRATES AA, MENDES MA. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Vet Immunol Immunopathol.** v.88, n.3-4,p.163-72, 2002.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. *Rev. Patol. Trop.*, v.23, n.2, p.145-146, 1994.

PERTMER TM, ROBERTS TR, HAYNES JR Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. **Virology**, v.70, n. 9, p. 6119-25, 1996.

PICKER LJ, MARTIN RJ, TRUMBLE A, NEWMAN LS, COLLINS PA, BERGSTRESSER PR, LEUNG DY. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. **Eur J Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 1269-77, 1994.

PIMENTEL J.C. A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) em animais estabulados e a campo. Dissertação (Mestrado). Viçosa; UFV, 77p., 2002.

POLLOCK JM, MCNAIR J, WELSH MD, GIRVIN RM, KENNEDY HE, MACKIE DP, NEILL SD. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 81, n. 1-2, p. 103-72, 2001.

POLLOCK JM, POLLOCK DA, CAMPBELL DG, GIRVIN RM, CROCKARD AD, NEILL SD, MACKIE DP Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Immunol.** V. 87, n. 2, p. 236-41, 1996

PORTELA, R. W. D. Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação** (mestrado). Viçosa: UFV, 87p., 2000.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1992. 274p.

RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.86, n.24, p.9657-9661, 1989.

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

RHODES SG, BUDDLE BM, HEWINSON RG, VORDERMEIER HM. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. **Immunol.**, v. 99, n. 2, p.195-202, 2000.

RODRIGUEZ M, MASSARD CL, DA FONSECA AH, RAMOS NF, MACHADO H, LABARTA V, DE LA FUENTE J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine.**, V. 13, n. 18, p. 1804-8, 1995

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, v.18, n.6, p.263-266, 1997.

ROTHKOTTER HJ, PABST R, BAILEY M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 72, n. 1-2, p. 57-65, 1999.

SAKAMOTO T, CABRERA PA. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. **Acta Trop.** V. 85, n. 2, p. 271-9, 2003.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACHAY, C.R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunology Today**, v.19, n.12, p.568-574, 1998.

SECORD EA, RIZZO LV, BARROSO EW, UMETSU DT, THORBECKE GJ, DEKRUYFF. Reconstitution of germinal center formation in nude mice with Th1 and Th2 clones. **Cell. Immunol.** V. 174, n. 2, p. 173-9, 1996.

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

SMITH RA, KREEGER JM, ALVAREZ AJ, GOIN JC, DAVIS WC, WHIPPLE DL, ESTES DM. Role of CD8+ and WC-1+ gamma/delta T cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bo mouse. **Leukoc Biol.**, v. 65, n. 1, p. 28-34, 1999.

SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. The development of TickGard - a commercial vaccine against the cattle tick *Boophilus microplus*. Indooroopilly: **Biotec Australia**-CSIRO, 17 p., 1995.

SOLTYS J, QUINN MT. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. **Infect Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6293-302, 1999.

SONENSHINE, D. E. Biology of ticks v. 2. New York: Oxford University Press, ., 447p., 1991.

SPRENT, J. Immunological memory. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p.371-379, 1997.

STOOLMAN LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. **Cell.** V. 56, n. 6, p. 907-10, 1989.

SWAIN SL, HU H, HUSTON G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. **Science.** 1999 Nov 12;286(5443):1381-3

TARLINTON DM, SMITH KG. Apoptosis and the B cell response to antigen. **Int Rev Immunol.**; v. 15, n. 1-2, p. 53-71, 1997.

TELLAM, R. L. SMITH, D., KEMP, D. H. Vaccination against ticks. In: YONG, W. K. Animal parasite control using biotechnology. Boca Raton: CRC Press, p. 303-331, 1992.

THORBECKE, G.J., AMIN, A.R., TSIAGBE, V.K. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. **FASEB J.**, v.8, p.832-840, 1994.

TOELLNER, K., S. LUTHER, D.M.-Y. SZE, R.K.-W. CHOY, D.R. TAYLOR, I.C.M. MACLENNAN, AND H. ACHA-ORBEA. Th1andTh2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. **J. Exp. Med.** 187:1193–1201. 1998.

TUO W, BAZER FW, DAVIS WC, ZHU D, BROWN WC. Differential effects of type I IFNs on the growth of WC1- CD8+ gamma delta T cells and WC1+ CD8-gamma delta T cells in vitro. **J Immunol.**, v. 162, n. 1, p. 245-53, 1999.

TURNBULL, L. F., SMITH, D., SHARP, P. J. Expression and secretion in *Aspergillus nidans* and *A. niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2847-2852, 1990.

VALLE, MR, MONTERO C, MACHADO H, JOGLAR M. The evaluation of yeast derivatives as adjuvant of the immune response to the Bm86 antigen in cattle: Correction. **BMC Biotechnol.**, v. 1, n. 1, p. 3. 2001.

VANDEN BUSH TJ, ROSENBUSCH RF. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 94, n. 1-2, p. 23-33, 2003

WALKER LS, GULBRANSON-JUDGE A, FLYNN S, BROCKER T, LANE PJ. Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40. **Immunol Today.**, v. 21, n. 7, 333-7, 2000 .

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

WIKEL ,S.K.Host immunity to ticks. **Annu. Ver. Entomol. Exper. Parasitol.** v. 41, p.1-22, 1996a.

WIKEL ,S.K.Tick modulation of host cytokines. **Exper. Parasitol.** v. 84, n. 0018, p.301-309, 1996b.

WIKEL S.K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission, **Int. J. for Parasitol**, V 29, n. 6, P 851-859. 1999,

WIKEL, S.K and BERGMAN, D. Tick-Host Immunology: Significant Advances and Challenging Opportunities, **Parasitology Today**, V13, n.10,p 383-388. 1997

WIKEL, S.K. Immunology of the ticks host interface. In The immunology of host ectoparasitic arthropod relationships. (Wikel SK, ed.) Wallingford: CAB International p 204-231 1996c

WIKEL, S.K. RAMACHANDRA, R.N. and BERGMAN, D.K. In The immunology of host ectoparasitic arthropod relationships.(Wikel SK, ed.) Wallingford: CAB International p 107-130 1996d

WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. **Int. J. Parasitol.**, v. 17, n. 2, p. 671-677, 1987.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Vet. Parasitol.**, v. 71, p. 209-22, 1997.

WILLADSEN, P., and JONGEJAN F. Immunology of the tick-Host Interaction and the control of ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitol. Today**. v. 15, n. 7, p. 258-262, 1999.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J. Immunol.**, v.143, n.4, p.1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P., WILLIAMS, P. G., ROBERTS, J. A., KERR, J. D. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p.89-95, 1978.

WONG JY, OPDEBEECK JP. Larval membrane antigens protect Hereford cattle against infestation with *Boophilus microplus*. **Parasite Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 75-83, 1990.

Woodland DL, Dutton RW. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. **Curr Opin Immunol**. Jun;15(3):336-42. 2003

WYATT CR, MADRUGA C, CLUFF C, PARISH S, HAMILTON MJ, GOFF W, DAVIS WC. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 40, n. 3, p. 187-99, 1994.

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.