

JAVIER ANTONIO BENAVIDES MONTAÑO

**AVALIAÇÃO DOS PEPTIDEOS SINTETICOS SBbo23290 e SBm7462 NA
FORMA MONOVALENTE E POLIVALENTE EM BOVINOS DESAFIADOS
COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) E *Babesia bovis*
(BABES, 1888; STARCOVICI, 1888). RESPOSTA HUMORAL, PARÂMETROS
CLÍNICOS E BIOLÓGICOS.**

Dissertação 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
2006

JAVIER ANTONIO BENAVIDES MONTAÑO

**AVALIAÇÃO DOS PEPTIDEOS SINTETICOS SBbo23290 e SBm7462 NA
FORMA MONOVALENTE E POLIVALENTE EM BOVINOS DESAFIADOS
COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) E *Babesia bovis*
(BABES, 1888; STARCOVICI, 1888). RESPOSTA HUMORAL, PARÂMETROS
CLÍNICOS E BIOLÓGICOS.**

Dissertação 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: 14 de dezembro de 2006.

Prof^ª. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Prof. Jackson Victor de Araújo
(Co-orientador)

Prof^ª. Maria Aparecida S. Moreira

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

*"Já li até o inimaginável,
apaixonado por essa resposta inicial.
Já acertei em muito,
mas também tenho duvidado ao caminhar,
cansei-me da retórica e do trivial,
viajei, e agora estou construindo
minha própria verdade".*

"O sistema imunológico não pode determinar-se, qualquer coisa pode acontecer, é imprevisível como o comportamento do homem frente ao desejo de viver, uma constante memória de fatos que determinam o crescimento, futuro preparatório à morte, principio da vida."
Antove

DEDICATORIA

A Deus padre todo poderoso.

Dedico e “doy gracias” a toda a família Montaña Benavides, a meus pais, Sixto Antonio Benavides Narvaes e Elizabeth Montaña Vivas, meus irmãos Aura Tereza[†], Gerardo Alejandro, Sixto Alberto, Yalud Elizabeth, Fernando Adolfo, por seu infinito acompanhamento, sacrifício, apoio, amor incondicional e grandes conselhos cheios de sabedoria.

Dedico este esforço e agradeço a Rubia Aparecida de Araújo por sua grande apoio e amor durante todos estes tempos. !Deus abençoe a você e toda sua família por todo o que você fez sempre!.

Dedico este trabalho ao Valley de Sibundoy no Putumayo, lugar onde nasci e forme com ecos e alvoradas jubilosas cruzando o Valle de Sibundoy. A minha linda Colômbia, terra Santa cheia de esperança ante as dificuldades.

Aos meus grandes amigos e Mestres Carlos Pólo Galindez quem me estimulo na docência e desde sua forma de ser impulsionaron sempre a continuar a frente. A meu querido professor e amigo Carlos Eduardo Giraldo, a quem estimo fortemente e de quem aprendi a olhar o mundo de outra maneira, quem observou a minha trajetoria, e me permitiu fazer meus primeros passos na investigação e docência. A Julio Ernesto Vargas e Francisco Javier Pedraza os quais colocaram em mi grandes obstáculos para pensar, e a William Narvaez pela sua grande ajuda e motivação para empreender estes caminhos.

Aos meus colegas e amigos Bernardo Rivera, Claudia Marcela, Luis Fernando Uribe, Gines Fernando Ramirez, Jorge Uriel Carmona, Jose Henry Osório, Luis Fernando Silva, Jorge Sanchez, Carlos Arturo Sanchez, Alberto Soto, Gloria Inês, pelos grandes tempos compartilhados.

Aos meus professores de infância e juventude, Martica Estupiñan, Consuelo Lopez, Eduardo Melo, Javier Cuayal, Fenibal Zuluaga e Eduardo Revelo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, por conceder-me a grande oportunidade e aceitarme sob sua orientação, delineando a minha vida com grandes marcas e novos objetivos. À professora Marlene Isabel Vargas Vilória pelo seu amor e sua alegria. A vocês, obrigado pela paciência, acompanhamento e amizade durante este tempo. A meus professores Paula Dias Bevilacqua, Jackson Victor de Araújo e ao professor José Dantas Ribeiro Filho pela ajuda conferida.

Quero fazer um agradecimento especial a Márcio Mendes, pela paciência, dedicação, incentivo, profissionalismo e companheirismo e aos autores dos trabalhos prévios a este, os quais aportarem ao presente, Ricardo Portella, Claudia Zuleida Gonzáles Lombana, Jorge Couto, Joely Ferreira Figueiredo Bittar, Policarpo Sales, Sidimar Sossai, Larissa F Bedor, Carolina Murta, contribuindo com seu trabalho de laboratório e teses e dissertações de teses, possibilitando este grande passo em benefício da Parasitologia e Imunologia Veterinária.

Aos meus estagiários Vinicius Eustaquio B, Marilia Nogueira da Gama e Hugo G Ribeiro Rocha pelo grande acompanhamento. A eles desejo o melhor em seu futuro profissional. Aos colegas e amigos de laboratório – Ana Paula Peckonick, Carlos Henrique, Diogo Coelho, Sidimar Sossai, Carla Medeiros, Bruna Alves Devéns, Marina Quadros, Vitor C Ribeiro, Breno Salgado, Sandra Yulieth Marin, Fabrício Valente, Flávia Girão. Aos funcionários do Departamento de Veterinária, Lucinda e Luiz Márcio pelo apoio conferido e um agradecimento especial a Cauzinho e Edson Vander Nascibem pela grande colaboração, ajuda e amizade.

Um agradecimento ao projeto Universidades Renovadas, Renovação Carismática Católica de Viçosa que me acolheram em oração durante todo este tempo. Deus abençõe a todos vocês. Não posso esquecer a Rita e Carlitos do trailer !Muito obrigado!. A Marcelo de Paula Vieira, Pablo Mendonza e Ricardo Fávero, do Marques do Pombal. Vocês são grandes professores, pastores e profetas. A toda a comunidade de Colombianos em Viçosa, em especial a Carolina Jaramillo e ao “paisita” Juan Felipe.

Grandes abraços e agradecimentos a Ana Paula Ferreira e Adilson, que me acolheram em seu lar. Deus abençõe a todos vocês, Vera, Roberto, Thiago, Thomas, Lucas e a Maria Helena† os quais levo em meu coração.

Finalmente eu quero agradecer à UFV, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fundamental para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

JAVIER ANTONIO BENAVIDES MONTAÑO, filho de Sixto Antonio Benavides Narvaez e Elizabeth Montaña Vivas, nasceu em 13 de março de 1976, no município de Sibundoy - Putumayo - Colômbia. Graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade de Caldas, Caldas - Colômbia, em outubro de 2000. Neste mesmo ano, foi contratado pela mesma Universidade como professor auxiliar na cátedra de Parasitologia Clínica Veterinária trabalhando até dezembro do 2004, tempo durante o qual desenvolveu seu Mestrado em Educação e Docência. Este mestrado iniciou-se em janeiro do 2003 e finalizou-se em janeiro de 2005. Neste mesmo ano ingressou no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, incorporando-se na linha de pesquisa em Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores sob a orientação do Prof. Joaquim Hernan Patarroyo Salcedo e a Prof. Marlene Vargas Vilorio.

SUMÁRIO

	Pág
<i>RESUMO</i>	x
<i>ABSTRACT</i>	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPITULO I.....	2
<i>RESUMO</i>	3
<i>ABSTRACT</i>	4
2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Anemia por <i>Babesia bovis</i>	5
2.2. Resposta febril - <i>Babesia bovis</i> - pirogênios endógenos e exógenos	6
2.3. Mecanismos de Imunidade nos bovinos contra a <i>B. bovis</i>	8
2.4. Estratégias do controle - vacinas para babesia	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Preparação dos imunógenos	12
3.3. Esquema de imunização nos bovinos	12
3.4. Desafio.....	13
3.5. Avaliação clínica dos animais	14
3.6. Coleta de sangue dos animais para obtenção de soro.....	14
3.7. ELISA.....	15
3.7.1. Mensuração de IgGTotal com afinidade pelo peptídeo SBbo23290.....	15
3.7.2. Mensuração da IgG1 e IgG2 com afinidade pelo peptídeo SBbo23290	15
3.8. Análise Estatística	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

SUMÁRIO

	Pág
CAPITULO II.....	36
<i>RESUMO</i>	37
<i>ABSTRACT</i>	38
2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Animais.....	43
3.2. Preparação dos imunógenos	43
3.3. Esquema de imunização nos bovinos	43
3.4. Desafio.....	44
3.5 Avaliação dos parâmetros biológicos dos carrapatos.....	45
3.5.1. Estimativa do número de carrapatos.....	45
3.5.2. Ovoposição	45
3.5.3. Fórmulas para avaliação dos parâmetros biológicos relacionados com os carrapatos (DE LA FUENTE, 1995)	46
3.6. ELISA.....	46
3.6.1 Mensuração de IgGTotal com alta afinidade pelo peptídeo SBm7462	46
3.6.2. Mensuração da resposta imune humoral IgG1 e IgG2, com alta afinidade pelo peptídeo SBm7462	47
3.7. Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Desenho do experimento. Grupos, replicações, classe de imunógeno, doses e via de aplicação.

Tabela 2. Indicadores de proteção em bovinos imunizados com peptídeos sintéticos na forma monovalente e polivalente.

CAPITULO II

Tabela 1. Desenho do experimento. Tratamentos, replicações, classe de imunogeno empregado, doses e via de aplicação.

Tabela 2. Parâmetros biológicos nas populações de carrapatos *R. (B.) microplus*. Grupos I,II, IV em relação ao Grupo III.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Médias e desvio padrão ($SD\pm$) da temperatura retal. Figura 1-A. após primeira inoculação; Figura 1-B Segunda inoculação; Figura 1-C Terceira inoculação.

Figura. 2. Porcentagem (%) de redução do volumem globular após desafio.

Figura. 3 Cinética da produção de IgGs, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290.

Figura 4-A. Cinética da produção de IgG1; Figura 4-B. Cinética da produção de IgG2. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290.

Figura. 5. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgG Total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290. Figura 5-A. Tratamento I; Figura 5-B Grupo II.

CAPITULO II

Figura 1. Efeito das vacinas sobre as populações de carrapatos.

Figura 2. Cinética da produção de IgGs, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462.

Figura 3. Cinética da produção de IgG1, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462.

Figura 4. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgG Total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados com Grupo I.

Figura 5. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgG Total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados com Grupo II.

Figura 6. Processo de competição intraclonal segum o modelo de CREUSOT *et al.* (2003).

RESUMO

JAVIER, ANTONIO BENAVIDES MONTAÑO, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2006. **Avaliação dos peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 na forma monovalente e polivalente em bovinos desafiados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) e *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888).** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo

Avaliou-se a resposta imunológica conferida pelos peptídeos SBbo23290 e SBm7462 para o controle de *Babesia bovis* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ao serem aplicados simultaneamente na apresentação individual (Group I) e em associação (Group II). Foram realizadas três aplicações em cada grupo, via subcutânea, com intervalos de 30 dias. O desafio foi feito 30º e 34º dias após a 3ª inoculação, colocando-se 4000 larvas de *R. (B.) microplus*, cepa livre de hemoparasitas, e inoculando-se a cepa de *B. bovis* UFV1 – 9ª passagem numa concentração de 1×10^6 parasitas/mL, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, os animais do Grupo II, apresentaram uma melhor resposta clínica frente ao desafio, acompanhado de altos níveis de IgG total específicos para o peptídeo SBbo23290, a partir da 1ª semana após a inoculação, com títulos de $1,06 \pm 0,2486$. Os títulos de IgG total específicos para SBm7462 estiveram presentes a partir da 8ª semana com níveis de $1,75 \pm 0,1849$ e $1,13 \pm 0,2819$ para Grupo I e II, respectivamente. Ambos os tratamentos apresentaram maiores níveis de isotipos IgG1 sobre IgG2 específicos para SBbo23290. O Grupo I, apresentou títulos de IgG total e IgG1 específicos para SBm7462 e baixa eficácia (EF) no controle dos carrapatos, diferente do obtido no Grupo II, onde encontrou-se altos títulos de IgG total, níveis baixos do IgG1 e uma EF de 46,80 %. Sugere-se que estes resultados foram determinados por competição intraclonal em populações após a apresentação por APCs (DC ou WC1.1⁺) a CD4⁺ e linfócitos B nos centros germinais, com maior afinidade por clones específicos para SBbo23290 sobre SBm7462, talvez determinado por solubilidade antigênica.

ABSTRACT

JAVIER, ANTONIO BENAVIDES MONTAÑO, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Evaluation of synthetic peptides SBbo23290 and SBm7462 at monovalent and polyvalent presentations in challenged cattle with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) and *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888).** Advisor: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-advisors: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

It was evaluated the immunology response given by the SBbo23290 and SBm7462 synthetic peptides to the control of *Babesia bovis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, inoculated by subcutaneous route, individually and simultaneously (Group I) and in a cocktail of both peptides (Group II). Each inoculation was done with intervals of 30 days. In the 30th and 34th days after the 3th inoculation, it was applied in each animal, 4000 larvae of *R. (B.) microplus*, free of blood parasites and also, it was inoculated a sample of *Babesia bovis* UFV1 – 9th passage with a concentration of 1×10^6 babesias/mL, respectively. According to the results, the animals inoculated with the Group II obtained greater clinic response after challenging with both parasites. Besides, these animals showed high levels of total IgG specific to the SBbo23290, beginning one week after 1st inoculation, with titles of $1,06 \pm 0,2486$. The titles with high affinity of total IgG to SBm7462 was presented from the 8th week, with levels of $1,75 \pm 0,1849$ and $1,13 \pm 0,2819$ to Groups I and II, respectively. Both Group showed high levels of IgG1 over IgG2 isotopes with high affinity to SBbo23290. The Group I showed titles of total IgG and IgG1 with high affinity to SBm7462 and low efficiency (EF) to control the ticks, different of the obtained in the Group II, where it was found high titles of total IgG, low levels of IgG1 and EF of 46,80 %. These results suggest that, intraclonal competition was present after presentation by APCs (DC or WC1.1⁺) to CD4⁺ and lymphocytes B in the germinal centers, with major affinity by specific clones to SBbo23290 over SBm7462. It is possible that these changes were determined by antigen solubility.

INTRODUÇÃO GERAL

Rhipicephalus (Boophilus) microplus e *Babesia bovis* são parasitas que causam um alto impacto econômico na produção bovina (WRIGHT *et al.*, 1989; SOLORIO *et al.*, 1999; PATARROYO *et al.*, 2002). A presença destes agentes no organismo, desencadeia respostas imunológicas com alto gasto compensatório em detrimento da produtividade do rebanho, devido à anemia, anorexia e perda de peso (JONSSON, 2006).

Na atualidade, terapias com produtos químicos provocam perdas na qualidade do leite e da carne, grande impacto ambiental e resistência dos patógenos devido à pressão de seleção, porém vacinas sintéticas podem contribuir na solução desta problemática.

O peptídeo sintético SBbo23290, desenhado a partir das proteínas de roptria de *B. bovis*, foi obtido da união dos peptídeos 5084 e 5081 após testes realizados por FREITAS (2001), BEDOR JARDIM (2005), (FIGUEIREDO, 2002), mostrando eficiência na proteção de animais vacinados.

Para o controle de *R. (B.) microplus*, as principais vacinas são feitas de antígenos do carrapato que não se apresentam ao hospedeiro durante o período da alimentação (SOSSAI *et al.*, 2005). O peptídeo SBm7462 foi desenvolvido a partir da proteína Bm86 por meio de predição computacional de sítios imunogênicos, (PATARROYO *et al.*, 2002).

Esses imunógenos evitam a utilização desnecessária de produtos químicos, têm boa eficiência, alta segurança, diminui a transmissão de patógenos, protegem o meio ambiente e os animais, chegando produtos sem resíduos químicos ao consumidor final (FREITAS, 2001; PATARROYO *et al.*, 2002).

Avaliou-se a resposta imunológica conferida pelos peptídeos SBbo23290 e SBm7462 para o controle de *Babesia bovis* e *R (B) microplus*, ao serem aplicados na forma monovalente (Grupo I) e polivalente (Grupo II).

O presente trabalho contribui para o entendimento do complexo sistema imunológico dos bovinos e para desenvolvimento de vacinas bivalentes de alto valor prático, diminuindo tempo, custo do tratamento, conferindo adequada proteção clínica gerando uma resposta protetora simultânea contra *Babesia bovis* e *R(B) microplus*.

CAPITULO I

**AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SBbo23290 E SBm7462 AO SEREM APLICADOS
EM BOVINOS NAS FORMAS MONOVALENTE E POLIVALENTE
DESAFIADOS COM *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (CANESTRINI, 1887) E
Babesia bovis (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888)**

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

Resumo

O peptídeo sintéticos SBbo23290 e uma importante possibilidade para o controle de *Babesia bovis*. No presente trabalho apresenta-se a avaliação humoral e clínica após aplicação de este peptídeo junto com SBm7462 na apresentação individual (Grupo I) e em doses associadas (Grupo II). Cada tratamento foi feito três vezes, com intervalos de 30 dias via subcutânea. O desafio foi feito 30 e 34 dias após a terceira inoculação, colocando-se 4000 larvas de *R. (B.) microplus*, cepa livre de hemoparasitas, e inoculando a cepa de *B. bovis* UFV1 – 9ª passagem numa concentração de 1×10^6 babesias/mL, respectivamente. Animais inoculados com o Grupo II apresentaram uma melhor resposta clínica frente ao desafio com *B. bovis* e *R. (B.) microplus*, acompanhado de altos níveis de IgG total específicos para o peptídeo SBbo23290 a partir da 1ª semana após inoculação, com títulos de $1,06 \pm 0,2486$. Os títulos de IgG total específicos para SBm7462 estiverem presentes a partir da 8ª semana com níveis de $1,75 \pm 0,1849$ para o Grupo I e $1,13 \pm 0,2819$ para Grupo II. A resposta humoral para ambos tratamentos esteve associada com maiores níveis de isotipos IgG1 sobre IgG2 específicos para SBbo23290.

Palavras – chave: *R(B) microplus*, *Babesia bovis*; peptídeos sintéticos

Abstract

The synthetic peptides SBbo23290 is an important possibility to the control of *Babesia bovis*. In the present work, it was showed the humoral and clinical evaluation of this peptide joined SBm7462 after their simultaneous and individual application (Group I) and mixed application (Group II). Each treatment was applied three times by subcutaneous route and with interval of 30 days. The challenge was maden 30 and 34 days after the third inoculation with 4000 larvaes of *R. (B.) microplus* put in each animal, samples free of blood parasites, and with *B. bovis* UFV1 – 9th passage in concentration of 1×10^6 babesias/mL Animals inoculated with the Group II showed greater clinical response after challenged with *B. bovis* e *R. (B.) microplus*, with high levels of IgG with affinity by SBbo23290, beginning from 1th week after inoculation, with titles of $1,06 \pm 0,2486$. The titles of total IgG to SBm7462 showed increasing from 8th week, with levels of $1,75 \pm 0,1849$ to Group I and $1,13 \pm 0,2819$ to Group II. The humoral response to both Groups was associated with high levels of isotopes IgG1 over IgG2 specific to SBbo23290.

Key-Words: *Riphicephalus (Boophilus) microplus*; *Babesia bovis*; *synthetic peptides*

2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Aproximadamente 400 milhões de cabeças de gado, nas regiões tropical e subtropical do mundo, estão sob o risco de infecção com *Babesia bovis* e *B. bigemina*, (WRIGHT *et al.*, 1989) e na América Latina, a babesiose causa prejuízos de mais de US\$ 1.365 milhões por ano (MONTEALEGRE, 1992).

No passado, diferentes métodos profiláticos com vacinas vivas e mortas têm sido empregados para o controle destes parasitos. Na atualidade, o uso de peptídeos sintéticos adquire vital interesse, principalmente considerando que estes evitam a utilização desnecessária de produtos químicos, tem uma boa eficiência, alta segurança, protegem o meio ambiente e os animais, além de que carne e leite chegam ao consumidor final sem resíduos químicos (FREITAS, 2001; PATARROYO *et al.*, 2002).

O peptídeo sintético SBbo23290 desenhado a partir das proteínas de roptria de *B. bovis* foi obtido da união dos peptídeos 5084 e 5081 (FREITAS, 2001). Mostrou eficiência protetora nos animais vacinados após desafio com amostra virulenta de *B. bovis*. (FIGUEIREDO, 2002 e BEDÔR JARDIM, 2005).

Avaliou-se a resposta humoral conferida pelo peptídeo sintético SBbo23290 para o controle de *Babesia bovis* ao ser aplicado junto com o peptídeo SBm7462 na forma monovalente e polivalente.

2.1. Anemia por *Babesia bovis*.

O volume globular (VG) é definido como a concentração de hemácies/mL de sangue, sendo expresso na forma de porcentagem, o qual é dependente da idade, tipo do animal e condições de manejo. Normalmente, um animal é considerado anêmico quando ocorrem perdas maiores que 40 %. A redução do VG deve ser expresso como a média máxima comparada com o valor anterior à pré-infecção. (JONSSON, 2006)

A anemia por *Babesia* ocorre rapidamente e é causada pela destruição intravascular de eritrócitos e pela liberação de merozoítos após a multiplicação intra-eritrocitária das babesias (WRIGTH, 1989).

O baço e o fígado aceleram a atividade fagocitária do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) na babesiose e eleva a taxa de retirada de eritrócitos normais contribuindo para a anemia (MAHONEY, 1977).

Estudos realizados por PATARROYO (1990) desafiando animais vacinados com exoantígenos de *B. bovis*, relatam redução do VG, com duração de 3 dias e morte dos animais do grupo controle e saponina, sem mortalidade no grupo vacinal.

BEDOR JARDIM (2005), imunizando animais com o peptídeo sintético SBbo23290 encontrou anemia 4 dias após desafio em todos os tratamentos, porém com recuperação rápida dos animais vacinados. Apresentou-se um óbito no grupo saponina, no 11º dia PD, sem presença do parasito e com reduções superiores a 60% nos parâmetros hematológicos.

Em outro trabalho, vacinando animais com peptídeo sintético de RAP-1, FIGUEIREDO (2002) encontrou uma redução do VG nos grupos peptídeo, saponina e controle no 12º dia após desafio, com uma rápida recuperação no grupo vacinal. Todos os animais morreram no grupo controle e saponina e apenas um animal no grupo peptídeo.

No experimento realizado por GOFF (2003), onde bezerros de 16 semanas de idade foram submetidos à infestação com carrapatos *R. (B.) microplus* infectados com amostra virulenta *B. bovis* (T2-Bo) encontrou reduções de 46, 54 e 62 % do VG, embora com curta duração.

A anemia causada por *B. bovis* é caracterizada pela presença de pouco número de parasitas na sangue periférico, dificultando a avaliação da doença. (SHKAP *et al.*, 2005). Não obstante, no trabalho de FIGUEIREDO (2002) foi evidente a presença do parasito nos grupos saponina e controle a partir do 10º dia pós-desafio. No grupo peptídeo a parasitemia aconteceu desde o 2º dia até o 18º dia pós-desafio.

PATARROYO (1990) encontrou uma alta parasitemia no grupo controle com duração de 9 dias e nos animais vacinados as parasitemias foram de menor intensidade com duração entre 5 e 7 dias.

BEDOR JARDIM (2005) detectou parasitemia em todos os animais dos grupos controle e saponina a partir do 8º dia PD, com 10 dias de duração. No tratamento com o peptídeo não observou a presença do agente.

2.2. Resposta febril - *Babesia bovis* - pirogênios endógenos e exógenos.

A febre é um aumento fisiológico da temperatura corpórea não dependente da temperatura ambiental, a qual acontece como resposta á agentes patógenos, degradação

dos tecidos, produto do metabolismo de bactérias, parasitas ou proteínas estranhas ao organismo (KOLB, 1980; IUPS GLOSSARY, 2002; BLATTEIS, 2006). O hospedeiro responde à invasão de agentes patógenos mediante a chamada “resposta de fase aguda” que envolve a ativação de fatores imunológicos e endócrinos (BICEGO *et al.*, 2006).

À entrada de um microorganismo se apresenta uma reação local “inflamação”, entendida como um processo homeostático que se torna patológico só quando ocorre um defeito na imunorregulação ou como processo crônico. Como resultado são liberadas substâncias vasoativas e mediadores químicos (BLATTEIS, 2006).

Fagócitos mononucleares ativados por uma infecção induzem liberação de citocinas pirógenas, especificamente TNF, IL-1, IL-6 as quais são transportadas à área preóptica anterior do hipotálamo. No cérebro lugar onde se encontra o centro termo regulador (ELMQUIST *et al.*, 1996; BOULANT, 2000) é onde atua a prostaglandina PGE2 que é considerada o mediador final da febre (BLATTEIS, 2006).

Há duas categorias gerais de pirogênios com base em suas origens. Os pirogênios exógenos e os endógenos. Os leucócitos liberam pirogênios endógenos em resposta a pirogênios circulantes produzidos pelos parasitos. Assim, parece que o pirogênio exógeno causa aumento na temperatura corporal indiretamente pela estimulação da liberação dos pirogênios endógenos que agem diretamente sobre o centro hipotalâmico (RANDALL, 2000).

Até agora, diversos pirogênios endógenos foram identificados, dos quais a Interleucina-1 (IL-1) é o mais potente mediador de febre (SWENSON, 1996; RANDALL, 2000; ROTH, 2006).

Dentre os benefícios outorgados à febre encontram-se redução da proliferação bacteriana, em associação com a privação de ferro (ROTH, 2006). A febre também pode atuar como um adjuvante frente a uma gama de funções imunológicas com a possibilidade de modificar a expressão de citocinas (ROTH, 2006; TABAREAN, 2006).

A IL-1 também atua sobre o centro da fome e induz perda de apetite. Esta citocina junto com TNF α e especialmente IL-6 são importantes na imunidade inata, uma vez que medeiam o aumento e sínteses de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina e a hemopexina. (TIZARD, 2002; PETERSEN, 2004)..

A haptoglobina e a hemopexina fixam moléculas de ferro e deste jeito diminui a invasão e proliferação bacteriana. Paralelamente, reduz a disponibilidade de ferro para a produção de eritrócitos, razão pela qual nas infecções graves e crônicas aparece anemia (BREMNER, 1964; TIZARD, 2002). O incremento dos níveis de hemoglobina no soro esta

determinado pela concentração de haptoglobina livre, como ocorre em bovinos durante uma crise hemolítica aguda por *Babesia* (BREMNER,1964).

No caso de *Babesia* a febre acontece depois do rompimento das hemácias devido à multiplicação do parasito no interior das mesmas. A febre também pode dever-se à resposta inflamatória gerada em função da anóxia tecidual resultante da obstrução dos vasos o que acarreta necrose e liberação local de fatores pró-inflamatorios que induzem à quimiotaxia e diapedese de leucócitos (LOSOS, 1986; WRIGHT *et al.*, 1989), relatando-se aumento de temperatura de 41°C – 41,5°C com incremento da parasitemia (MAHONEY,1977).

PATARROYO (1990), imunizando bezerros com exoantigenos de sobrenadantes de cultura de uma amostra atenuada de *Babesia bovis* e desafiados com amostras heterólogas encontrou, em média, períodos febris com duração de 8,6 dias para o grupo controle, 6,5 dias para o grupo saponina e 1 dia para o grupo vacinado.

FIGUEIREDO (2002), quando desafiou animais com sangue contendo 5×10^8 hemácias parasitadas com *B. bovis* (amostra virulenta Bbo UFV1, 7ª passagem) e que tinham sido imunizados com o peptídeo sintético SBbo23290, encontrou aumentos de temperatura a partir do 8ª dia até o 15ª dia nos grupos controle (39,5°C) e saponina (38,5°C).

Já BEDÔR JARDIM (2005) quando avaliou o peptídeo SBbo23290 e desafiou os animais com sangue contendo $1,2 \times 10^6$ hemácias infectadas com a mesma amostra virulenta de *Babesia bovis*, observou uma duração média da febre de sete 7 dias no grupo peptídeo e de 11 dias para os grupos controle e saponina. As médias das temperaturas máximas foram de 41° no grupo controle, 40,5°C no grupo saponina e 40,1°C no grupo peptídeo.

2.3. Mecanismos de Imunidade nos bovinos contra a *B. bovis*

Bezerros jovens são mais resistentes frente à infecção aguda com *B bovis* (imunidade inata) que animais velhos (GOFF *et al.*, 2003). Uma explicação à resistência de animais jovens é a abundancia de células T $\gamma\delta$, as quais correspondem a 70% das células circulantes em ruminantes. Por isso, bezerros com menos de 6 meses de idade, infectados com *Babesia bovis*, mostram uma melhor resposta imune no controle da parasitemia, do que os animais adultos (HEIN e MACKAY, 1991).

Bovinos que sobrevivem à infecção com *B. bovis* de forma natural ou depois do tratamento permanecem infectados e resistentes à doença clínica, desenvolvendo uma imunidade concomitante. Porém, a resposta imune adaptativa depende da apresentação dos antígenos parasitários por células apresentadoras de antígenos a linfócitos CD4⁺ (BROWN *et al.*, 2006).

O controle da infecção é mediado pela destruição de eritrócitos infectados por ativação de macrófagos esplênicos e por neutralização de anticorpos diretamente contra merozoítos extracelulares e antígenos de superfície definidos como VESA 1 sobre eritrócitos infectados (ALLRED, 2004; BROWN *et al.*, 2006).

Em animais persistentemente infectados com controle da parasitemia ou em animais imunizados, as células T CD4⁺ desempenham um papel importante na resposta imune adaptativa por meio da produção de IFN- γ , citocina esta que regula a síntese de anticorpos IgG2 com capacidade opsonizante (ESTES E BROWN, 2002; GOFF, 2006).

Em bovinos, tanto IgG1 quanto IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação à IgG1 (MCGUIRE *et al.*, 1979). A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela IL-4 enquanto que o IFN- γ estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995; ESTES E BROWN, 2002; GOFF, 2006).

O estudo da cinética de produção de IgG1 e IgG2 é uma valiosa ferramenta para avaliar a resposta imune protetora contra *B. bovis*, uma vez que estas imunoglobulinas são importantes no controle da infecção devido a sua capacidade opsonizante, além de que proteger o animal por longos períodos (BROWN *et al.*, 1999).

2.4. Estratégias do controle - vacinas para babesia

Dentre as estratégias para o controle de *B. bovis*, encontram-se os métodos profiláticos com vacinas vivas e mortas, proteínas imunogênicas de exoantígenos de cultura celular, vacinas anti-idiotípicas, recombinantes, quiméricas, vacinas de ácidos nucleicos, vivas recombinantes, genômicas, proteômicas e sintéticas.

As primeiras vacinas para o controle de *Babesia* foram desenvolvidas mediante a redução de sua virulência por passagens em animais esplenectomizados de sangue infectado ou pela atenuação por irradiação *in vitro* dos parasitos.

Entretanto, a disseminação de patógenos, alto custo de produção em escala, dificuldade de estocagem, distribuição, modificação da virulência dos parasitos

sobreviventes à irradiação e baixa imunidade protetora foram alguns dos problemas encontrados no período de desenvolvimento desse tipo de vacina (CALLOW E MELLORS, 1966; TAYLOR, 1989; IRVIN *et al.*,1979, WRIGHT *et al.*,1982; JORGENSEN *et al.*,1992).

Com a expressão antigênica de *Babesia* e a produção de anticorpos monoclonais permitiu-se a identificação de antígenos estruturais do parasita (MCELWAIN *et al.*,1991, DALRYMPLE, 1993a; PALMER E MCELWAIN, 1995).

Dentre as proteínas de *B. bovis* identificadas como antigênicas estão RAP-1, Antígeno-1, MAS-1 e MAS-2 (BROWN *et al.*,1991).

RAP-1 por ser altamente antigênica e possuir epítomos para células T CD4⁺ (STICH *et al.*,1999) foi considerada um bom imunógeno para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da *B. bovis*.

Proteínas associadas à rhoptrias são promissoras para o desenvolvimento de vacinas por sua importância na adesão e invasão do parasita na hemácia (BROWN *et al.*,1996a). COOPER *et al* (1991); FIGUEROA *et al* (1991); DOURY *et al* (1994) demonstraram em estudos *in vitro* que os anticorpos produzidos contra estas proteínas inibem a invasão eritrocitária pelo parasito.

O peptídeo sintético denominado SBbo23290 foi desenhado a partir da estrutura íntegra da proteína de *B bovis*. Ele foi obtido da união dos peptídeos 5084 e 5081, os quais induziram maiores estímulos sobre células T e B (PATARROYO, 1999).

Estudos realizados por JACKSON *et al* (2000) demonstram que para um peptídeo ser considerado um bom imunógeno é necessária a união de epítomos T e B reativos em sua estrutura. Contudo, o uso de seqüências curtas de peptídeos sintéticos no desenvolvimento de uma resposta imunológica, favorece o reconhecimento de estruturas antigênicas pelos linfócitos T (BERZOFSKY *et al.*,1987).

O peptídeo sintético SBbo23290 foi desenhado e sintetizado em parceria com o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Fundação Instituto de Imunologia de Colômbia (FIDIC) (PATARROYO *et al.*,1999), possuindo uma conformação distinta das apresentadas pelos peptídeos de origem, além de possuir um maior número de aminoácidos em sua estrutura.

Provavelmente, apresenta novos epítomos em sua estrutura confirmando-lhe uma alta antigenicidade.

Trabalhos desenvolvidos por FIGUEIREDO *et al.*, 2002 e BEDÔR JARDIM, 2005 com o peptídeo sintético SBbo23290 mostraram que se reduzia a taxa de mortalidade após desafio com a amostra patogênica dos animais imunizados. Os autores concluem que a eficácia da vacinação com este peptídeo estaria associada ao desenvolvimento precoce de uma resposta imune específica envolvendo células B e linfócitos T CD4 +.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 16 animais da raça Holandesa 7/8, negativos sorológica e parasitologicamente a hemoparasitas (*B. bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*) e mantidos em condições de isolamento no DVT/UFV a partir de 4 dias de nascidos evitando-se assim, o contato com artrópodes ou vetores. Eles foram alimentados com leite de substituição (Bioleite)[®] e a partir do 14 dia de idade até os 48 dias, além do leite de substituição, também recebiam feno, ensilagem e água *ad libitum*. Posteriormente, os animais foram alimentados com ração (17 % de proteína) e quantidade definida de volumoso.

3.2. Preparação dos imunógenos

A dose monovalente de SBbo23290 (Grupo I) era composta de 2 mg do peptídeo sintético SBbo23290, 1,5mg saponina e 2mL de água milli q, fazendo-se homogeneização em vórtex durante 5 minutos. Para a monovalente SBm7462 (Grupo I) também se utilizaram 2mg do peptídeo SBm7462, 1,5mg saponina e 2mL de água milli q. Como o peptídeo sintético SBm7462 apresenta uma característica de baixa solubilidade, antes de diluir foi realizado sonicação (Gerador ultrasônico Lab-Line[®] modelo 9100) a 20 watts durante cinco segundos.

Na preparação da Polivalente (Grupo II) adicionaram-se 2mg de SBm7462, 2 mg de SBbo23290 e 1,5mg de saponina em 4mL de água milli q, sendo homogeneizados em vórtex por 5 minutos. A sonicação do peptídeo sintético SBm7462 descrita anteriormente foi realizada antes da mistura com o SBbo23290.

Tanto os imunógenos monovalentes quanto os polivalentes foram preparados antes da inoculação e mantidos a temperatura ambiente.

3.3. Esquema de imunização nos bovinos

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais, cada um com quatro animais: Grupo I (monovalente), Grupo II (polivalente), Grupo III (controle) e Grupo IV (saponina). Os animais do Grupo I e do Grupo II receberam três doses a cada 30

dias por via subcutânea dos imunógenos monovalente e polivalente, respectivamente. No Grupo I, as monovalentes eram aplicadas na região cervical, direita e esquerda, para cada um dos peptídeos. Os animais do Grupo III receberam 2mL de água milli q, via subcutânea, por três vezes a cada 30 dias. Os animais do Grupo IV receberam 1,5mg Grupo IV¹ diluído em 2mL de água milli q., no mesmo esquema de três vezes, via subcutânea e a cada 30 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho do experimento. Grupos, replicações, classe de imunógeno, doses e via de aplicação.

Grupos	Animais	Imunógeno	Quantidade / animal	VA	
Grupo I	Monovalente	25, 52, 27, 24	SBm7462	2 mg	SC
			Saponina	1,5 mg	
			Água milli q	2 mL	
			SBbo23290	2 mg	
Grupo II	Polivalente	53, 42, 54, 21	Saponina	1,5 mg	SC
			Água milli q	2 mL	
			SBm7462	2 mg	
			SBbo23290	2 mg	
Grupo III	Controle	41, 28, 22, 46	Saponina	1,5 mg	SC
			Água milli q	5 mL	
Grupo IV	Grupo IV	45, 29, 20, 23	Água milli q	2 mL	SC

Via de aplicação (VA); Subcutânea (SC).

3.4. Desafio.

O desafio com carrapatos foi realizado 30 dias após a 3^a inoculação e com *B. bovis* no dia 35 após a 3^a inoculação. Para o desafio com carrapatos utilizaram-se larvas de *R. (B.) microplus* cepa livre de parasitas (UFRGS) de Porto Alegre–RG. As alíquotas eram constituídas por ± 2000 larvas, que foram mantidas em seringas de 5 ml em estufa BOD a 28° C e 80 % de umidade relativa.

Cada animal foi desafiado com um total de ± 4000 larvas/dia que foram colocadas, a cada 24 horas, nas regiões do peito e barbela, entre os membros anteriores e posteriores, dorso e região perianal, durante o início da manhã. Colocaram-se cabrestos e as caudas

¹ Saponina 5012 sample No SOSO8064 Quantity 100 g (Kerry Bio- Science) Ireland.

foram amarradas durante 6 horas para evitar a perda das larvas. Para a coleta das fêmeas ingurgitadas (teleóginas), procedeu-se ao recolhimento das amostras às 9:00 horas e às 16:00 horas de todos os animais durante todo o período do desafio.

No 35º dia, após a terceira imunização, todos os animais dos 4 Grupos foram inoculados com a cepa de *B. bovis* UFV1-9ª passagem, mantida sob crio preservação em nitrogênio líquido no LBCH/BIOAGRO a qual foi diluída a uma concentração de 1×10^6 Babesias/mL e inoculada via intravenosa.

3.5. Avaliação clínica dos animais

Todos os animais foram diariamente avaliados, considerando-se alteração no comportamento, consumo de alimento/dia, mensuração da temperatura, preenchimento capilar, nível de hidratação, frequência cardíaca e respiratória.

Durante a fase de imunização foi feita avaliação clínica laboratorial de todos os animais mediante a coleta de sangue semanal, a partir da primeira inoculação e durante um período de 18 semanas. O volume de células vermelhas foi medido usando o método de micro hematócrito e a contagem de células brancas e vermelhas foi obtida usando câmara de Newbauer. A concentração de hemoglobina foi determinada colorimetricamente (espectrofotômetro digital, SMART PM 3000) e posteriormente foi feita a conversão a cianometa hemoglobina.

Para avaliar o efeito do desafio foram considerados alguns parâmetros como: período pré-patente; parasitemia; período febril (PF), volume globular (VG); hemoglobina e duração da anemia. A medição da temperatura retal foi realizada entre as 8-9 horas da manhã, antes que os animais recebessem sua alimentação.

3.6. Coleta de sangue dos animais para obtenção de soro

Esta foi realizada semanalmente, durante 18 semanas, sendo a primeira coleta (dia zero), três dias antes da primeira imunização.

O sangue foi coletado por punção na veia jugular em tubos de 5mL (Venoject®), sem anti-coagulante e mantido em geladeira por aproximadamente 12 horas, no LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV. Após este período, o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm

por 5 minutos, sendo o soro recolhido e dividido em alíquotas e armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.7. ELISA.

3.7.1. Mensuração de IgG Total com afinidade pelo peptídeo SBbo23290

A resposta imunológica de IgG total, IgG1 e IgG2 foi avaliada mediante o teste imunoenzimático de ELISA. As placas MaxSorp Nunc[®] foram sensibilizadas a 4°C com peptídeo sintético SBbo23290 ($1\mu\text{g}/\text{poço}$) durante 18 horas, o qual foi diluído em 1mL de Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159 g de NaCl; 0,293 g de NaHCO_3 e água destilada q.s.p. 100 mL).

Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0g NaCl; 500 μl de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1000 ml), e bloqueadas com solução de caseína 2 % diluída em PBS pH 7,6 (8,5g de NaCl; 1,28g de Na_2HPO_4 ; 0,16 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e água destilada q.s.p. 1000 mL) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Repetiram-se as lavagens e adicionaram-se os soros dos animais diluídos 1:400 em Tampão de incubação (100 ml de PBS pH 7,6; caseína 0,25 % e Tween 20 a 0,05%) por duplicata.

Após incubação de 2 horas a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com Tampão de lavagem e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário, IgG de coelho anti IgG bovina marcado com peroxidase, o qual foi diluído 1:20000 (SIGMA) em Tampão de incubação. As placas foram mantidas á temperatura ambiente por 2 horas e logo após se realizaram 6 lavagens com tampão de Lavagem. Para a revelação do teste adicionou-se o substrato composto de uma solução contendo 4mg de OPD (-) fenildiaminobenzeno, 2,5 μl de H_2O_2 e 20ml de Tampão de Substrato pH 5,0 (7,19g de Na_2HPO_4 ; 5,19g de ácido cítrico e água destilada q.s.p. 1000 ml) e incubou-se na ausência de luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 30 μL de ácido sulfúrico 1:20/poço e as placas foram lidas imediatamente em leitor de ELISA (Titertek Multiskan[®] PLUS), a um comprimento de onda de 492 nm.

3.7.2. Mensuração da IgG1 e IgG2 com afinidade pelo peptídeo SBbo23290

A cinética de produção de IgG1 e IgG2 foi avaliada através do teste de ELISA desenvolvido pela BETHYL Laboratórios, de acordo com técnica recomendada pelo fabricante. Os testes foram realizados em duplicatas.

A sensibilização das placas foi feita para SBbo23290 com 1 µg/poço em tampão de cobertura pH 9.6 (0.53g Na₂CO₃, 100 mL de H₂O).

Uma vez sensibilizadas as placas Max Sorp Nunc[®] estas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem [(6.055g de Tris (Trizma)[®] SIGMA; 8,18g NaCl; 500ul de Tween 20; 1000 mL de água milli q 200 µL/poço)]. Posteriormente, foi feito o bloqueio com tampão de lavagem (Idem tampão solução de bloqueio) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Depois de lavar mais três vezes com tampão de lavagem, adicionaram-se os soros dos animais diluídos 1:400 em tampão de diluição (Idem tampão de lavagem) e incubados por uma hora a temperatura ambiente, logo após lavando mas duas vezes com tampão de lavagem.

Na identificação de IgG1 e IgG2 com alta afinidade para o peptídeo SBbo23290 foi empregado o conjugado ovelha anti IgG1 e anti IgG2 bovina marcado com peroxidase (BETHYL, diluídos 1:30000 em tampão de incubação (Idem Tampão de lavagem)).

Depois de incubar por 60 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lavadas mais três vezes e incubadas por um período de 30 minutos na ausência de luz a temperatura de 28 °C com solução reveladora (4mg de OPD. θ-fenildiaminabenzeno, 2,5µl de H₂O₂ e 20mL de tampão de substrato pH 5.0).

Finalmente a reação foi interrompida com 30µl de H₂SO₄ 3M/poço e as placas foram lidas em leitor de ELISA (Titertek Multiskan[®] PLUS), a um comprimento de onda de 492 nm.

3.8. Análise Estatística

A análise dos dados se realizou utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System) V. 7.0. Os dados de temperatura, volume globular e Hemoglobina foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de media de Dunnet, mediante o programa SAS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a fase de imunização não houve alteração dos parâmetros clínicos: volume globular, hemoglobina e contagem de hemácies e células brancas em nenhum dos animais dos 4 Grupos.

Já durante a fase de desafio apenas um animal do Grupo I (monovalente) apresentou manifestação clínica da doença, tendo sido medicado com diaceturato de 4,4 diazoaminobenzamidina (Ganaseg[®]) na dosagem de 3,5 mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, em dose única.

Para efeito de avaliação do período febril, considerou-se a temperatura retal de 39°C como limite máximo.

Às 24 horas após a primeira inoculação houve aumento na média da temperatura em todos os animais dos Grupos I, II e IV, com diferença significativa em relação ao Grupo III ($p < 0,05$) (Figura 1A).

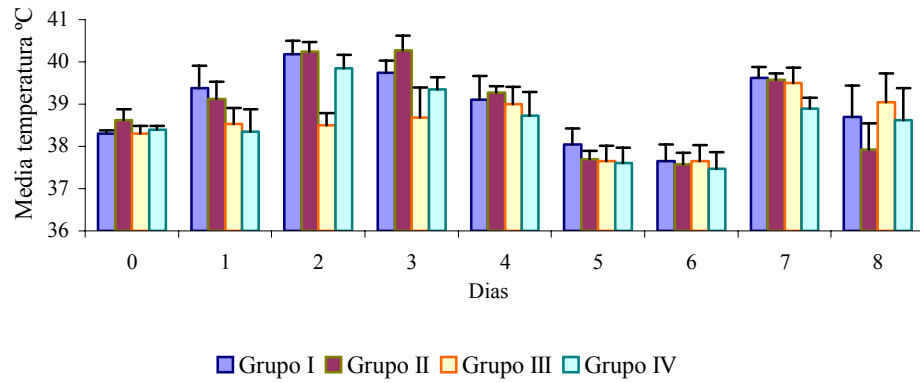
Após a segunda imunização, ocorreu um período febril com duração de 72 horas nos animais dos Grupos I e II, com uma temperatura média máxima ($T_{m\text{máx}}$) de 40,1°C e 40,2 °C, respectivamente, apresentando diferenças significativas de ($p < 0,05$) em relação ao Grupo III ($p < 0,05$). A temperatura normalizou no 4º dia após inoculação (Figura 1B).

Os animais do Grupo IV também manifestaram um leve aumento de temperatura no 2º dia após a segunda imunização, com $T_{m\text{máx}}$ de 39,3°C, com diferença significativa em relação ao Grupo III ($p < 0,05$).

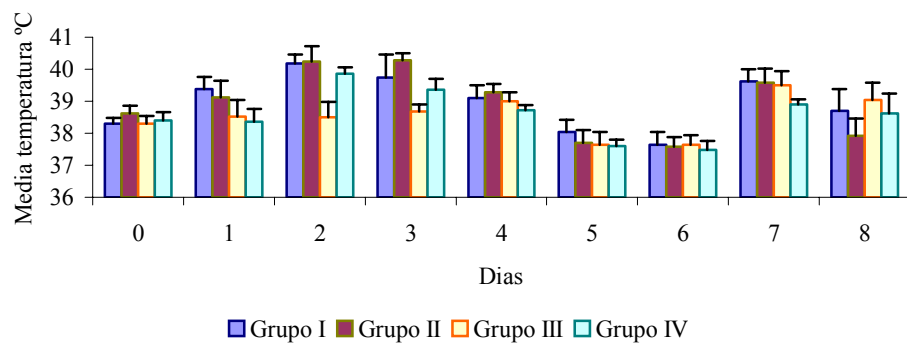
Após a terceira imunização, nos animais dos Grupos I e II a média de temperaturas foi 40,2 e 39,7 °C, respectivamente, 24 horas após inoculação, com diferença significativa em relação ao Grupo III ($p < 0,05$). A temperatura normalizou-se depois de 72 horas (Figura 1C).

Durante esta fase não se apresentaram diferenças significativas nas variáveis hematológicas. Os animais em geral tiveram boas condições de saúde e consumo normal de alimento.

1-A



1-B



1-C

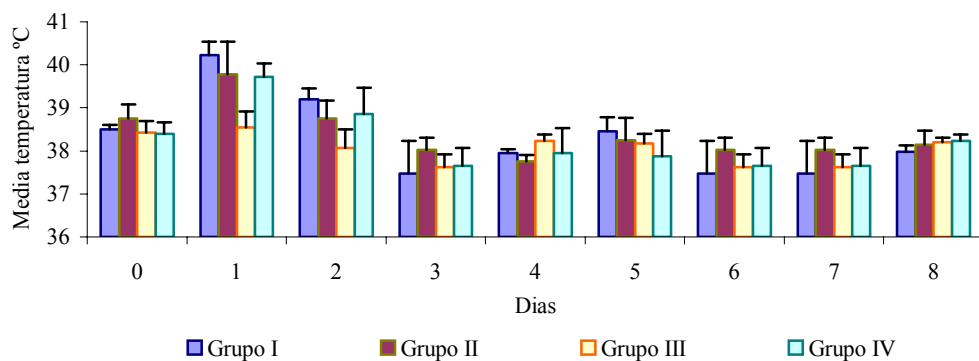


Figura 1. Médias (SD±) avaliação clínica. Temperatura retal. Figura 1-A. após primeira inoculação; Figura 1-B Segunda inoculação; Figura 1-C Terceira inoculação.

Tabela 2. Indicadores de proteção em bovinos imunizados com peptídeos sintéticos na forma monovalente e polivalente.

Mensurações	Grupo I (n=4)	Grupo II (n=4)	Grupo III (n= 4)	Grupo IV (n=4)	Significância
Parasitemia	1	0	4	4	
Mortalidade	0	0	0	0	
Animais tratados	1	0	0	0	
Período pré-patente (dias)	11	12	10	11	
Média Temperatura máxima	39,7	40,1	40,3	39,8	
Período febril (dias)	6**	10**	15	12	p<0.01
VG % redução máxima	48,61**	45,98**	54,6	42,36	p<0.01
Duração da anemia (dias)	3*	4*	5	1	p<0.01
Duração da parasitemia (dias)	1**	0**	5	4	p<0.01
Diminuição consumo de alimento.	0**	0**	4	4	p<0.01

* Diferença significativa em relação ao controle.

** Diferença significativa em relação ao adjuvante e controle.

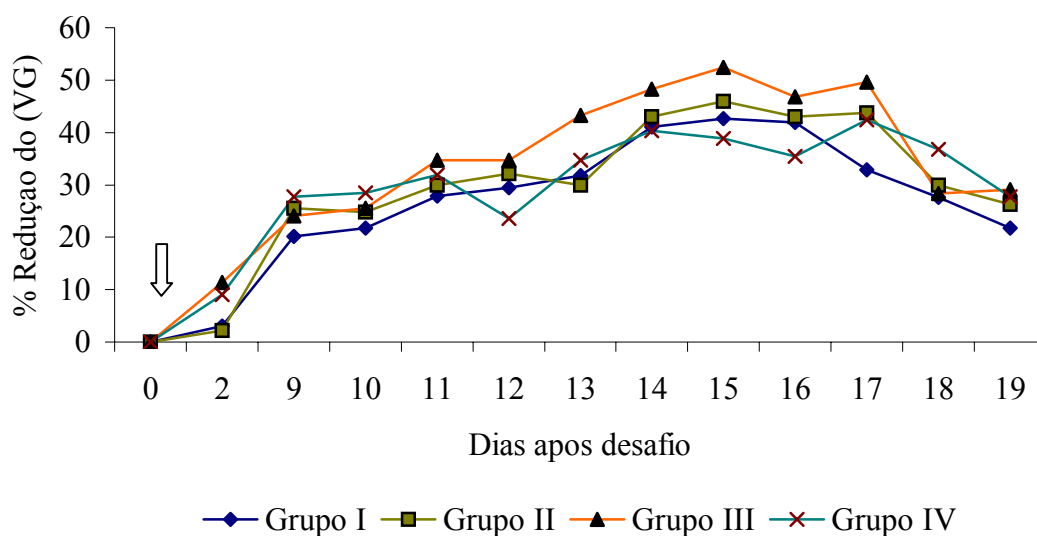


Figura. 2. Porcentagem (%) de redução do VG após desafio. A seta indica o desafio com *Babesia bovis*.

Esses dados referentes ao aumento de temperatura corporal durante a fase de imunização, parecem indicar que os peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 são capazes de desencadear a liberação de pirogênios endógenos, diferentemente do que foi mencionado por PATARROYO *et. al.* (1990); FIGUEIREDO (2002) e BEDOR JARDIM (2005).

A identificação de merozoítos de *B. bovis* foi realizada no 10º dia após desafio (PD), através de exame direto em esfregaço sangüíneo fino de ponta de orelha e/ou jugular nos Grupos III e IV, permanecendo detectável até o 17º dia após desafio. Os animais mostraram parasitemia com duração de 5 e 4 dias respectivamente (Tabela 2), sendo que todos eles apresentaram sintomas clínicos da doença, tais como: diminuição de movimentos ruminais, mucosas pálidas, preenchimento capilar de 4 segundos e diminuição no consumo do alimento. Apenas um animal do Grupo I adoeceu no 14º dia PD, sem que fosse constatada a presença do parasito.

Enquanto ao PF, nos animais dos Grupos I e II, este teve uma duração de 6 e 10 dias, respectivamente, a partir do 9º dia pós-desafio. Estes resultados mostraram diferença significativa com o Grupo III e IV, nos quais o PF teve uma duração de 15 e 12 dias, respectivamente, iniciando-se a partir do 3º dia após desafio (Tabela 2). Além disto, estes animais tiveram uma redução de 80 % no consumo de alimento.

Nos Grupos III e IV houve uma redução máxima de 54,6 % e 42,36 % do VG, respectivamente, a partir do 9º dia, com duração de 5 dias. Nos animais do Grupo I a redução do VG foi de 48,61 % e no do Grupo II foi de 45,98 %, com duração de 3 e 4 dias, respectivamente (Tabela. 2 e Figura. 2).

Quanto à hemoglobina, o menor valor médio ocorreu no 15º dia após desafio, 6,3 g/dL e 7,8 g/dL, nos animais dos Grupos III e IV, respectivamente, permanecendo com níveis baixos durante 9 dias. Nos animais dos Grupos I e II, também se encontrou redução da hemoglobina no 15º dia pós-desafio, com média de 5,7 g/dL e 7,3 g/dL, respectivamente.

O animal do Grupo I, que adoeceu, teve redução de 72% do VG e hemoglobina de 3g/dL.

O rápido retorno aos valores normais, dos parâmetros hematológicos avaliados nos animais dos grupos imunizados (I e II) são semelhantes àqueles relatados por FIGUEIREDO (2002), BEDÔR JARDIM (2005) e PATARROYO (1990). Entretanto, apesar de se encontrar diferença significativa no PF dos animais imunizados em relação

aos dos Grupos III e IV, esta foi diferente da observada por PATARROYO (1990), que encontrou PF de 3,5 e 7 dias, respectivamente.

Os baixos PF nos animais dos Grupos I e II em relação aos dos Grupos III e IV, associados com menor duração da anemia e redução do VG (Tabela 2), demonstram que ambos imunógenos foram capazes de induzir uma resposta imunológica que foi capaz de proteger os animais durante o desafio, parecendo que o imunógeno monovalente (Grupo I) teve uma ação mais eficaz.

A diferença do que foi observado por BEDÔR JARDIM (2005) e FIGUEIREDO (2002), não houve morte de animais no Grupo IV, embora eles tivessem redução do VG menor que o constatado nos animais dos Grupos I e II (Tabela 2).

A anemia que foi constatada nos animais dos Grupos I e II, associada à febre e sem a presença do agente em esfregaços sanguíneos, pode estar ligada à produção de antígenos residuais citofílicos do parasito, os quais quando adsorvidos sobre as hemácias são removidos pelas células do Sistema Monocítico Fagocitário (MONTENEGRO, 1992; PATARROYO, 1990).

Já nos animais dos Grupos III e IV a anemia foi consequência, principalmente, da multiplicação intra-eritrocitária das babesias, resultando em hemólise intravascular (MAHONEY, 1977; WRIGTH, 1989). Além disto, houve liberação de pirogênios endógenos que provocam incremento da temperatura corporal (RANDALL, 2000) e supressão do apetite (TIZARD, 2002; PETERSEN, 2004), sintomas estes que foram mais relevantes nos animais do Grupo III.

Esses resultados justificam o PF que acompanhou a anemia (Tabela 2), o qual foi maior que aquele constatado nos animais imunizados (Grupos I e II) e semelhantes aos que foram obtidos por FIGUEIREDO (2002) e BEDÔR JARDIM (2005). Entretanto, pequenas diferenças com outros trabalhos podem estar determinadas pelo tipo de cepa e quantidade de imunógeno empregado, os quais são fatores determinantes na redução do VG após multiplicação e liberação de parasitos e merozoítos ao nível intravascular (MAHONEY, 1977; WRIGHT, 1989)

A redução do VG nos animais dos Grupos I e II (Tabela 2) foi menor que aquela relatada por Goff et. al (2003), quem encontrou 46,54 e 62 % em bezerros de 16 semanas de idade desafiados com carrapatos *R. (B.) microplus* infectados com uma cepa virulenta de *Babesia bovis* (T2- Bo). Segundo esses mesmos autores, bezerros jovens são mais resistentes à infecção aguda com *B bovis* (imunidade inata) que animais velhos. Entretanto, como os animais que foram utilizados na presente pesquisa tinham 10 meses

de idade, pode-se inferir que a resposta após desafio estava diretamente relacionada com uma resposta imune adaptativa induzida pelo uso do imunógeno SBbo23290.

Ainda, como o controle da infecção é mediado pela destruição de eritrócitos infectados via ativação de macrófagos do SMF e por anticorpos neutralizantes contra merozoítos extracelulares e antígenos de superfície definidos como VESA 1 (BROWN *et al.*, 2006), pode-se reafirmar que houve proteção dos animais imunizados após desafio.

A pouca redução do VG nos animais do Grupo IV (Tabela 2) provavelmente foi determinada pela ativação e síntese de moléculas imunorreguladoras por parte do hospedeiro. No caso da saponina, a molécula QS21 é responsável pela atividade adjuvante e indutora de imunoglobulinas IgG2a e de citocinas Th1 como IFN γ e IL-2 (KENSIL, 1996; FRANCO, 2004).

A presença de anemia em todos os grupos experimentais pode estar relacionada com a produção de proteínas de fase aguda, provavelmente haptoglobina e hemopexina que fixam ferro, bloqueando assim o uso deste íon nas demandas de energia do parasito (BREMNER, 1964; TIZARD, 2002). Isto também explica a diminuição do VG e o aumento de temperatura nos animais imunizados sem presença de parasitas nos esfregaços sanguíneos. Talvez a proteção conferida pelos peptídeos esteja relacionada mais com incremento nos níveis de IL-6 sobre níveis de IL-1. Considerando que IL-6 ao induzir liberação de haptoglobina estaria protegendo os animais contra o agente, por um período maior, explicar-se-ia a não perda de apetite nos animais vacinados (BREMNER, 1964; TIZARD, 2002; PETERSEN, 2004).

A redução do VG, nos dias 15^o 16^o e 17^o após o desafio (Figura 2), observada nos animais do Grupo III coincide com a máxima ingurgitação das fêmeas, as quais aumentam entre 100– 200 vezes o seu tamanho pela ingestão de sangue (JONSSON, 2006).

Os resultados sobre parasitemia nos animais dos Grupos I, III e IV são similares aos observados por FIGUEIREDO (2002), quem encontrou uma baixa parasitemia no grupo vacinado e maior nos grupos controle e adjuvante. O tempo de duração da parasitemia (Tabela 2) constatada no presente trabalho é diferente da que foi descrita por PATARROYO (1990), o qual foi de 5, 7 e 9 dias nos animais vacinados, adjuvante e controle, respectivamente, podendo ser decorrente do tipo de cepa utilizada no desafio.

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam trabalhos anteriores (FIGUEIREDO, 2002; BEDÔR JARDIM, 2005), demonstrando que o imunógeno SBbo23290 é capaz de conferir proteção frente ao desafio com o parasito, uma vez que

evitou a entrada e replicação dentro dos eritrócitos, ativando mecanismos de defesa que levaram a rápida recuperação e moderados efeitos colaterais.

Os animais dos Grupos I e II apresentaram uma cinética de resposta clássica do tipo IgG (Figura. 3), com anticorpos específicos para SBbo23290 e nível basal de reatividade específica anti- SBbo23290 para o Grupo III.

Pode-se observar que a partir da 2ª semana após a 1ª imunização define-se um forte aumento nos títulos de anticorpos ($p < 0.05$) nos animais dos Grupos I e II, com níveis de $1,14 \pm 0,29$ e $1,06 \pm 0,2486$, respectivamente, diminuindo a partir da 3ª semana (Figura 3).

Na primeira semana após a 2ª imunização, também nos animais dos Grupos I e II, houve aumento no título de anticorpos, alcançando o máximo nível na 4ª semana ($1,53 \pm 0,1397$ e $1,46 \pm 0,20$, respectivamente). Estes mesmos valores se mantiveram durante quatro semanas após a 3ª imunização e primeira semana após o desafio (Figura 3).

Já durante a etapa de desafio (Figura 3) os títulos de anticorpos dos animais imunizados (Grupos I e II), diminuíram significativamente ($p < 0.05$) a níveis de $1,28 \pm 0,1034$ e $1,22 \pm 0,035$, respectivamente ($p < 0.05$).

Os animais dos Grupos III e IV não apresentaram diferença significativa entre eles. Além disso, durante o desafio os títulos permaneceram baixos $0,53 \pm 0,0885$ e $0,6015 \pm 0,034$, respectivamente, apresentando diferença significativa apenas com relação aos Grupos I e II ($p < 0.05$). (Figura 3).

Os altos títulos de anticorpos IgG anti SBbo23290 específicos, encontrados nos animais dos Grupos I e II, a partir da 2ª semana após cada imunização são similares aos resultados obtidos por PATARROYO (1995), BEDOR JARDIM (2005) e FIGUEIREDO (2002) quando testavam o potencial imunogênico desse peptídeo. Isto indica que o mesmo foi capaz de induzir uma resposta imunológica, cuja resposta secundária foi rápida e duradoura, caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos antígeno específicos, conforme afirma TIZZARD (2000).

Neste estudo, a cinética de produção de anticorpos do isótipo IgG1 específica contra o peptídeo SBbo23290, nos animais dos Grupos I e II, foi caracterizada por aumento a partir da 2ª semana após a 1ª imunização, com um alto título na 3ª semana de ($0,47 \pm 0,307$ e $0,33 \pm 0,1813$, respectivamente), apresentando valores mais baixos na 4ª semana após 1ª imunização. Este resultado foi diferente ($p < 0.05$) em relação ao Grupo III, no qual se apresentaram valores de $0,0521 \pm 0,005$ (Figuras 4ª e 5A).

Após a 2ª imunização, os animais dos Grupos I e II apresentaram um aumento significativo a partir da 5ª semana, alcançando o valor mais alto na 6ª semana, com títulos

de $0,9541 \pm 0,3837$ e $1,025 \pm 0,6104$, respectivamente ($p < 0,05$). Estes títulos se mantiveram, com pequenas oscilações, até a 7ª semana, começando a diminuir na 8ª semana (Figuras 4A, 5A, 5B).

Na 1ª semana após a 3ª imunização houve aumento dos títulos de anticorpos nos animais dos Grupos I e II, com diminuição na 11ª semana. Posteriormente, ocorreu um aumento constante a partir da 12ª até a 14ª semanas, com títulos de $1,46 \pm 0,6322$ e $1,2756 \pm 0,6855$, respectivamente, tendo-se observado diminuição significativa na 15ª semana ($1,05 \pm 0,47$ e $1,064 \pm 0,6756$) (Figura 4A).

Entre os animais dos Grupos III e IV não houve diferença significativa. Mais se observou diferença significativa com relação aos animais do Grupo II, após a 2ª imunização e após o desafio ($p < 0,05$).

Nas cinco primeiras semanas, após a 1ª e 2ª imunizações, a produção de IgG2 apresentou níveis baixos, sem diferenciação entre os diferentes grupos experimentais. A partir da 6ª semana os títulos de anticorpos aumentaram nos animais dos Grupos I e II, com títulos de $0,3967 \pm 0,3753$ e $0,275 \pm 0,1575$, respectivamente, mantendo-se estáveis e sem maiores variações até o final do experimento (Figura 4B)

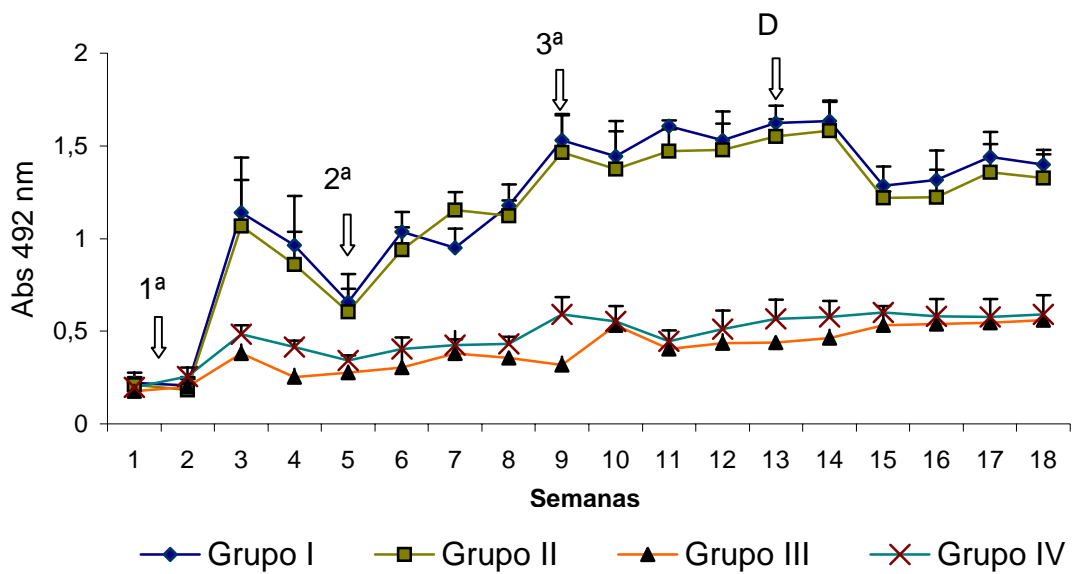


Figura. 3 Cinética da produção de IgGs, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290 em animais imunizados e controles. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio (D).

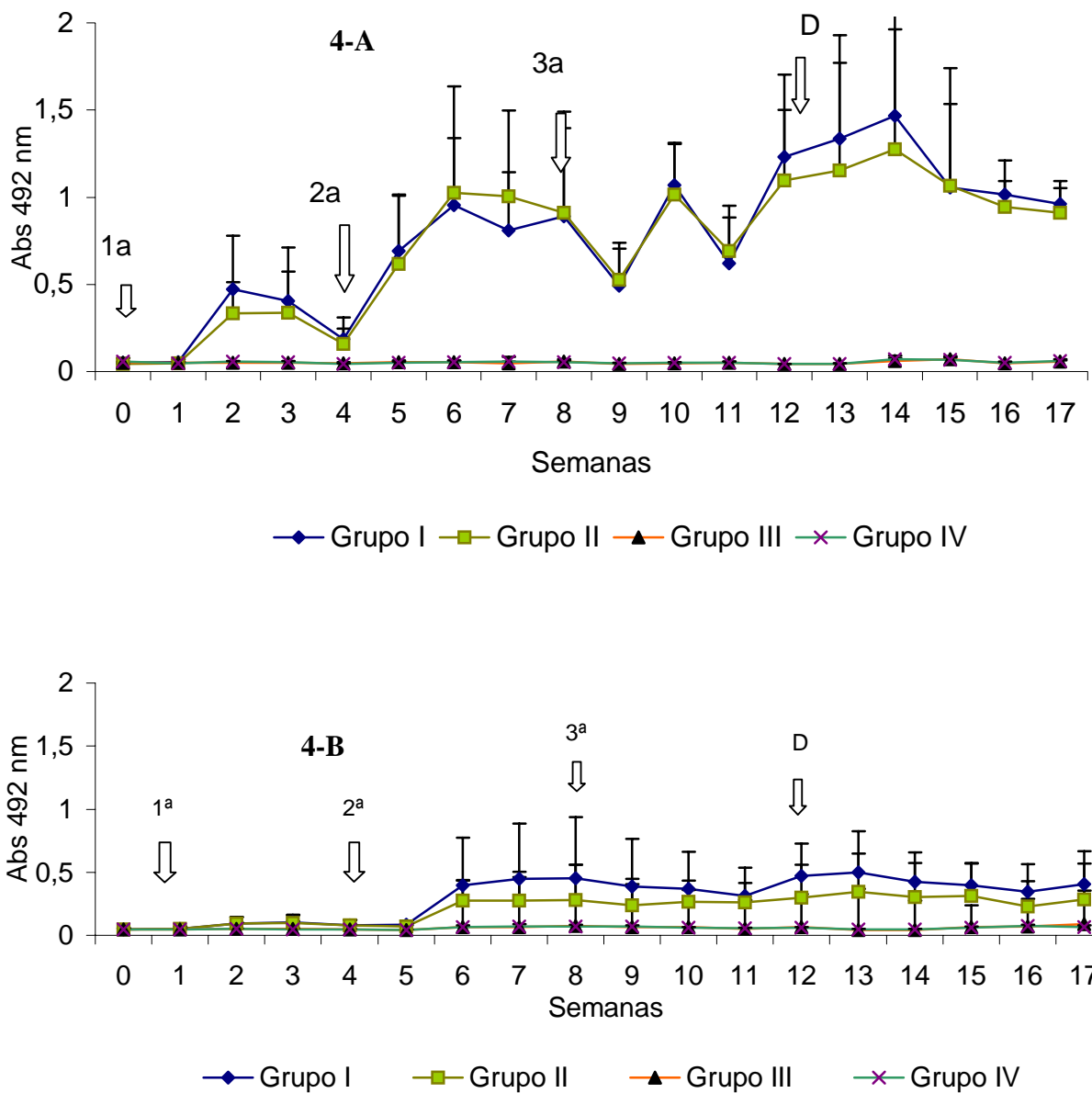


Figura 4-A Cinética da produção de IgG1; Figura 4-B. Cinética da produção de IgG2. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290 em animais imunizados e controles. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio. As barras em T representam os desvios padrões para mais e para menos. As setas indicam as inoculações e a letra (D) o tempo de desafio.

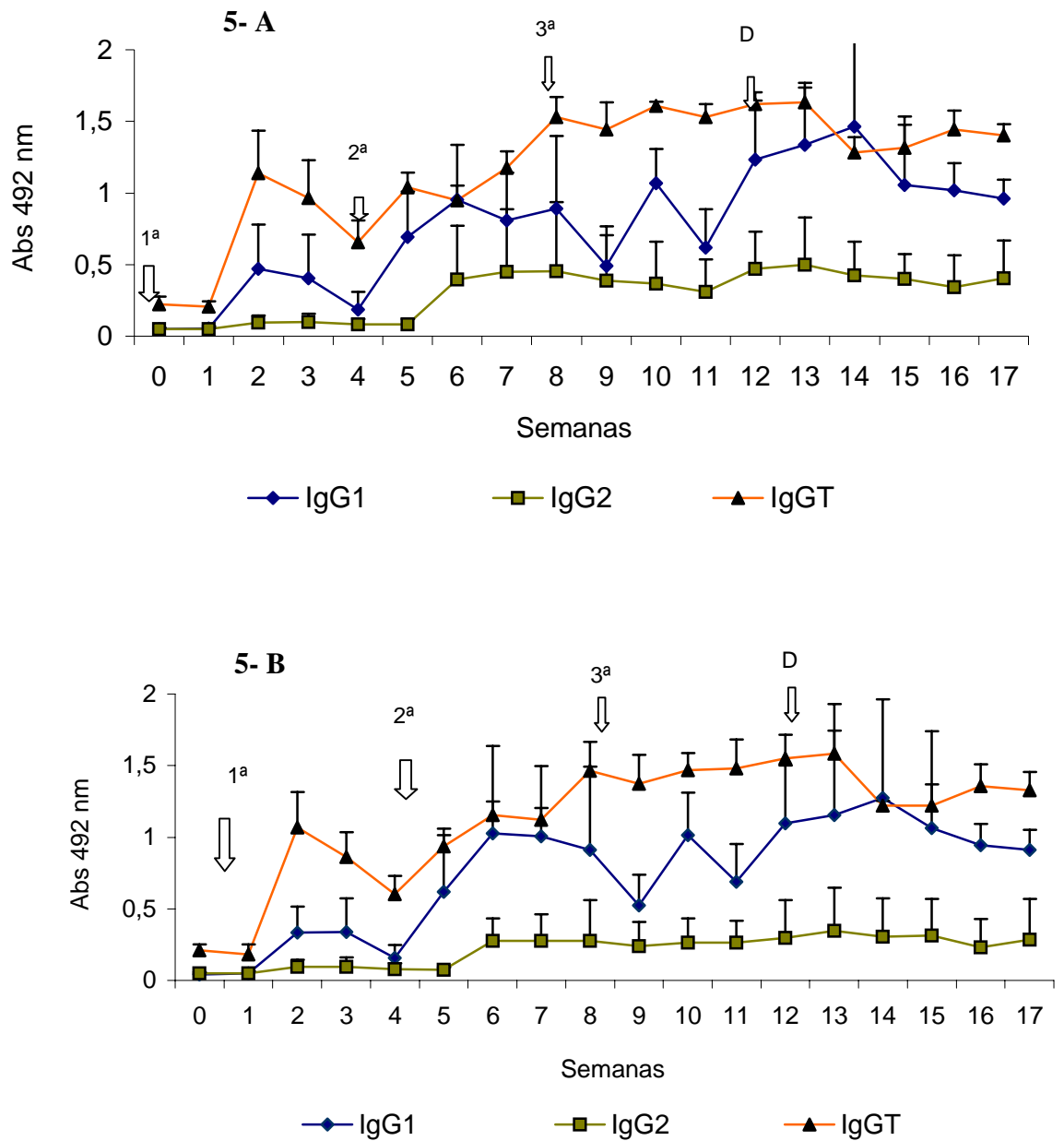


Figura. 5-A. Grupo I; Figura 5-B Grupo II. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgGT total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBbo23290. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio (D). As barras em T representam os desvios padrões para mais.

O estudo da cinética de produção de IgG1 e IgG2 é uma valiosa ferramenta para avaliação da resposta imune protetora contra *B. bovis*, principalmente pelo fato de que estas imunoglobulinas são importantes no controle da infecção devido a sua capacidade opsonizante (BROWN *et al.*, 1999). Então, considerando o perfil de produção de IgG1 e IgG2 observado nos animais dos Grupos I e II pode-se inferir que a resposta adaptativa induzida pelo peptídeo sintético SBbo23290 foi suficiente para proteger os animais após o desafio.

Segundo BROWN *et al* (1999), discutindo o papel das citocinas na infecção por hematozoários afirmam que altas concentrações de IgG1 estão relacionadas com a produção de IL-4, a qual induz o aumento de produção desta imunoglobulina pelas células B reativas. Baseado nessas informações é provável que nos animais dos Grupos I e II tenha ocorrido um aumento na produção de citocinas que caracterizam a resposta Th2, do tipo humoral, tais como a IL-4 e IL-5, já que esses mesmos autores afirmam que o IFN- γ atua estimulando a produção de IgG2.

Mais recentemente, trabalhos realizados por ESTES & BROWN (2002) sugerem que a resposta dominada pela produção de IgG1 é consistente com uma resposta tipo Th2, uma vez que este isótipo se encontra associado à estimulação de clones de linfócitos B. Desta forma, os níveis aumentados de IgG1 e a presença de IgG2 observados no presente experimento, indicam que houve ativação e seleção clonal de células T CD4+ específicas contra o imunógeno SBbo23290, as quais mediarão a produção e secreção de imunoglobulinas por células B.

Os altos níveis de IgG1 anti SBbo23290 em relação aos níveis de IgG2 constatados durante todo o experimento são similares aos encontrados por BEDÔR JARDIM (2002). Igualmente, FREITAS (2001) relata níveis altos de IgG1 em bovinos inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis*.

Imunoglobulinas do tipo IgG1 e IgG2 fixam complemento, embora a IgG2 tem maior atividade neutralizante contra *Babesia* sp em relação à IgG1 (MCGUIRE *et al.*, 1979; MAHONEY, 1986). Entretanto, pelos altos níveis de IgG1 que foram encontrados neste trabalho, é possível que a atividade opsonizante tenha sido determinada mais por esse isótipo do que por IgG2, embora, não deve ser descartada a sua participação, principalmente, porque em animais imunizados as células TCD4+ desempenham um papel

central na resposta imune adaptativa através da produção de IFN γ , citocina esta que regula a sínteses de anticorpos IgG2 (ESTES & BROWN, 2002; GOFF, 2006).

5. CONCLUSÕES

Os imunógenos SBbo23290 e SBm7462 são peptídeos sintéticos altamente imunogênicos que desencadeiam uma liberação de pirogênicos endógenos 24 a 48 horas após sua aplicação.

Considerando a avaliação clínica dos animais e os altos níveis de anticorpos IgG, IgG1 com alta afinidade pelo peptídeo SBbo23290. Este confirió uma boa resposta imune protetora ao ser aplicado junto com o peptídeo SBm7462 no Grupo I e II.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED DR & AL-KHEDERY B., 2004. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. **Mol Biochem Parasitol.** 134, 27–35.

BEDÔR J LARISSA F., 2005. **Avaliação de alguns parâmetros clínicos em bovinos inoculados com o imunógeno sintético SBbo23290 e desafiados com amostra Virulenta de *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888)** Tese de Pós – Graduação em Medicina Veterinária pra obtenção do título de Magister. Universidade Federal de Viçosa. 54p

BERZOFKY JA, CEASE KB, CORNETTE JL, *et al.*, 1987 .Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. **Immunol Rev.** 98:9–52.

BICEGO, K.C; BARROS, C.H.R; BRANCO, L.G.S., 2006. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** Jun 29. 24p.

BLATTEIS, C.M., 2006. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics.** 111. 194 – 223

BREMNER K.C., 1964. Studies on haptoglobin and haemopexin in the plasma of cattle, **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 42 643–656; Cit PETERSEN H.H., 2004. Application of acute phase protein measurements. In: **Veterinary Clinical Chemistry.** Vet. Res. 35, 163–187

BROWN, W.C; LOGAN, K.S, WAGNER, G.G; TETZLAFF, C.L., 1991. Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. **Infect Immun;** 59: 2418–2426.

BROWN, W.C; NORIMINE, J; GOFF, W.L; SUAREZ, C.E; MCELWAIN, T.F., 2006. Prospect for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. **Parasite Immunology.** 28, 315 -327.

BROWN, W.C; PALMER,G.H., 1999. Designing blood –stage vaccines against *Babesia bovis* and *B bigemina*. **Parasitol. Today.** 15, 275 – 281.

BROWN,W.C; RODRIGUEZ, S.D; HOTZEL, I; RUEF, B.J; CHITKO-McKOWN, CG;MCELWAIN,TF; PALMER GH., 1996. Characterization of helper T cell responses against rhoptry –associated protein 1 (RAP – 1) of babesial parasites. **Ann NY Acad. Sci;** 271,128 -135.

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

COOPER, J.A. *et al.*, 1991. The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of *Plasmodium falciparum* consists of discrete polypeptides. **Mol. Biochem. Parasitol**; 29, 251-260.

DALRYMPLE, B.P., 1993a. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. **Acta Trop**; 53, 227-238.

DOURY, J.C. *et al.*, 1994. Analysis of the high molecular weight rhoptry complex of *Plasmodium falciparum* using monoclonal antibodies. **Parasitol**; 108, 269-280.

ESTES D.M; BROWN W.C., 2002. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. **Vet Immunol Immunopathol**. 90, 1–10.

ESTES, D.M; HIRANO, A; HEUSSLER, V.T; DOBBELAERE, D; BROWN, W.C., 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cell. Immunology**; 163, 268-279.

FIGUEIREDO, B.J.F., 2002. **Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*. Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral**. Belo Horizonte: UFMG, 2002. Tese (Doutorado em Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

FIGUEROA, J.V. *et al.*, 1991. Identification of common surface antigens among *Babesia bigemina* isolates using monoclonal antibodies. **Parasitol**; 100, 161-175.

FRANCO, D.A; GIRALDO, M.L; PATIÑO, P.J., 2004. Papel de los adjuvantes en la modulación de la respuesta inmune. **Rev Col Cienc Pec**. 17, 280-289

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

GOFF, W.L; JOHNSON, W.C; HORN, R.H; BARRINGTON, G.M; KNOWLES, D.P., 2003. The innate immune response in calves to *R. (B.) microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type -1 cytokine induction and NK – like cells in the spleen. **Parasite immunology**. 25, 185 -188.

GOFF, W.L; STORSET, A.K; JOHNSON, W.C; BROWN, W.C., 2006. Bovine splenic NK cells synthesize IFN- γ in response to IL-12 containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. **Parasite Immunol**. 28, 221–228.

HEIN, WR; MACKAY, C.R., 1991. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. **Immunol. Today** 12, 30 -34.

International Union of Physiological Sciences, Commission for Thermal Physiology .,2002. Glossary of Terms for Thermal Physiology, (3rd edR). **Jpn J Physiol.** 51, 245–280.

IRVIN, A.D; BROCKLESBY, D.W.; PURNELL, R.E., 1979. Radiation and isotopic techniques in the study and control of piroplasms of cattle: a review. **Vet. Parasitol.** 5, 17-30.

JACKSON, D.C; FITZMAURICE, C.J; BROWN, L.E.; ZENG, W., 2000. Preparation and properties of totally synthetic immunogens. **Vaccine.** 18, 355-361.

JONSSON, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*R. (B.) microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary parasitology.** 137, 1-10

JORGENSEN, W.K *et al.*,1992. Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. **Parasitol. Res;** 78, 423-426.

KENSIL CR.,1996. Saponins as vaccine adjuvants. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.** 13, 51-5

KOLB, E., 1980. Fisiologia Veterinaria. **Guanabara Koogan.** 4^a ed. Rio de Janeiro. 362-373.

LOSOS, G.L., 1938. **Infection Tropical diseases of domestic animals.** New York Churchill Livingstone. 1986.

MACLENNAN, I; DE VINUESA, C.G; CASAMAYOR-PALLEJA, M., 2000. B-cell memory and the persistence of antibody responses. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 355, 345–350.

MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B., 1977. The selection of larvae of *R. (B.) microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *Babesia argentina*). **Res. Vet. Sci;** 23, 126-127

MCGUIRE, T.C, MUSOKE, A.J; KURTII, T., 1979. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. **Immunology;** 38: 249–256.

MONTEALEGRE, F, *et al.*,1992. Growth inhibition of *Babesia bovis* in culture by secretions from bovine mononuclear phagocytes. **Infect. Immun;** 50, 523-526. 1985

MOTENEGRO-JAMES, S., 1992. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 87,27-36.

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

PATARROYO, J.H.S., 1990. **Babesia bovis caracterização, identificação e purificação de exo-antígenos obtidos de culturas in vitro: vacinação experimental de bovinos.** 217 f. Tese (Doutorado) – Depto de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

PATARROYO, J.H, PORTELA, R.W; DE CASTRO, R.O; *et al.*, 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *R. (B.) microplus* gut protein (Bm86): **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 88, 163–172

PATARROYO, J.H.S. *et al.*,1999. Mapeamento de epítomos T reativos da proteína B_v60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. In: **Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinária;** 9, Salvador. Anais. Salvador: [s.n.]. 197.

PETERSEN, H.H., 2004. Application of acute phase protein measurements. **Veterinary Clinical Chemistry. Vet. Res.** 35, 163–187

RANDALL, D; BURGGREN, W; FRENCH, K., 2000. Fisiologia animal. Mecanismos e adaptações. **GUANABARA KOOGAN.** Rio de Janeiro.729 p.

ROTH, J., 2006. Endogenous antipyretics. **Clinical Chemical Acta.** 371, 13-24

SHKAP, V; LEIBOVITZ, V; KRIGEL, Y; HAMMERSCHLAG J *et al.*, 2005. Vaccination of older Bos Taurus bulls against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology.** 129, 235 – 242

SOLORIO, V.R.I. RODRÍGUEZ, G.E. PÉREZ AND G. WAGNER., 1999. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatan, Mexico Prev. **Vet. Med.** 40, 261–269.

SOSSAI S; PECONICK AP; SALES JUNIOR PA; MARCELINO F C; VARGAS MI; NEVES, E.S; PATARROYO, J.H., 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *R. (B.) microplus*. **Experimental and Applied Acarology.** 37, 199-214

STICH, R.W; RICE-FIGHT,A.C: BROWM, W.C., 1999. *Babesia bovis* common protein fraction recognized by oligoclonal B bovis – specific CD4 + T cell lines from genetically diverse cattle. **Exp. Parasitol.** 91, 40-51.

TABAREAN, I.V.A; KORNB, H; BARTFAIA, T., 2006. Interleukin-1. Induces Hyperpolarization And Modulates Synaptic Inhibition In Preoptic And Anterior Hypothalamic Neurons. **Neuroscience.**141 (4), 1685-95.

TAYLOR, S.M., 1989. *Babesia* vaccines attenuated by blood passage and irradiation. In: WRIGHT, I.G. Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. **Boca Raton:** CRC Press. p. 43-59.

TIZARD, I.R., 2002. Inmunología veterinaria.. **Mac-GrawHill 6a Ed. Mexico.** 517p

WRIGHT, I.G; RIDDLES P.W., 1989. Biotechnology in tick bom diseases. Present status , future perspectives. FAO – UN **Biotechnology for Livestock Production Plenum**, New York. 325 -240.

WRIGHT, I.G; GOODER, B.V; BUFFINGTON, G.D. *et al.*, 1989. Immunopathophysiology of babesial infections. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** 83, 11-13

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

CAPITULO II

AVALIAÇÃO DO PEPTÍDEO SBm7462 AO SER APLICADO JUNTO COM SBbo23290 NA FORMA MONOVALENTE E POLIVALENTE EM BOVINOS DESAFIADOS COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) E *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888)

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2006

Resumo

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causa um grande impacto econômico na produção bovina do Brasil e do mundo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros biológicos dos carrapatos coletados nos animais da raça Holandesa 7/8, tratados com os imunógenos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 para o Controle de *Babesia bovis* e *R. (B.) microplus*, respectivamente. Os peptídeos foram preparados individualmente, utilizando Saponina como adjuvante, sendo aplicados simultaneamente em locais anatomicamente distintos (Grupo I) e em doses associadas (Grupo II). Cada tratamento foi aplicado três vezes, com intervalos de 30 dias, via subcutânea. O desafio foi realizado 30 e 34 dias após a terceira inoculação, colocando-se 4000 larvas de *R. (B.) microplus*, cepa livre de hemoparasitas, e inoculando a cepa com *B. bovis* UFV1 – 9ª passagem na concentração de 1×10^6 babesias/mL. As teleóginas foram coletadas a partir do 21º dia após o desafio, pesadas individualmente em balança de precisão, e mantidas adequadamente em estufa B.O.D. a 28°C e umidade relativa de 80%. Os ovos foram coletados nos 15 primeiros dias para posterior pesagem. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação entre médias pelo Teste de Dunnet e teste t de student. Ao comparar os parâmetros biológicos encontrados com o nível de anticorpos, observamos que o Grupo I apresentou altos títulos de IgG total e IgG1 específicos para SBm7462 com uma deficiente efetividade no controle dos carrapatos, diferente ao Grupo II, onde altos títulos de IgG total, baixos níveis de IgG1 e uma DF de 46,80 % foram prevalentes. Estes resultados indicam que existe uma importante diminuição na eficácia do imunogeno SBm7462 quando é administrado simultaneamente com SBbo23290. Sugere-se a presença de competição intraclonal após apresentação por APCs (DC ou WC1.1⁺) a CD4⁺ e linfócitos B nos centros germinais, com maior afinidade por clones SBbo23290 sobre SBm7462, talvez determinado por solubilidade antigênica.

Palavras – Chave: *R(B) microplus*, *Babesia bovis*; peptídeos sintéticos

Abstract

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causes a great economic impact in the cattle production of the Brazil and the world. The objective of the present work was to evaluate the biology parameters of ticks collected in 7/8 European race animals, treated with the synthetic immunogens SBbo23290 and SBm7462 to the control of *Babesia bovis* and *R. (B.) microplus*, respectively. Each peptide was prepared with saponin as adjuvant, being applied simultaneously in different anatomic places (Group I) and their association (Group II). Each treatment was applied three times, with interval of 30 days, by subcutaneous route. The challenge was made 30 and 34 days after the third inoculation with 4000 larvae of *R. (B.) microplus*, samples free of blood parasites, and with *B. bovis* UFV1 – 9th passage in the concentration of 1×10^6 babesias/mL. The ticks full up of blood were collected from 21th day after the challenging, weighted each one in balance of precision and kept in temperature of 28°C and relative humidity of 80%. The eggs were obtained in the first 15 days and weighted. The obtained dates were analyzed by statistical analyses (Variance Analysis and Test of Dunnet and T - student). The Group I presented high titles of IgG and IgG1 with affinity by SBm7462 with a low efficient in the control of ticks, differently to the Group II, where the high titles of IgG, low levels of IgG1 and DF of 46,80 % were prevalent. These results suggest that there is a considerable decrease in the efficacy of the immunogen SBm7462, when both are administrated simultaneously in relation to the use of their association. It is possible that intraclonal competition was present after the presentation by APCs (DC or WC1.1⁺) to CD4⁺ and lymphocytes B in the germinal centers, with major affinity by specific clones SBbo23290 over SBm7462. Beside, it is possible that these changes were determined by antigen solubility.

Key–Words: *R.(B.) microplus*, *Babesia bovis*; *synthetic peptides*

2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

R. (B.) microplus (CANESTRINI, 1888) CANESTRINI (1890).Syn. *B. microplus* (CANESTRINI, 1888) LAHILLE (1905) (BARKER & MURREL, 2002; MURELL, 2003), é o mais importante vetor da babesiose bovina (*Babesia bigemina* e *B. bovis*) (GARCIA, 1991). Estes parasitos desencadeiam grandes perdas na produção bovina da América Central, América do Sul e Austrália (PATARROYO *et al.*, 2002; WRIGHT *et al.*, 1989; SOLORIO *et al.*, 1999). Apenas *R. (B.) microplus* causa perdas estimadas em US\$ 8 bilhões por ano (RECHAV, 1992; SOSSAI *et al.*, 2005). No Brasil, com uma população de 170 milhões de bovinos, calcula-se um prejuízo de US \$11,76 por bovino/ano, US\$ 2 bilhões anuais devido ao fato de *R. (B.) microplus* transmitir hemoparasitas, diminuir o valor dos animais, e pelo custo dos tratamentos (PATARROYO e SOSSAI, 2004; GRISI *et al.*, 2002).

Este carrapato que afeta especialmente bovinos, tem um ciclo monoxeno com uma fases parasitária de aproximadamente 21 dias, a qual passa pelos instares de larva, ninfa e adulto, tudo em um único hospedeiro. A fase adulta é dependente das condições oferecidas pelo hospedeiro e pouco afetada pelas condições climáticas (RIEK, 1965; TUNIN, 2004).

Entre os fatores que determinam a viabilidade das larvas de carrapatos encontra-se a espécie do hospedeiro, resistência aos carrapatos, espessura e área topográfica da pele com relação ao nível de capilarização e a atividade de asseio realizada pelos animais ou indivíduos da mesma ou outra espécie (CORDOVÉS, 1997).

No caso da fase não parasitária, esta sofre enorme influência das condições ambientais (FURLONG, 1998). O período de pré-postura é influenciado pela baixa temperatura, mas não pela umidade, podendo ser atrasado alguns dias (LONDT, 1974).

As larvas são mais vulneráveis que os ovos às baixas temperaturas e a duração da fase larval é influenciada pelas condições de temperatura e umidade relativa às quais o embrião é submetido (HITCHCOCK, 1955a). O mesmo autor relata que as larvas de *R. (B.) microplus* em condições ótimas em laboratório podem sobreviver até 8 meses.

Em relação às condições oferecidas pelo hospedeiro, elas estão ligadas fatores de resistência dos bovinos ao *R. (B.) microplus*, entendido como a dificuldade que os carrapatos têm para alcançar a idade adulta (WHARTON *et al.*, 1971).

Os animais têm diferentes graus de resistência entre raças (LEMOS, 1986), sendo que alguns animais se infestam mais que outros (FURLONG, 1998). Estas variações estão

relacionadas à característica polimórfica dos genes que codificam o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), o qual é primordial na apresentação de antígenos e comunicação entre células do sistema imune (STEAR *et al.*, 1989; HUGHES & YAGER, 1998).

As estratégias encaminhadas ao controle dos carrapatos com produtos químicos apresentam limitantes como: toxicidade, contaminação de produtos alimentícios, risco para a saúde humana, poluição ambiental e aparecimento do fenômeno de resistência, conseqüente à alta pressão de seleção (PATARROYO e GUZMAN, 2004; LI *et al.*, 2005).

Na atualidade são amplamente estudadas vacinas feitas com antígenos expostos, proteínas secretadas por glândula salivar e antígenos ocultos descobertos em parede do intestino dos carrapatos (NUTALL *et al.*, 2006). A principal vantagem dos antígenos ocultos esta em sua evasão da imunossupressão salivar. Problema das vacinas com antígenos expostos (NUTALL *et al.*, 2006).

No controle de *R. (B.) microplus*, o peptídeo SBm7462 é uma vacina sintética, quimicamente definida para a proteção dos animais contra a afecção de carrapatos que foi desenvolvido a partir da proteína Bm86, por predição computacional de sítios imunogênicos. Quando testado em bovinos contra *R. (B.) microplus* mostrou uma eficácia de 81,05 % (PORTELA, 2000; PATARROYO *et al.*, 2002; COUTO, 2002).

Estas vacinas induzem a produção de anticorpos que interagem na superfície do intestino, causando ruptura da parede intestinal, ingressando à cavidade corporal ou hemolinfa do carrapato e afetando muitas funções vitais. (NUTALL *et al.*, 2006). Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, parecendo estar associado a processos de endocitose (SOSSAI *et al.*, 2005).

Os anticorpos causam lise das células intestinais, o que leva a um reduzido número de fêmeas ingurgitadas, redução na produção e viabilidade dos ovos (KEMP *et al.*, 1989).

Avaliações realizadas com SBm7462 mostraram imunização efetiva contra *R. (B.) microplus*, em que os parâmetros avaliados, tais como: número de teleóginas desprendidas (DT%), redução do peso (DR%), redução da ovoposição (DO%) e fertilidade (DF%) foram significantes (PATARROYO *et al.*, 2002; PATARROYO *et al.*, 2004).

COUTO, (2002) avaliando SBm7462 com doses de 1.0 mg e 2 mg, encontrou eficácias de 10.58% e 50.86 % respectivamente.

Considerando a resposta imune conferida pelo peptídeo SBm7462, GONZALES *et al.* (2003) constataram a presença de altos níveis de IgG1, indicando uma resposta do tipo

Th2. Com aumentos significativos de IgG1 a partir da 3ª imunização, com absorvâncias de 1.1185 ± 0.0565 na 12ª semana. A IgG2 mostrou níveis próximos aos apresentados pelos grupos Controle e Saponina.

Trabalhos indicam que o número de células TCD4+ recrutadas esta determinado pela dose antigênica (YANG *et al.*, 2006; DUFFY *et al.*,2006). Estes estímulos podem determinar a geração de células B de memória e síntese de anticorpos, embora seja pouco conhecido quais os sinais necessários para esta transformação. Os estudos indicam que a síntese de IgG1 por células B poderia acontecer por duas vias, uma envolvendo IL-2 e outra envolvendo IL-4 e IL-5 (LEE & VITETTA, 1991; DUFFY *et al.*, 2006).

Modelos animais utilizando camundongos SCID mostram que após transferência de células B “naive” junto com células T KJ⁺ e imunizando com ap-OVApep, os animais desenvolverem predominantemente anticorpos IgG1, com resposta tipo Th2 (YANG *et al.*, 2006).

CREUSOT *et. al.* (2003), investigando em camundongos a interação entre células TCD4⁺ após estímulo antigênico com ovoalbumina (OVA) na presença ou ausência de ativação concomitante com PCC, encontrou que existe uma regulação das células T antígeno-específicas mediante uma competição intraclonal. A presença de um alto número de células PCC-específicas não inibe, mas aumenta a resposta OVA-específica. Os autores sugerem que no caso de apresentação de dois antígenos por células dendríticas similares ou diferentes pode haver cooperação ou competição entre duas populações de células TCD4⁺

A competição intraclonal ocorre entre populações de células TCD4⁺ (SMITH *et al.*, 2000; LAOUAR *et al.*, 2000), em populações de células TCD8⁺ (KEDL *et al.*, 2000) ou entre populações de células B. (HERMANN *et al.*, 2006) No caso de competição interclonal, refere-se a uma competição cruzada entre populações de células TCD4⁺TCD8⁺ (KEDL *et al.*, 2003).

ANDERTON & WRAITH (1998) relatam que células TCD4⁺ podem prevenir a ativação de células “naive” com afinidade hierárquica, isto é, as células com uma afinidade particular só podem suprimir células com baixa afinidade.

No caso dos anticorpos, estes envolvem ligações com incremento da afinidade a antígenos. Este fenômeno termina com a afinidade de maturação, fundamentado em múltiplos caminhos de hiper-mutação somática, marcadores de genes de anticorpos e subsequente seleção por incremento da afinidade de ligação (MACLENNAN *et al.*, 2000).

Trabalhos experimentais sugerem que as células B são selecionadas por competição clonal, onde células B de baixa afinidade podem persistir nos centros germinais quando a competição é reduzida (DAL PORTO *et al.*, 2002; SHIH *et al.*; 2002; HERMANN *et al.*, 2006).

CREUSOT *et al.*, (2003) encontraram que quando mais de um antígeno são apresentados sobre diferentes moléculas de MHC pelas mesmas células dendríticas, a resposta de células TCD4⁺ endógenas não é inibida, mas aumentada em resposta a um grande número de células TCD4⁺ específicas contra os outros antígenos.

A ausência de competição entre células TCD4⁺ e TCD8⁺ pode estar mascarada pela sua propriedade cooperativa. A apresentação de ligações determinantes por células dendríticas é mais pronunciada intraclonalmente que interclonalmente sugerindo que a competição não é pelo conglomerado, mas pela habilidade dos complexos MHC-peptídeo (Figura 6). Os autores indicam que esses resultados de competição intraclonal podem explicar porque as vacinas multivalentes podem trazer benefícios individuais em detrimento da redução da resposta em outros indivíduos (CREUSOT *et al.*, 2003).

No presente trabalho, se pretendeu contribuir para desenvolvimento de vacinas polivalentes que brindem uma resposta protetora simultânea ante a presença de *Babesia bovis* e *R(B) microplus*, sem detrimento da imunidade protetora. Avaliando a hipótese que SBm7462 em dose associada ao peptídeo sintético SBbo23290 para o controle de *Babesia bovis*, podendo conferir uma resposta protetora ao serem aplicados ao mesmo tempo na forma monovalente e na forma polivalente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 16 animais da raça Holandesa 7/8, negativos sorológica e parasitologicamente a hemoparasitas (*B. bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*) e mantidos em condições de isolamento no DVT/UFV a partir de 4 dias de nascidos evitando-se assim, o contato com artrópodes ou vetores. Eles foram alimentados com leite de substituição (Bioleite)[®] e a partir do 14 dia de idade até os 48 dias, além do leite de substituição, também recebiam feno, ensilagem e água *ad libitum*. Posteriormente, os animais foram alimentados com ração (17 % de proteína) e quantidade definida de volumoso.

3.2. Preparação dos imunógenos

A dose monovalente de SBbo23290 (Grupo I) era composta de 2 mg do peptídeo sintético SBbo23290, 1,5mg saponina e 2mL de água milli q, fazendo-se homogeneização em vórtex durante 5 minutos. Para a monovalente SBm7462 (Grupo I) também se utilizaram 2mg do peptídeo SBm7462, 1,5mg saponina e 2mL de água milli q. Como o peptídeo sintético SBm7462 apresenta uma característica de baixa solubilidade, antes de diluir foi realizado sonicação (Gerador ultrasônico Lab-Line[®] modelo 9100) a 20 watts durante cinco segundos.

Na preparação da Polivalente (Grupo II) adicionaram-se 2mg de SBm7462, 2 mg de SBbo23290 e 1,5mg de saponina em 4mL de água milli q, sendo homogeneizados em vórtex por 5 minutos. A sonicação do peptídeo sintético SBm7462 descrita anteriormente foi realizada antes da mistura com o SBbo23290.

Tanto os imunógenos monovalentes quanto os polivalentes foram preparados antes da inoculação e mantidos a temperatura ambiente.

3.3. Esquema de imunização nos bovinos

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais, cada um com quatro animais: Grupo I (monovalente), Grupo II (polivalente), Grupo III (controle) e Grupo IV (saponina). Os animais do Grupo I e do Grupo II receberam três doses a cada 30

dias por via subcutânea dos imunógenos monovalente e polivalente, respectivamente. No Grupo I, as monovalentes eram aplicadas na região cervical, direita e esquerda, para cada um dos peptídeos. Os animais do Grupo III receberam 2mL de água milli q, via subcutânea, por três vezes a cada 30 dias. Os animais do Grupo IV receberam 1,5mg de saponina² diluída em 2mL de água milli q, no mesmo esquema de três vezes, via subcutânea e a cada 30 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho do experimento. Grupos, replicações, classe de imunógeno, doses e via de aplicação.

Grupos	Animais	Imunógeno	Quantidade / animal	VA	
Grupo I	Monovalente	25, 52, 27, 24	SBm7462	2 mg	SC
			Saponina	1,5 mg	
			Água milli q	2 mL	
			SBbo23290	2 mg	
Grupo II	Polivalente	53, 42, 54, 21	Saponina	1,5 mg	SC
			Água milli q	2 mL	
			SBm7462	2 mg	
			SBbo23290	2 mg	
Grupo III	Controle	41, 28, 22, 46	Água milli q	5 mL	SC
Grupo IV	Grupo IV	45, 29, 20, 23	Água milli q	2 mL	SC

Via de aplicação (VA); Subcutânea (SC).

3.4. Desafio.

O desafio com carrapatos foi realizado 30 dias após a 3^a inoculação e com *B. bovis* no dia 35 após a 3^a inoculação. Para o desafio com carrapatos utilizaram-se larvas de *R. (B.) microplus* cepa livre de parasitas (UFRGS) de Porto Alegre-RG. As alíquotas eram constituídas por ± 2000 larvas, que foram mantidas em seringas de 5 ml em estufa BOD a 28° C e 80 % de umidade relativa.

Cada animal foi desafiado com um total de ± 4000 larvas/dia que foram colocadas, a cada 24 horas, nas regiões do peito e barbela, entre os membros anteriores e posteriores, dorso e região perianal, durante o início da manhã. Colocaram-se cabrestos e as caudas

² Saponina 5012 sample No SOSO8064 Quantity 100 g (Kerry Bio- Science) Ireland.

foram amarradas durante 6 horas para evitar a perda das larvas. Para a coleta das fêmeas ingurgitadas (teleóginas), procedeu-se ao recolhimento das amostras às 9:00 horas e às 16:00 horas de todos os animais durante todo o período do desafio.

No 35^o dia, após a terceira imunização, todos os animais dos 4 Grupos foram inoculados com a cepa de *B. bovis* UFV1-9^a passagem, mantida sob crio preservação em nitrogênio líquido no LBCH/BIOAGRO a qual foi diluída a uma concentração de 1×10^6 Babesias/mL e inoculada via intravenosa.

3.5 Avaliação dos parâmetros biológicos dos carrapatos.

3.5.1. Estimativa do número de carrapatos.

Semanalmente, a partir do 14^o dia após o desafio foi realizada a contagem de carrapatos em todos os animais, os quais foram colocados em brete de contenção. A contagem foi feita em um antímero e o valor resultante foi multiplicado por dois (MORA H *et al.*, 1988). A contagem foi realizada até o início do desprendimento das teleóginas.

Além disso, foi feita a coleta manual de todas as teleóginas que se desprenderam naturalmente dos animais e aquelas que foram encontradas no chão e nos cochos. A coleta sempre foi iniciada antes da limpeza diária das baias. Foram feitas três coletas durante a manhã e uma quarta coleta no início da tarde. A coleta terminou quando não havia mais carrapatos para se desprender.

3.5.2. Ovoposição

As fêmeas coletadas a cada dia foram pesadas individualmente em balança de precisão e acondicionadas cada uma em placas de cultura de 24 poços. As teleóginas foram colocadas em estufa B.O.D., a 28 °C e 80 % de umidade relativa para postura durante 15 dias. Logo depois, foi realizada a pesagem dos ovos, seguindo as técnicas preconizadas por MASSARD *et. al.*, (1995).

3.5.3. Fórmulas para avaliação dos parâmetros biológicos relacionados com os carrapatos (DE LA FUENTE, 1995)

DT (%) = 100 [1-(NTV/NTC)] DT(%) = % de redução do número de teleóginas NTV = N° teleóginas para cada grupo vacinal NTC = N° teleóginas para cada grupo Controle
DO(%) = 100 [1-(PMOV/PMOC)] DO(%) = % redução do peso médio dos ovos PMOV = Peso médio dos ovos para cada grupo vacinal PMOC = Peso médio dos ovos grupo Controle
DR(%) = 100 [1 - (PMTV/PMTC)] DR (%) = Porcentagem de redução do peso médio das teleóginas. PMTV = Peso médio das teleóginas para cada grupo vacinal PMTC = peso médio das teleóginas grupo Controle
DF(%) = 100 [1 - PPLOV/PPLOC] DF (%) – redução na fertilidade dos ovos PPLOV – peso médio das larvas por grama de ovos em cada grupo vacinal PPLOC = Peso médio larvas/ grama de ovos no grupo Controle.
EF (%) = 100 [CRTxCROxCRF] EF(%) – Eficácia do imunógeno CRT – Redução no numero de fêmeas adultas CRO – Redução na captura de ovipostura CRF – Redução na fertilidade

3.6. ELISA.

3.6.1 Mensuração de IgGTotal com alta afinidade pelo peptídeo SBm7462

A resposta imunológica de IgG total, IgG1 e IgG2 foi avaliada mediante o teste imunoenzimático de ELISA. As placas MaxSorp Nunc® foram sensibilizadas a 4°C com peptídeo sintético SBm7462 (2 ug/poço) durante 18 horas, o qual foi diluído em 1mL de água milli q sendo depois sônico (Gerador ultrasônico Lab-Line® modelo 9100) a 20

watts durante 5 segundos, até se obter uma amostra homogênea e posteriormente foi diluída em Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159 g de NaCl; 0,293 g de NaHCO₃ e água destilada q.s.p. 100 mL).

Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0g NaCl; 500µl de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1000 ml), e bloqueadas com solução de caseína 2 % diluída em PBS pH 7,6 (8,5g de NaCl; 1,28g de Na₂HPO₄; 0,16 g de NaH₂PO₄.2H₂O e água destilada q.s.p. 1000 mL) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Repetiram-se as lavagens e adicionaram-se os soros dos animais diluídos 1:400 em Tampão de incubação (100 ml de PBS pH 7,6; caseína 0,25 % e Tween 20 a 0,05%) por duplicata.

Após incubação de 2 horas a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com Tampão de lavagem e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário, IgG de coelho anti IgG bovina marcado com peroxidase, o qual foi diluído 1:20000 (SIGMA) em Tampão de incubação. As placas foram mantidas á temperatura ambiente por 2 horas e logo após se realizaram 6 lavagens com tampão de Lavagem. Para a revelação do teste adicionou-se o substrato composto de uma solução contendo 4mg de OPD (-) fenildiaminobenzeno, 2,5µl de H₂O₂ e 20ml de Tampão de Substrato pH 5,0 (7,19g de Na₂HPO₄; 5,19g de ácido cítrico e água destilada q.s.p. 1000 ml) e incubou-se na ausência de luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 30µL de ácido sulfúrico 1:20/poço e as placas foram lidas imediatamente em leitor de ELISA (Titertek Multiskan[®]PLUS), a um comprimento de onda de 492 nm.

3.6.2. Mensuração da resposta imune humoral IgG1 e IgG2, com alta afinidade pelo peptídeo SBm7462

A cinética de produção de IgG1 e IgG2 foi avaliada através do teste de ELISA desenvolvido pela BETHYL Laboratórios, de acordo com técnica recomendada pelo fabricante. Os testes foram realizados em duplicatas.

A sensibilização das placas foi feita para SBm7462 com 2 µg/poço diluído em água milli q, sendo depois sônico (Gerador ultrasônico Lab-Line[®] modelo 9100) a 20 watts durante 5 segundos, até se obter uma amostra homogênea e posteriormente foi diluída em tampão de cobertura pH 9.6 (0.53g Na₂CO₃, 100 mL de H₂O).

Uma vez sensibilizadas as placas Max Sorp Nunc[®] estas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem [(6.055g de Tris (Trizma)[®]SIGMA; 8,18g NaCl; 500ul de Tween 20; 1000 mL de água milli q 200 µL/poço)]. Posteriormente, foi feito o bloqueio com tampão de lavagem (Idem tampão solução de bloqueio) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Depois de lavar mais três vezes com tampão de lavagem, adicionaram-se os soros dos animais diluídos 1:400 em tampão de diluição (Idem tampão de lavagem) e incubados por uma hora a temperatura ambiente, logo após lavando mas duas vezes com tampão de lavagem.

Na identificação de IgG1 e IgG2 com alta afinidade pelo peptídeo SBm7462 foi utilizado o conjugado ovelha anti IgG1 e anti IgG2 bovina marcado com peroxidase [(BETHYL, diluídos 1:30000 em tampão de incubação (idem tampão de lavagem)].

Depois de incubar por 60 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lavadas mais três vezes e incubadas por um período de 30 minutos na ausência de luz a temperatura de 28 °C com solução reveladora (4mg de OPD. θ-fenildiaminabenzeno, 2,5µl de H₂O₂ e 20mL de tampão de substrato pH 5.0).

Finalmente a reação foi interrompida com 30µl de H₂SO₄ 3M/poço e as placas foram imediatamente lidas em leitor de ELISA (Titertek Multiskan[®]PLUS), a um comprimento de onda de 492 nm.

3.7. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e posteriormente a análise de variância. Com os resultados significantes foi realizado o teste de Duncan e Test t student.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos parâmetros biológicos, considerando os valores de: número de teleóginas desprendidas (DT%); redução do peso das fêmeas (DR%), redução do peso dos ovos (DO%) e fertilidade (DF%) (Tabela. 2), se encontrou que a eficácia (EF) do tratamento realizado no Grupo I foi de -32.90% e de 46,80% para o Grupo II, com efeitos perceptíveis dos imunógenos sobre a ovoposição e o metabolismo do carrapato (Figuras 1D, 1E).

Comparando os valores de EF do Grupo I com os trabalhos de PATARROYO *et al.*, (2002) e COUTO, (2002), que avaliaram apenas o peptídeo SBm7462, encontraram eficácia de 81.05% e 50.86%, respectivamente, diferentemente do que foi constatado no presente trabalho, já que nos animais do Grupo I não houve eficácia significativa no controle do carrapato *R. (B.) microplus*, provavelmente por competição intraclonal dos imunógenos.

O alto número de carrapatos que foram encontrados nos animais do Grupo I parece estar relacionado à susceptibilidade ao carrapato *R. (B.) microplus*, o que segundo STEAR *et al.* (1989); HUGHES & YAGER (1998) e ELLIS (2004) é uma característica determinada pelo polimorfismo dos genes que codificam o Complexo Maior de Histocompatibilidade, existindo variações primordiais entre raças e populações na apresentação de antígenos e bem como na comunicação entre células do sistema imune.

No caso do Grupo II, sua eficácia (46.80 %) foi menor que aquela obtida por PATARROYO *et al.* (2002), porém foi maior que o constatado (10.58%) por COUTO (2002) quando testou SBm7462 usando dose de 1mg do peptídeo.

Tabela 2. Parâmetros biológicos nas populações de carrapatos *R. (B.) microplus* nos Grupos I, II e IV em relação ao Grupo III.

Parâmetros Biológicos	GRUPOS			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Numero de carrapatos	406 ^b	189 ^c	282 ^a	260 ^a
Peso médio teleóginas (g)	0.2690 ^a	0.2543 ^b	0.2621 ^a	0,2601 ^a
Peso médio ovoposição (g)	0.1069 ^b	0.1002 ^b	0.1097 ^a	0,1136 ^a
Peso Larvas/grama ovos (g)	0.6323 ^b	0.5723 ^c	0.6674 ^a	0,65268 ^a
Redução peso teleóginas (DR)	-2.6215 ^a	2.9776 ^b		
Redução peso ovos (DO)	2.552 ^a	8.863 ^b		
Redução teleóginas (DT)	-29.71 ^a	32.98 ^b		
Redução fertilidade (DF)	5.270 ^a	14.249 ^b		
Eficácia (EF)	-32.90 ^a	46.80 ^b		

As letras diferentes (a,b,c) indicam diferença significativa entre as colunas (tratamentos) ($p < 0,01$). Eficácia (%) = $100 [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$. CRT: Redução de fêmeas ingurgitadas; CRO Redução da capacidade de emulsão dos ovos; CRF: Redução da fertilidade.

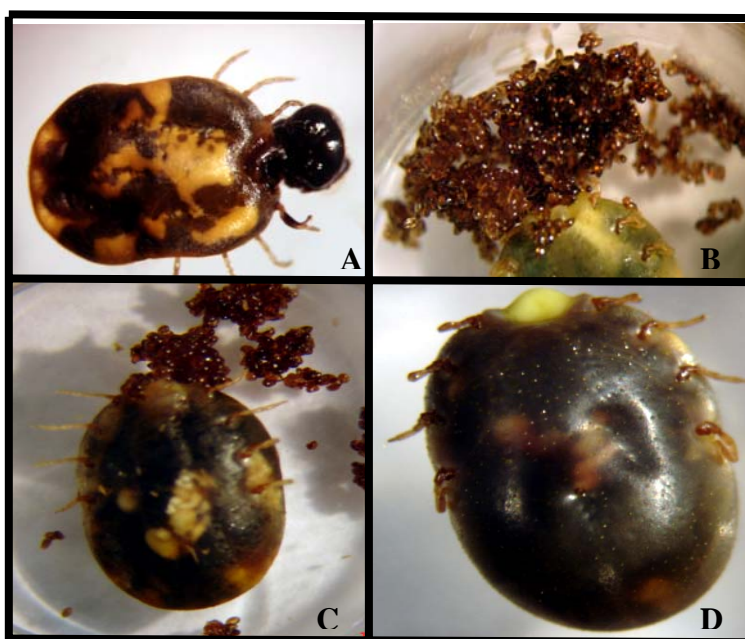


Figura 1. Efeito das vacinas sobre as populações de carrapatos. Carrapatos do Grupo II. A e D: Não apresentando ovoposição. D: Carrapato de cor negra indica alteração nas funções metabólicas, apresentando hemorragia. B e C: observa-se ovos escuros, secos e inviáveis, perda de vitelogenina.

Os títulos de anticorpos IgG anti-SBm7462 nos animais dos Grupos I e II aumentaram a partir da 4ª semana após a primeira imunização (Figura 2.) com títulos no Grupo I, na 8ª e 11ª semana de 1.75 ± 0.1849 e 1.98 ± 0.07054 , diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação ao Grupo II o qual apresentou nessa mesma semana títulos de 1.1306 ± 0.2819 e 1.34 ± 0.2936 , respectivamente.

A cinética de IgG1 anti-SBm7462 nos animais do Grupo I mostra um aumento na 6ª e 10ª semanas com níveis de 0.602 ± 0.1180 e $0,558 \pm 0,1624$, respectivamente, diminuindo após o desafio. Nos animais do Grupo II os títulos de IgG1 específicos para SBm7462 foram baixos durante todo o experimento com uma média geral de 0.1 ± 0.0262 , sem diferenças significativas com os Grupos III e IV (Figuras 3 e 4).

A presença de IgG2 específica para o peptídeo SBm7462 não foi evidente durante todo o experimento (Figuras 4 e 5).

Ao se comparar os parâmetros biológicos encontrados com o nível de anticorpos presentes constata-se que os animais do Grupo I apresentaram altos títulos de IgG total e níveis de IgG1 anti-SBm7462, porém efetividade baixa. O anterior difere com os dados obtidos no Grupo II onde se tem altos títulos de IgG total e baixos níveis de IgG1 com uma efetividade de 46.80 % (Figura 5).

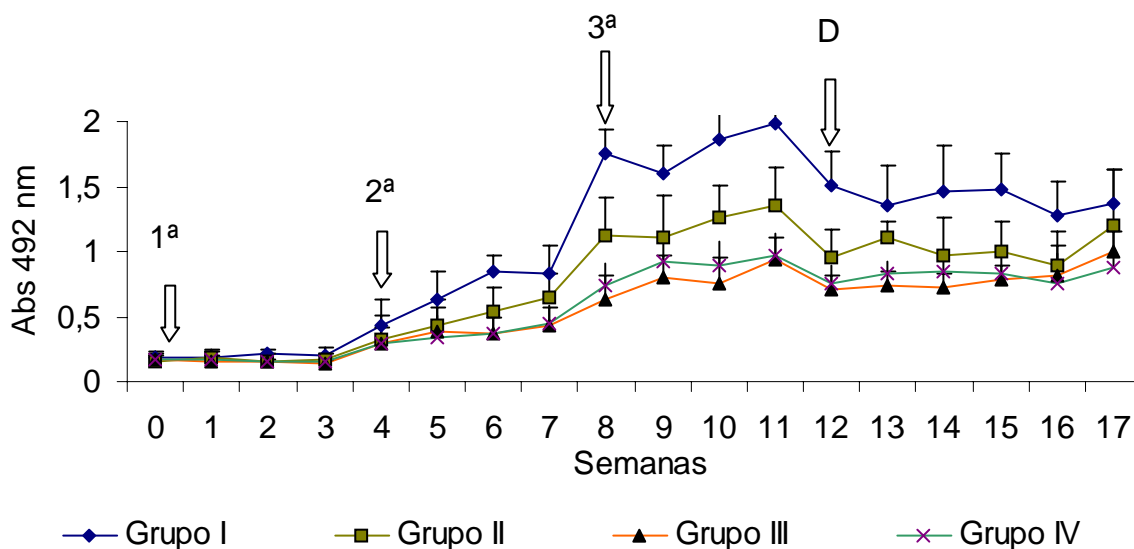


Figura 2. Cinética da produção de IgGs, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados, Grupo III e IV. As barras em T representam os desvios padrões para mais As setas correspondem as imunizações e dia de desafio (D).

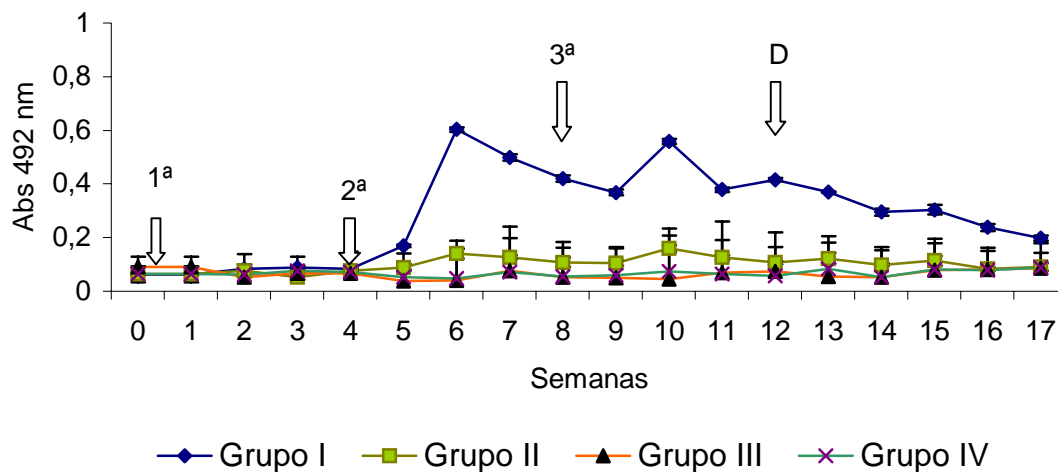


Figura 3. Cinética da produção de IgG1, média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados, Grupo III e IV. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio (D). As barras em T representam os desvios padrões para mais.

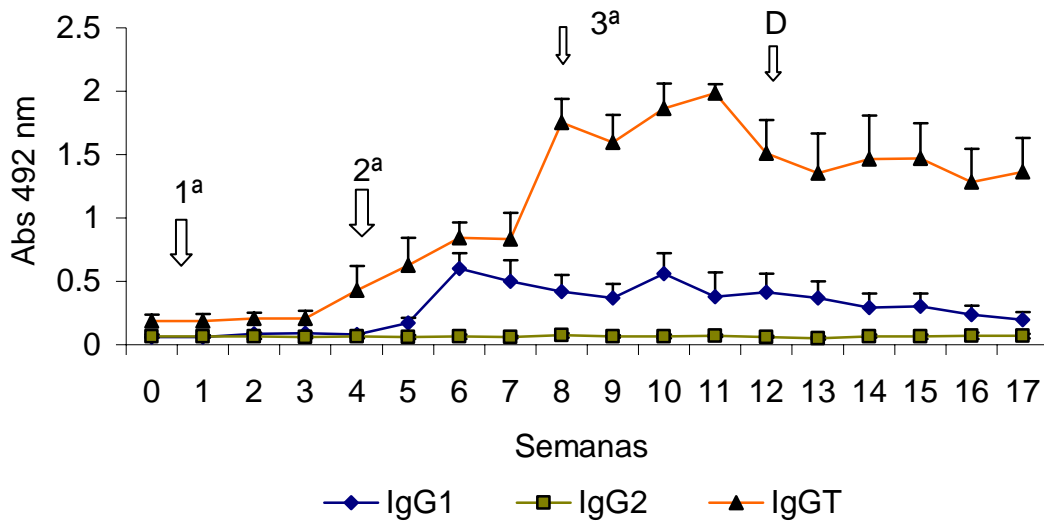


Figura 4. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgG Total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados com Grupo I. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio. As barras em T representam os desvios padrões para mais.

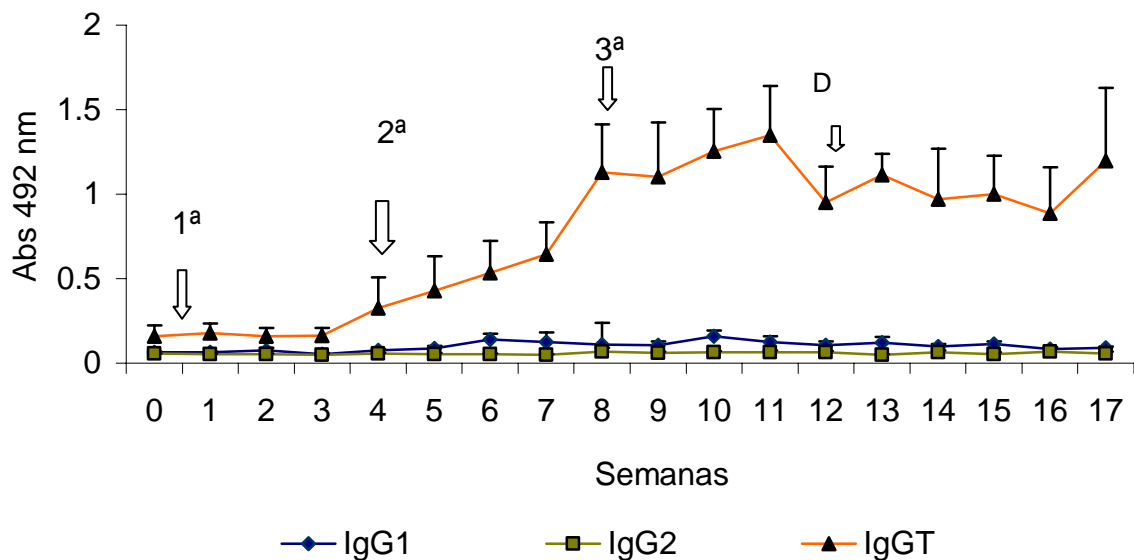


Figura 5. Cinética da produção de IgG1, IgG2, IgG Total. Média das absorvâncias de IgGs antígeno - específicos para SBm7462 em animais imunizados com Grupo II. As setas correspondem as imunizações e dia de desafio. As barras em T representam os desvios padrões para mais. As setas indicam as inoculações e a letra (D) o tempo de desafio.

Os níveis de anticorpos IgG total anti-SBm7462 nos animais do Grupo I foram maiores que no Grupo II, especialmente na 10ª e 11ª semana após a terceira imunização, concordando com os trabalhos de PATARROYO *et al.* (2000). Estes resultados também são similares aos obtidos por PATARROYO *et al.* (2002) e GONZÁLES (2003) nos quais o pico de produção de IgG total para o mesmo peptídeo aconteceu após a terceira imunização.

Estes níveis altos de anticorpos indicam resposta imune secundária (Figura 1). Portanto, pode-se inferir que no Grupo II existe uma relação direta entre o nível de anticorpos IgG total e a efetividade no controle do carrapato, coincidindo com outros trabalhos que testaram o peptídeo SBm7462 sozinho (PATARROYO *et al.*, 2002; SALES-JUNIOR *et al.*, 2005), mas diferindo do Grupo I, onde não apresentou-se relação entre o nível de anticorpos totais e a proteção contra o carrapato.

A efetividade no controle do carrapato observada nos animais do Grupo II, provavelmente, foi determinada por processos de competição intraclonal tanto de células B e T após apresentação por células apresentadoras de antígeno ao incorporar SBbo23290 e SBm7462 interagindo simultaneamente. Estou concorda com o que foi descrito por CREUSOT *et al.*, (2003), quando afirmam que no caso de apresentação de dois antígenos por células dendríticas similares ou diferentes pode haver cooperação ou competição entre duas populações de células TCD4+.

No trabalho realizado por OLIVEIRA, (2006), testando esses mesmos imunógenos na forma monovalente e polivalente (dados não publicados), encontrou que a população predominante foi de células TCD4⁺ sobre CD8⁺ confirmando que a competição intraclonal esteve determinada por células TCD4⁺ de acordo ao relatado por SMITH *et al.* (2000); LAOUAR *et al.* (2000) e também por células B (HERMANN *et al.*, 2006). É possível que a competição foi por maior afinidade com o peptídeo SBbo23290 “habilidade hierárquica” (ANDERTON E WRAITH; 1998), devido a maior dificuldade ao processar SBm7462.

Então, sugere-se que a melhor apresentação do peptídeo SBbo23290 sobre SBm7462 pode estar associada ao grau de solubilidade mais que à dose antigênica, semelhante ao modelo descrito por CREUSOT *et al.* (2003) em que antígenos eram excluídos da rede de células dendríticas foliculares dos linfonodos em benefício de células T antígeno-específicas.

O anterior pode explicar os menores níveis de anticorpos IgG total específicos para o peptídeo SBbo7462 obtidos nos animais do Grupo II em comparação ao Grupo I,

levando à produção de IgG1.1 específicas para o peptídeo SBbo23290 com pontos de ligação IgG1.2 anti SBm7462.

Finalmente, ainda considerando os níveis de resistência a *R. (B.) microplus* e baixo nível de anticorpos IgG1 antígeno-específico para SBm7462 apresenta-se um marcado efeito do peptídeo no Grupo II que indica talvez respostas cruzadas após competição clonal (IgGT e IgG1 SBbo23290-SBm 7462).

Ainda, considerando o modelo de CREUSOT *et al.* (2003) (Figura. 6) tem-se que durante a competição por sítios antigênicos as células dendríticas favorecem a competição intraclonal sobre a competição interclones.

Então, uma vez as células dendríticas expressam no caso do Grupo II, dois peptídeos diferentes SBbo23290 e SBm7462, esta sinapse estaria com um excesso de células T TCR-Tg específicas para SBbo23290, onde complexos MHC–SBm7462 poderiam estar confinados a uma pequena e localizada área da superfície das células dendríticas. Sob estas circunstâncias, células T endógenas específicas poderiam ter acesso a esses compartimentos restritos sobre as células dendríticas permitindo maior afinidade por um dos peptídeos.

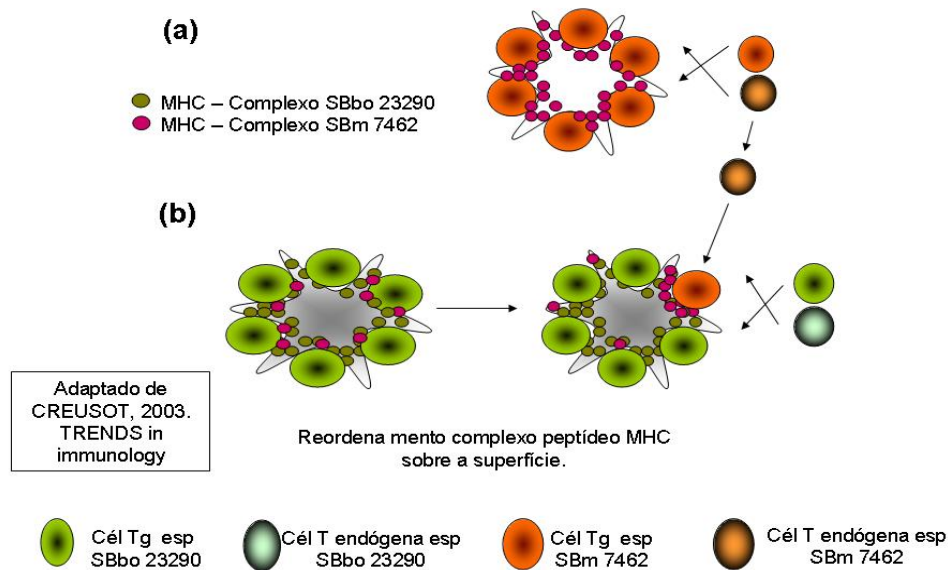


Figura 6 a. Em condição de limitado numero de células dendríticas, a competição intraclonal esta caracterizada por uma reduzida expansão clonal, notavelmente a alta freqüência de células TCR-Tg também inibe a ativação de células T endógenas. b.Células dendríticas expressando dois antígenos ou mais, estas são rodeadas por células T, complexos peptídeo MHC então reordenar-se sobre sua superfície, resultando em áreas de ótima sinapses, sítios onde clones de células T de diferente especificidade podem ligar-se.

5. CONCLUSOES

Respostas cruzadas determinadas por competições intraclonais determinaram o efeito imunológico dos Grupos I e II em detrimento da eficácia protetora do peptídeo SBm 74622 no controle do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

O Grupo II apresentou uma maior redução no número das teleóginas (DT) 32.98%, diminuição na fertilidade (DF) de 14.24% e uma eficácia final (EF) de 46.80%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERTON, S.M; WRAITH, D.C., 1998. Hierachy in the ability of Tcell epitopes to induce peripheral tolerance to antigens from myelin, **Eur.J.Immunol.** 28, 1251,1261.

ANDERTON, S.M; WRAITH, D.C., 1998. Hierachy in the ability of Tcell epitopes to induce peripheral tolerance to antigens from myelin, **Eur.J.Immunol.** 28, 1251,1261.

BARKER, S.C; MURRELL, A., 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Exp Appl Acarol.** 28(1-4):55-68.

CORDOVÉS, C., 1997. Carrapato: Controle ou erradicação. **Guaíba: Agropecuária. Brasil.** 176p

COUTO, P.J.A., 2002. **Vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e campo.** Dissertação de mestrado. Viçosa: UFV, 77p.

CREUSOT, R.J; *et al.*,2003. Local cooperation dominates over competition between CD4⁺ T cells of different antigen/MHC specificity. **J. Immunol.**, 171, 240–246.

DE LA FUENTE, J; RODRIGUEZ, M; FRAGOSO, H., 1995. Efficacy of vaccination with GavacTM in the control of *Boophilus microplus*. In: DE LA FUENTE. Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick. **Habana: Elpos Scientiae**, p. 177-186.

DUFFY, D; PING, Y.C; HEATH A, *et al.*,2006. Naïve T –cell receptor transgenic T cell help memory B cells produce antibody. **Immunology**, 119, 376-384.

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

FURLONG, J., 1998. **Carrapato dos bovinos:** Conheça bem para controlar melhor. Circular Técnica Embrapa. 46p

GARCIA, V.Z., 1991. Avances en el conocimiento de la epidemiología de la Babesiosis. **Segundo seminario Internacional de Parasitologia Animal.** Garrapatas y enfermedades transmitidas. 9-11 octubre. Oaxtepec. Morelos, 172-179.

GONZÁLEZ, L.C.Z., 2003. **Controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462.** Dissertação de mestrado. Viçosa: UFV. 74p.

GRISI, L; MASSARD, C.L; MOYA B.G.E; PEREIRA, J.B., 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**, Porto Alegre 21,8-10.

- HERMAN, M.E.M; MAINI, P.K; IBER, D., 2006. An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centres. **Mathematical Medicine and Biology**, 23, 255-277
- HERMAN, M.E.M; MAINI, P.K; IBER, D., 2006. An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centres. **Mathematical Medicine and Biology**, 23, 255-277
- HITCHCOCK, L.F., 1955a. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). **Aust. J. Zool.**, 3, 295-311.
- HUGHES, A.L; YEAGER, M., 1998. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annu Rev Genet**, 32, 415-435.
- HUGHES, A.L; YEAGER, M., 1998. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annu Rev Genet**, 32, 415-435.
- KEDL, R.M. *et al.*, 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. **J. Exp. Med.** 192, 1105–1113
- KEMP, D.H; PEARSON, R.D; GOUGH, J.M; WILLADSEN, P., 1989. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on ticks gut cells and their interaction with the host immune system. **Exp. Appl. Acarol.** 7, 43-58.
- LAOUAR, Y; CRISPE, I.N., 2000. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4 β T cell proliferation and effector function in vivo. **Immunity**, 13, 291–301.
- LEE W.T, VITETTA E.S., 1999. Virgin T cells do not provide help for antigen – specific B cells in the absence of IL-4, IL-5, and IL-6. **Int Immunol.** 3, 907-916.
- LEMOS, A.M.A., 1986. **Resistência genética dos bovinos e Controle do carrapato.** EMBRAPA –CNPGL, Documentos, 6, 42p.
- LI, A.Y; DAVEY R.B; MILLER, R.J; GEORGE, J.E., 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, 37: 183–198.
- LONDT, J.G.H., 1974. The peroviposition period of *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) (Acarina: Ixodidae). **J. Ent. Soc. Sth. Afr.** 37, 405-412.
- MACLENNAN, I; DE VINUESA, C.G; CASAMAYOR – PARELLA, M. 2000., B-cell memory and the persistence of antibody responses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **Biol. Sci**; 355, 345-350.
- MASSARD, C.L; FONSECA, A.H; BITTENCOURT, V.R.E.P; SILVA, K.M.M., 1995. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm “GAVACTM” contra carrapato *B microplus* no Brasil. **Ver. Brás. Méd. Vet.** 17, 167-173.
- MORA, H.C.A; MASSARD, C.L; FONSECA, A.H; SOARES, C.O; COSTA, F.A, 1998. Avaliação da infestação de carrapatos a campo em bovinos vacinados com o imunógeno recombinante Bm86. **R. Bra. Méd.Vet.**, 20, 4, 156 -168.

MURRELL, A, BARKER, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst Parasitol.** 56, 169-72.

NUTTALL, P.A; TRIMNELL, A.R; KAZIMIROVA M; LABUDA, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.*, 4,155-63.

OLIVEIRA, D.C. P., 2006. **Mensuração da resposta imune celular em bovinos, dos imúgenos sintéticos *Babesia bovis* Sbbo 23290 e *Boophilus microplus* SBm 7462, e de um imunógeno polivalente composto pelos dois (Sbbo 23290 - SBm 7462), pela aplicação simultânea.** Dissertação de mestrado. Viçosa: UFV. sp.

PATARROYO, J.H, PORTELA, R.W; DE CASTRO DE R.O; COUTO, P.J; GUZMAN, F; PATARROYO, M.E; VARGAS, M.I; PRATES, A.A; MENDES D.M.A., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 88, 163–172.

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

PATARROYO, J.H; SOSSAI, S., 2004. Alternativa para o Controle de carrapatos: vacinas e medicamentos. **IV Simposio de gado de corte.** 10 – 12 de junho – Viçosa – MG.Brasil.

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

RECHAV, Y., 1992. Naturally acquired resistance to ticks – a global view. **Insect Sci. Appl.**, 13: 495-504.

RIEK, R.F., 1965. The cattle tick and tick fever. **Aust. Vet. J.**, 41, 211-215.

SALES – JUNIOR PA; GUZMAN, F; VARGAS MI; SOSSAI S; PATARROYO V AM; GONZALES CZL; PATARROYO JH., 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**,107, 3-4.

SMITH, A.L. *et al.*, 2000. Visualizing T cell competition for peptide– MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. **Immunity.**, 13, 783–794.

SOLORIO, R.J; SOLORIO, V.R.I; RODRÍGUEZ, G.E. *et al.*,1999. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatan, Mexico **Prev. Vet. Med.**, 40, 261–269.

SOSSAI, S; PECONICK, A.P; SALES, J.P.A; MARCELINO, F.C; VARGAS, M.I; NEVES, E.S; PATARROYO, J.H., 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South

American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology.**, 37: 199-214

STEAR, M. J; NICHOLAS, F.W; BROWN, S.C., 1989. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* assessed in three different seasons. **Vet. Parasitol.**, 31, 303-315.

STEAR, M. J; NICHOLAS, F.W; BROWN, S.C., 1989. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* assessed in three different seasons. **Vet. Parasitol.**, 31, 303-315.

TUNIN, P.K., 2004. Mapeamento de QTL para características de resistência a carrapato, peso ao nascimento e peso a desmama no cromossomo 23 de bovinos da geração F2, cruzamento Holandês x Gir. Teses de dissertação para o título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: **Ciência Animal e Pastagens**. Piracicaba Estado de São Paulo – Brasil. 62 p

WHARTON, R. H., UTECH, K. B. W., TURNER, R. W., 1971. Tick resistance cattle for the control of *Boophilus microplus*. INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY. Proceedings. **Praga.**, 697-700.

WRIGHT, I.G; RIDDLES, P.W., 1989. Biotechnology in tick born diseases. Present status, future perspectives. FAO – UN **Biotechnology for Livestock Production Plenum.**, New York. 325 -240.

YANG, C.P; SPARSHOTT, S.M; DUFFY, D; GARSIDE, P; BELL, E.B., 2006. The phenotype and survival of antigen-stimulated transgenic CD4 Tcells in vivo: the influence of persisting antigen. **International immunology.**, 18, 515-523.