

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA LEUCOCITÁRIA SANGÜÍNEA EM BOVINOS
APÓS A APLICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS IMUNÓGENOS SINTÉTICOS
ANTI-*Babesia bovis* (SBbo23290) E ANTI-*Ripicephalus (Boophilus)*
microplus (SBm7462)**

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

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48a
2006

Oliveira, Diogo Coelho de Pádua, 1978-
Avaliação da cinética leucocitária sanguínea em
bovinos após a aplicação simultânea dos imunógenos
sintéticos anti-*Babesia bovis* (SBbo23290) e anti-
Ripicephalus (Boophilus) microplus (SBm7462) / Diogo
Coelho de Pádua Oliveira. – Viçosa, MG, 2006.
xv, 93f. : il. col. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 82-93.

1. Bovino - Imunologia. 2. Bovino - Parasito. 3.
Babesiose - Vacina. 4. Leucócitos. 5. Carrapato.
6. *Ripicephalus microplus*. 7. *Babesia bovis*.
8. Imunologia veterinária. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.208960795

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA LEUCOCITÁRIA SANGÜÍNEA EM BOVINOS
APÓS A APLICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS IMUNÓGENOS SINTÉTICOS
ANTI-*Babesia bovis* (SBbo 23290) E ANTI-*Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus SBm 7462.**

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: 15 de dezembro de 2006.



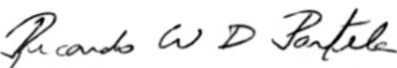
Profa. Maria Aparecida S. Moreira



Profa. Mariléia Chaves Andrade



Dra. Braúlia Costa Caetano



Prof. Ricardo Wagner Dias Portela



Prof. Joaquin Hernán Patarro Salcedo
(Orientador)

Dedico este trabalho a todas
as pessoas que significam
muito para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu companheiro mais certo nas horas incertas. Por enviar essa grande oportunidade para minha vida. A Jesus por me dar a inspiração que preciso para fazer o bem.

Ao meus pais José Antônio e Maria Célia agradeço por todo o carinho.

Aos meus irmãos Daniel e Gabriel, obrigado pela ajuda nas horas difíceis.

Aos professores Dr. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Dra. Marlene Isabel Vargas Vilória muito obrigado pelos ensinamentos científicos e pela amizade que levo para a vida toda.

Ao Dr. Ricardo Portela por acreditar em mim e pelo suporte técnico. À Dra. Bráulia Caetano, muito obrigado pela torcida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia aplicado à agropecuária (BIOAGRO) pela infra-estrutura e suporte técnico.

À CAPES por ajudar no suporte financeiro com a minha bolsa de mestrado.

À FAPEMIG que contribuiu com o suporte financeiro para o presente estudo.

A contribuição do povo Brasileiro por tornar meu sonho realidade.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho por disponibilizar o seu laboratório e pela ajuda técnica. A todos os amigos do laboratório de Doença de Chagas (LADOC) e em especial a Ana Paula Vieira Marciano pela ajuda incalculável e amizade.

À Dra. Andréa Texeira, Dra. Mariléia Chaves e Dra. Vanessa Peruhype pelo suporte técnico-científico, pelos conselhos e orientações.

Aos amigos do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) pelos momentos agradáveis especialmente ao Alysson e ao Bruno.

Ao "Dr". Marcio Mendes por suas valiosas ajudas e pela amizade.

Ao "Cauzinho" por cuidar dos animais durante todo o experimento.

Aos amigos do laboratório de Biologia e controle de hematozoários e vetores (LBCH-V) em especial a Anna Paula, Bruna, Carlos Henrique, Hugo, Javier, Luana, Sandra, Sidmar e Rômulo por me ajudarem diretamente na construção deste trabalho tornando-o com uma qualidade técnica muito melhor.

Aos amigos da faculdade de que tenho saudades pelo companheirismo e amizade.

A Fernanda Fortes de Araújo por ser minha companheira, pela ajuda científica, por me passar tranquilidade nas horas mais difíceis, por me ajudar sempre que eu precisei e principalmente por me ensinar a ser um profissional cada dia melhor.

Ninguém chega a lugar nenhum sozinho. Toda essa imensa solidariedade que me foi dada e que me ajudou muito a finalizar este trabalho espero retribuir ajudando a transformar o nosso país em um Brasil melhor.

Enfim, muito obrigado a todos!!!

BIOGRAFIA

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA, filho de José Antônio de Pádua Oliveira e Maria Célia Coelho de Pádua Oliveira, nasceu aos vinte dias do mês de Maio do ano de 1978, na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental, em 1994, no “Colégio Roma” e o ensino médio em 1997 no “Colégio Municipal Marconi”, ambos em Belo Horizonte.

Em Fevereiro 1998 ingressou no curso de Ciências Biológicas, pela “Faculdades Metodistas Integradas Izabela Hendrix-FAMIH”. Em Julho de 1999 desligou-se da FAMIH e ingressou no curso de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais onde foi finalizado em Julho de 2003. Iniciou-se na pesquisa em Setembro de 2000 onde estagiou voluntariamente no laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais coordenado pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli.

Em Março de 2002, foi selecionado para o programa de Iniciação Científica PIBIC/FAPEMIG no Centro de Pesquisas René Rachou, com o projeto “Efeito da Ativação de Toll-Like-Receptor-2 (TLR-2) e de Interações de Receptores da Família Toll em Infecção por *Trypanosoma cruzi*” onde foi orientado pelo Dr. Marco Antônio da Silva Campos e co-orientado pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli.

Em Fevereiro de 2004 foi contratado como Biólogo da Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa, onde se demitiu em Julho de 2004 para ingressar no programa de pós-graduação do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçoso na modalidade Mestrado.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS-----	viii
LISTA DE FIGURAS-----	x
LISTA DE TABELAS-----	xiii
RESUMO-----	xiv
ABSTRACT-----	xv
1. INTRODUÇÃO-----	1
2. OBJETIVOS-----	3
2.1 Objetivo geral-----	3
2.2 Objetivos específicos-----	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	4
3.1 <i>Ripicephalus (Boophilus) microplus</i> -----	4
3.2 <i>Babesia bovis</i> -----	5
3.3 Recirculação de linfócitos-----	6
3.4 Resposta imune contra <i>Babesia bovis</i> -----	8
3.5 Resposta imune contra <i>Ripicephalus (Boophilus) microplus</i> -----	12
3.6 Resposta imune em tecido linfóide-----	14
3.7 Adjuvantes-----	15
3.8 saponina-----	16
3.9 Vacinação-----	16
3.10 Peptídeos sintéticos-----	17
3.11 Peptídeo SBbo 23290-----	18
3.12 Peptídeo SBm 7462-----	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS-----	21
4.1 Local de realização do experimento-----	21
4.2 Animais-----	21
4.3 Grupo de Experimentação-----	22
4.4 Desafio-----	23
4.4.1 Desafio com <i>Ripicephalus (Boophilus) microplus</i> -----	23
4.4.2 Desafio com <i>Babesia bovis</i> -----	23
4.5 Isolamento e estimulação de linfócitos de sangue periférico(PBL) -----	23

4.6 Estimulação de (PBMC) bovino-----	28
4.7 Dosagem de IL-4 através do teste de ELISA-----	29
4.8 Análise estatística-----	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	31
5.1 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , T WC1 ⁺ e B CD21 ⁺ em sangue periférico de bovinos-----	31
5.1.1 Linfócitos periféricos T CD4 ⁺ -----	31
5.1.2 Linfócitos periféricos T CD8 ⁺ -----	36
5.1.3 Linfócitos periféricos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ -----	40
5.1.4 Linfócitos periféricos B CD21 ⁺ -----	43
5.1.5 Imunofenotipagem da soma dos linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e T WC1 ⁺ (T Total)-----	48
5.1.6 Células não T e não B (NTNB) do sangue periférico de bovinos-----	50
5.1.7 Média do Percentual da razão de T CD4 ⁺ /T CD8 ⁺ -----	53
5.1.8 Percentual médio da razão de T/B-----	57
5.2 Avaliação da produção da citocina IL-4 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC)-----	60
6. CONCLUSÕES-----	64
7. ANEXOS-----	65
7.1 Comparação de cada grupo de bovinos em diferentes coleta (Tempo) do sangue periférico-----	66
7.2 Comparação entre todos os grupos de bovinos na mesma coleta (Tempo) de sangue periférico-----	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	Acetato Tris-Amônia
APC	Célula apresentadora de antígeno
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
Bm86	Proteína do intestino médio de <i>Boophilus microplus</i>
CD	Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
CD40L	Ligante de CD40
CGs	Centros Germinais
Com-A	Concanavalina A
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DMEM	Meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfóxido
DVT	Departamento de Veterinária
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	Tamanho (Foward Scatter)
<i>g</i>	Gravidade
HBSS	Hank Balanced Salt Solution
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IFN-g	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LADOC	Laboratório de Doença de Chagas
LBCH-V	Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NK	Células matadoras naturais
NO	Oxido Nítrico

NTNB	Células não T e não B
PBL	Linfócitos de sangue periférico
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão fosfato salino
q.s.p	Quantidade suficiente para
R	Região
Rap-1	Proteína associada a roptrias
RPMI	Meio de cultura (Rosweel Park Memorial Institute)
SBm7462	Synthetic <i>Boophilus microplus</i> 7462
SBbo 23290	Synthetic <i>Babesia bovis</i> 23290
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Granulosidade (Side Scatter)
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFRS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI	Unidades Internacionais
WC 1 ⁺	<i>Workshop cluster 1</i>

LISTA DE FIGURAS

Paginas

Figura 1: Perfil dos leucócitos periféricos bovinos (PBL)	26
Figura 2: Representação gráfica do percentual das sub-populações de linfócitos T e da população de linfócitos B de PBL bovino.....	27
Figura 3: Cinética de T CD4 ⁺	34
Figura 4: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia trinta e cinco.....	35
Figura 5: Cinética de T CD8 ⁺	38
Figura 6: Percentual de linfócitos T CD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia trinta e cinco.....	39
Figura 7: Percentual de linfócitos T CD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia noventa e oito.....	39
Figura 8: Cinética de T $\gamma\delta$ WC1 ⁺	42
Figura 9: Cinética de linfócitos B CD21 ⁺	46
Figura 10: Percentual de linfócitos B CD21 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia setenta.....	47
Figura 11: Cinética de linfócitos T totais.....	49
Figura 12: Cinética de linfócitos NTNB.....	52
Figura 13: Cinética de linfócitos T CD4 ⁺ /CD8 ⁺	55
Figura 14: Razão do percentual de linfócitos TCD4 ⁺ /TCD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia sessenta três.....	56
Figura 15: Razão do percentual de linfócitos TCD4 ⁺ /TCD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) no dia setenta.....	56
Figura 16: Cinética de linfócitos T/B.....	59
Figura 17: Dosagem da citocina IL-4 para o grupo Controle	62
Figura 18: Dosagem da citocina IL-4 para o grupo Saponina.....	62
Figura 19: Mensuração da citocina IL-4 para o grupo de animais submetidos ao Tratamento I	63
Figura 20: Mensuração da citocina IL-4 para o grupo de animais submetidos ao Tratamento II	63

Figura 21: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , T WC1 ⁺ e B CD21 ⁺ respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 4(T4).....	66
Figura 22: Média do percentual de células das populações T total, NTN ^B e das razões TCD4 ⁺ / CD8 ⁺ e T/B respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 4(T4)	67
Figura 23: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , T WC1 ⁺ e B CD21 ⁺ respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 5(T5).....	68
Figura 24: Média do percentual de células das populações T total, NTN ^B e das razões TCD4 ⁺ / CD8 ⁺ e T/B respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 5(T5).....	69
Figura 25: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , T WC1 ⁺ e B CD21 ⁺ respectivamente, no tempo 4(T4) e tempo 5(T5).....	70
Figura 26: Média do percentual de células das populações T total, NTN ^B e das razões TCD4 ⁺ / CD8 ⁺ e T/B respectivamente, no tempo 4(T4) e tempo 5(T5).....	71
Figura 27: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , B CD21 ⁺ e T WC1 ⁺ respectivamente, no tempo 1.....	72
Figura 28: Média do percentual de células das populações T total, NTN ^B e da razão T/B respectivamente, no tempo 1.....	73
Figura 29: Média do percentual de células das populações B CD21 ⁺ , T WC1 ⁺ , T total e NTN ^B respectivamente, no tempo 2.....	74
Figura 30: Média do percentual de células das razões T/B e TCD4 ⁺ /CD8 ⁺ respectivamente, no tempo 2.....	75
Figura 31: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , B CD21 ⁺ e T WC1 ⁺ respectivamente, no tempo 3.....	76
Figura 32: Média do percentual de células das populações T total, NTN ^B e da razão T/B respectivamente, no tempo 3.....	77
Figura 33: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , T WC1 ⁺ e T total respectivamente, no tempo 4.....	78
Figura 34: Média do percentual de células da população NTN ^B e da razão T/B respectivamente, no tempo 4.....	79
Figura 35: Média do percentual de células das populações T CD4 ⁺ , B CD21 ⁺ , T WC1 ⁺ e T total respectivamente, no tempo 5.....	80

Figura 36: Média do percentual de células da população NTNB e da razão T/B respectivamente, no tempo 5.....81

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Grupos de Experimentação.....	22
Tabela 2: Dias referentes à coleta de PBL e Desafio.....	24
Tabela 3: Anticorpos usados para Citometria de Fluxo.....	25
Tabela 4: Média do percentual de linfócito T CD4 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	34
Tabela 5: Média do percentual de linfócito T CD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	38
Tabela 6: Média do percentual de linfócito T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL)	42
Tabela 7- Média do percentual de linfócito B CD21 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	46
Tabela 8- Média do percentual de linfócitos T CD4 ⁺ + CD8 ⁺ + WC1 ⁺ (T total) obtidos de leucócitos do sangue periférico(PBL).....	49
Tabela 9- Média do percentual de linfócitos não T e não B (NTNB) obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	52
Tabela 10- Média do percentual da razão de T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	55
Tabela 11- Média do percentual da razão de T/B obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL).....	59

RESUMO

OLIVEIRA, Diogo Coelho de Pádua, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Avaliação da cinética leucocitária sangüínea em bovinos após a aplicação simultânea dos imunógenos sintéticos anti-*Babesia bovis* (SBbo23290) e anti-*Ripicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462).** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo.

Dezesseis bovinos pertencentes a espécie *Bos taurus taurus*, negativos sorologicamente e parasitologicamente à hemoparasitas foram divididos em quatro grupos de inoculação: grupo Controle, grupo adjuvante Saponina, grupo Tratamento I e grupo com Tratamento II. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune celular e a proteção conferida aos bovinos, pela vacinação simultânea com os imunógenos sintéticos SBm 7462 e SBbo 23290 em lados opostos (Tratamento I) e pela vacinação dos mesmos imunógenos SBm 7462 + SBbo 23290 na mesma dose (Tratamento II). Todos os animais foram inoculados três vezes, via subcutânea, com intervalos de trinta dias. O desafio foi feito 30 e 34 dias após a terceira inoculação, colocando-se 2000 larvas de *Ripicephalus Boophilus microplus*, livres de hemoparasitas, e posteriormente inoculando a cepa de *Babesia bovis* UFV1 - 9ª passagem, na concentração de 1×10^6 Babesias/mL, respectivamente. Os resultados demonstraram que, ao longo do estudo, os animais vacinados das duas formas desenvolveram uma modificação das sub-populações de linfócitos presentes no sangue periférico. Dentre as populações de linfócitos estudadas houve um maior aumento para as sub-populações de células B CD21⁺. Por meio de um estudo da cinética de produção de Interleucina-4 avaliou-se a ativação de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) cultivadas após a vacinação dos animais e previamente estimuladas juntamente com os peptídeos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462. Os resultados da produção de IL-4 apresentaram baixos níveis para os grupos Tratamento I, Tratamento II e Saponina.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Diogo Coelho de Pádua, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2006. **Avaliation of the blood lymphocytes kynetics in bovines after simultaneous application with the synthetics immunogenics anti-*Babesia bovis* (Sbbo23290) and anti-*Ripicephalus (Boophilus) microplus* (Bm7462)**. Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-Advisers: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

Sixteen bovines belonged to *Bos taurus taurus* species, serumly and parasitically negatives to hemoparasites, were divided in four groups of inoculation: Control groups, Saponine group, Treatment group I and Treatment group II. The following study had the objective to evaluate and measure the cellular immune response and the protection given to bovines, through simultaneous vaccination of synthetics immunogenics SBbo 23290 in opposite sides (Treatment I) and through vaccination of the same immunogenics SBm 7462 + SB 23290 in the same dose (Treatment II). All animals were inoculated three times, through subcutaneous, with intermissions of thirty days. The challenges were done thirty and thirty-four days after third inoculation, placing 2000 grubs of *Ripicephalus Boophilus miroplus*, out of hemoparasites, and lately inoculating the strain of *Babesia bovis* UFV1 – ninth passing, in the concentration of 1×10^6 Babesias/ml, respectively. The results show that, along the study, animals vaccinated in two forms related obtained an alteration of the sub population of lymphocytes present in the peripheral blood. Among the population of lymphocytes studied, a bigger increase for the sub population of cells B CD21⁺ was seen. Through the study of kinetic production of interleukin 4, was valued the activation of blood peripheral mononuclear cells (PBMC) cultivated after vaccination of animals and beforehand stimulated together with synthetic peptides SBbo 23290 e SBm 7462. The quantification of IL-4 production showed low levels for Treatment group I, Treatment group II and Saponine group.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* e o hemoparasito *Babesia bovis* são considerados na atualidade as espécies de parasitas que causam o maior impacto econômico na produção bovina do Brasil. Vários estudos ao longo dos anos vêm mostrando o prejuízo causado por estes parasitos. HORN & ARTECHE (1985) afirmam que só no Brasil os prejuízos causados pelo *Ripicephalus (Boophilus) microplus* atinge a cifra de 1 bilhão de dólares anuais. De acordo com estudos de MONTENEGRO-JAMES, (1992) na América Latina, a babesiose causa prejuízos de mais 1.3 bilhões de dólares por ano. Estudos realizados por GRISI *et.al* (2002) onde foi feito um levantamento estatístico no Brasil indicaram prejuízos de 2 bilhões de dólares causados pelo *Ripicephalus (Boophilus) microplus*.

No Brasil esta situação se agrava ainda mais quando é levada em conta a grande população de bovinos do país. De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) o Brasil possuía em 2003 aproximadamente 195 milhões de bovinos, sendo que a grande maioria dos animais estão expostos ao *Ripicephalus (Boophilus) microplus* e conseqüentemente podem vir a se infectar com a *Babesia bovis*.

Frente a este problema a maioria das estratégias é direcionada ao controle dos carrapatos com fármacos como: piretrinas, organofosforados, piretróides sintéticos, e lactonas macrocíclicas, neonicotinoides. No entanto, com o tempo, as populações de carrapatos desenvolvem resistência, em conseqüência da seleção das populações submetidas a doses que em condições normais seriam capazes de eliminar a maioria dos indivíduos de uma população parasitaria (PATARROYO & SOSSAI, 2004).

Atualmente não existem métodos de controle de hemoparasitos, que sejam totalmente eficazes contra a babesiose bovina. A prevenção da babesiose bovina pode ser realizada tanto pelo combate direto ou imunidade protetora contra seu

vetor, o carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* e/ou através da estimulação imunológica contra o hematozoário.

As vacinas quando analisadas em sua eficácia são consideradas como uma grande possibilidade viável para enfrentar problemas de saúde relacionados a microorganismos. Considerando, em Medicina Veterinária, que são seguras e permitem a produção de alimentos (carne e leite) sem resíduos químicos. Isto favorece a proteção do meio ambiente e dos animais (FREITAS, 2001). Devido a este fato, as atuais vacinas sintéticas para carrapatos SBm 7462 e para *Babesia bovis* SBbo 23290 são uma evidente e promissora oportunidade para melhorar o rendimento produtivo dos animais e potencializar a produção bovina do Brasil afetada por estas doenças.

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

Ao contrário das vacinas tradicionais, as peptídicas apresentam grandes vantagens, tais como: alto grau de pureza, completa segurança quanto à caracterização química, ausência de contaminantes, reprodutibilidade fiel na produção, fim da manipulação de cultivo celular em biorreatores, alta estabilidade, baixo custo da produção em grande escala, a manipulação da resposta imunológica, pois os imunógenos sintéticos podem ser desenhados de tal forma que estimulem uma resposta imune apropriada (NEURATH & KENT, 1986), a ausência de mecanismos supressores alérgicos e/ou autoimunes (PATARROYO *et al.*, 1995).

Portanto, o uso de peptídeos sintéticos como vacinas possui boas vantagens e deve ser melhor estudado para uma maior compreensão de como estes atuam e ativam o sistema imune.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e mensurar a resposta imune celular no sangue periférico e a proteção conferida em bovinos frente à vacinação com os imunógenos sintéticos SBm 7462 e SBbo 23290 aplicados separadamente e pela vacinação com os mesmos imunógenos porém aplicados simultaneamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o perfil celular da resposta imune anti-imunógeno de células T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ (WC1⁺) e B CD21⁺, em diferentes grupos (Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II); e em diferentes tempos.

Avaliar o perfil celular da resposta imune anti-imunógeno de células T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ (WC1⁺) e B CD21⁺, após o desafio com amostras de *Ripicephalus (Boophilus) microplus* e amostras virulentas de *Babesia bovis*;

Determinar a cinética da citocina IL-4 no sobrenadante de cultura celular de bovinos, proveniente do sangue periférico, após estimulação com os peptídeos sintéticos SBm 7462 e SBbo 23290.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Ripicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) é considerado o principal ectoparasito de importância econômica, não só pela sua capacidade de causar danos sobre o hospedeiro, devido hematofagia, inoculação de toxinas, depreciação do couro e transmissão de múltiplos patógenos como hemoparasitas (PATARROYO, 1994; GUIMARÃES *et al.*, 1998), causando taxas elevadas de morbidade e mortalidade. O problema em relação a este ectoparasito aumenta ainda mais se for levada em conta sua ampla distribuição geográfica sendo encontrado praticamente em todas as regiões tropicais e subtropicais. Parasita principalmente bovinos por ser extremamente específico, mas pode parasitar esporadicamente outros animais tais como eqüinos e ovinos GONZALES (1974). Cerca de 80% da população mundial de gado bovino está exposta a este parasita e as enfermidades por ele transmitidas. Estima-se que os custos com seu controle e as perdas de produtividade tem aumentado consideravelmente com o tempo (HORN & ARTECHE, 1985). De fato muitas pesquisas ao longo dos anos têm sido elaboradas para avaliar as perdas econômicas no mundo por este parasito. Tem sido estimado uma perda de US\$ 7 animal/ano (MC COSKER, 1979). No Brasil as perdas causadas pelo *Ripicephalus (Boophilus) microplus* atingem a cifra de 1 bilhão de dólares se forem considerados danos diretos e indiretos (HORN & ARTECHE, 1985). No entanto, mais recentemente, estudos realizados por GRISI *et.al* (2002) indicaram prejuízos de 2 bilhões de dólares causados pelo *Ripicephalus (Boophilus) microplus*.

Taxonomicamente, o *Ripicephalus (Boophilus) microplus* é classificado como sendo do Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Ordem Acari, Família Ixodidae, Gênero *Ripicephalus*, Subgênero *Boophilus* e Espécie *Ripicephalus (Boophilus) microplus*.

Este carrapato é conhecido como “de um só hospedeiro” e seu ciclo evolutivo pode ser estudado em dois tempos ou fases: parasitaria e não parasitaria. A primeira

fase compreende desde o início da fixação das larvas até o término (desprendimento do hospedeiro). Os adultos, incluindo as fêmeas ingurgitadas e fecundadas, caem desse hospedeiro onde se inicia a segunda fase. O próximo tempo, ou seja, a fase não parasitária começa após a soltura do artrópode do hospedeiro caindo no chão. A partir desse momento pode seguir-se de duas formas. Na primeira, a fêmea bota seus ovos e em seguida as larvas eclodem e posteriormente alcançam um hospedeiro iniciando a fase parasitária. Na segunda, a fêmea morre sem botar seus ovos ou estes são inférteis ou as larvas não conseguem alcançar um hospedeiro adequado e acabam morrendo PEREIRA (1982).

3.2 *Babesia bovis*

A babesiose bovina, também conhecida como piroplasmose, tem ocorrência em várias regiões tropicais e subtropicais como América Central e do Sul, Norte da África, Ásia e Austrália; sendo sua distribuição geográfica correlacionada à presença de carrapatos. No Brasil de acordo com FARIAS (1995) a babesiose bovina é transmitida por um único vetor, o carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887).

Nas Américas incluindo o Brasil, a babesiose bovina, é uma enfermidade causada por duas espécies: *Babesia bovis* (BABES, 1888), que causa os maiores danos ao animal devido à severidade da doença e, portanto, causando os maiores prejuízos econômicos no Brasil (FREITAS, 2001) e *Babesia bigemina* (SMITH & KILBOURNE, 1893). No entanto, no mundo existem mais de 100 espécies de *Babesia* identificadas (HOMER *et. al.*, 2000). Esses protozoários são pertencentes ao Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae e Gênero *Babesia*.

O ciclo de vida da *Babesia bovis* envolve tecidos do carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* como o intestino, o ovário e a glândula salivar e células sanguíneas do hospedeiro vertebrado (MEHLHORN & SCHEIN, 1984).

No intestino do carrapato os eritrócitos infectados com merozoítos ingeridos pela teleógena permanecem por algumas horas e posteriormente começam a se desenvolver em gametócitos que se diferenciam em estágios uninucleados chamados corpos radiados e se fundem originando o zigoto (MEHLHORN & SCHEIN, 1984). O

zigoto evolui para uma célula chamada oocineto que invade as células epiteliais do intestino do carrapato e inicia a divisão assexuada com a formação dos cinetos que irão invadir hemócitos, e outros órgãos como ovários e conseqüentemente os oócitos.

Os cinetos que invadem os oócitos permanecem em dormência durante o desenvolvimento da larva dentro do ovo. Quando estas eclodem e começam a se alimentar do hospedeiro ocorre novo processo de esporogonia e os cinetos invadem as células da glândula salivar, multiplicam e originam os esporozoítos que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (FRIEDHOFF, 1988). É importante ressaltar que a transmissão de *Babesia bovis* para o vertebrado ocorre somente na fase de larva do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MAHONEY & MIRRE, 1977).

A transmissão biológica do parasito inicia no hospedeiro vertebrado através da hematofagia por artrópodes infectados. Após ser inoculado na corrente sanguínea a *Babesia bovis* sob a forma infectante de esporozoítos penetram nas hemácias, desenvolvendo-se rapidamente, originando os trofozoítos que evoluem para merozoítos. Na saída, estes rompem a célula infectada, embora em alguns casos possa permanecer intacta infectando novas hemácias. O ciclo de vida da *Babesia bovis* no hospedeiro vertebrado é de aproximadamente oito horas.

O ciclo assexuado no hospedeiro vertebrado continua até que o animal morra ou elimine o parasito por meio de resposta imune eficaz e passe a ser portador sadio (MAHONEY, 1969).

A infecção por *Babesia bovis* é caracterizada por hipertermia, anemia, anorexia, caquexia, hemoglobinúria e pela síndrome do choque hipotensivo, acarretando um alto índice de mortalidade entre animais susceptíveis.

3.3 Recirculação de linfócitos

A integração e o controle das respostas imunes sistêmicas dependem do tráfego regulado dos linfócitos (BUTCHER & PICKER, 1996). A migração do sangue para dentro dos tecidos periféricos e linfóides é determinada por eventos complexos e combinados, envolvendo múltiplas moléculas que, juntas regulam o acesso tecidual de subtipos especializados de linfócitos (DEBES *et.al.*, 2005). A recirculação contínua dos linfócitos entre o sangue, tecidos e linfa é essencial para a coordenação e disseminação das respostas imunes.

A saída dos linfócitos dos tecidos e a migração via linfa aferente dentro dos linfonodos drenantes é um mecanismo de migração homeostática crítico para células T de memória e efetoras (DEBES *et.al.*, 2005). Um 'pool' de células de memória originadas do sangue tem a capacidade de entrar em múltiplos tecidos, ambos linfóides e não linfóides, e essa entrada é diferentemente regulada (KLONOWSKI *et.al.*, 2004).

A maioria dos linfócitos recirculam continuamente do sangue aos tecidos linfóides secundários e retornam a este aproximadamente duas vezes por dia, a circulação não é aleatória, já que é regulada por mecanismos ativos de reconhecimento entre as células endoteliais e os linfócitos, permitido posteriormente, cruzar através da parede vascular. Este processo de circulação é fundamental no sistema imune, controlando o acesso de populações de linfócitos especializados a um tecido em particular e por tanto influenciando a natureza da resposta imune local e/ou a resposta inflamatória. (GONZÁLEZ 2002)

Existe uma dicotomia significativa no tráfego de linfócitos no que concerne à distribuição diferencial de populações de células virgens versus efetoras ou de memória (MACKAY *et al.*, 1992). Em geral os linfócitos não primados são programados a recircular através de tecidos linfóides secundários onde encontram um microambiente linfóide especializado que pode, dependendo do estímulo encontrado, induzir a sua diferenciação ou morte no caso das células auto reativas. Diferentemente, as células de memória e efetoras apresentam uma notável heterogeneidade dentro de cada classe de linfócitos sejam B ou T com diferentes populações que expressam padrões seletivos a tecidos (WOODLAND & DUTTON, 2003).

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

No entanto, a regulação de receptores de residência durante a diferenciação de células T de memória e efetoras é análoga à produção de citocinas efetoras, na qual envolvem-se citocinas imunoreguladoras e sinais co-estimuladores que dependem da natureza antigênica. (PICKER 1994).

3.4 Resposta imune contra *Babesia bovis*

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

Neste contexto as células NK estão relacionadas à resistência dos animais para *Babesia*, conforme apresentado no trabalho de EUGUI & ALLISON (1980) estas células seriam responsáveis pela proteção dos animais em estágios precoces da infecção com o controle da multiplicação da *Babesia* no pico de parasitemia (JAMES, 1988). Evidências sobre a atividade das células NK também foram obtidas em estudos relacionados a babesiose humana, em que se observou aumento da população de células NK em pacientes com babesiose aguda (SHAIO & LIN, 1998).

Outros estudos também demonstram a importância das células NK uma vez que células NK do baço produzem IFN- γ na presença de IL-12 e IL-18 e na presença de fagócitos mononucleares expostos a *B. bovis* (GOFF *et al.*, 2006). Outros estudos *in vivo* estão em progresso para mostrar que estas células são a fonte de IFN- γ durante a infecção por *B. bovis* em bovinos (BROWN *et al.*, 2006).

A proteção contra a infecção aguda de *Babesia* envolve além das células NK, macrófagos ativados (BROWN & PALMER, 1999) e neutrófilos (COURT *et al.*, 2001). Monócitos e macrófagos exercem um papel central na resposta imune como células apresentadoras de antígeno, células imunorreguladoras e efectoras (GOFF *et al.*, 2002).

A imunidade contra a *Babesia* spp. requer não só a resposta imune inata mas também a adaptativa. Pelo fato da *Babesia* ser um parasito intra-eritrocitário obrigatório e não infectar células nucleadas como os parasitos das espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* que também parasitam eritrócitos. Esta célula sem núcleo do sangue não possui complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Este fato demonstra a importância das células T CD4⁺ restritas ao MHC classe

II como ligação entre a resposta imune inata e adaptativa e não as células T CD8⁺ restritas ao MHC de classe I (BROWN & PALMER, 1999, BROWN, 2001, 2006).

As células T são os linfócitos predominantes no sangue (até 80% dos linfócitos do sangue periférico em bovinos), que deixam o sangue por duas vias; as células T que não se encontraram com o antígeno anteriormente (células virgens) se conjugam com vênulas especializadas localizadas no paracórtex dos linfonodos (vênulas endoteliais altas), e as células T de memória deixam a corrente sangüínea através dos vasos sangüíneos convencionais nos tecidos e são depois transportadas para os linfonodos através da linfa aferente (TYZARD, 1998). Em bovinos, além dos "clusters" CD (CD4 e CD8), há os WC "workshop clusters", segundo HOWARD *et al.* (1999b)

De acordo com (HOMER *et al.*, 2000), as células T são críticas na resistência a babesiose, e os mecanismos mediados por células T ocorrem no estágio de resolução, sendo que as células T também têm sido implicadas na proteção contra espécies letais de *Babesia*.

O padrão de citocinas produzido pela população de células efectoras ao encontro antigênico regula a ativação e o influxo de outros tipos celulares. De fato, as populações de células T CD4⁺ de memória e ativadas correntemente secretam uma ampla variedade de citocinas e se encontram diferentemente distribuídas nos compartimentos do sistema imune fazendo parte de estruturas que dependem dos fatores solúveis por elas produzidos. Em órgãos linfóides secundários, as células T CD4⁺ expressam propriedades características de células T auxiliares mostrando elaborar fatores de crescimento para células T e B (BALDWIN *et al.*, 1987) necessários para a formação do microambiente em resposta a antígenos T-dependentes que desencadeiam respostas específicas e conseqüentemente protetoras.

As células T CD4⁺ são importantes para coordenar a produção de anticorpos da classe IgG de alta afinidade e para ativar macrófagos por meio da produção de IFN- $\tilde{\gamma}$. Segundo KUMARATILAKE & FERRANTE (1992), FELL *et al.*, (1994), BROWN & RICE-FICHET (1994) e BROWN *et al.*, (1995), a imunidade adaptativa é dependente de linfócitos T CD4⁺ pois estes possuem papel fundamental na produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF α , β , que por sua vez contribuem para a estimulação de linfócitos B, com conseqüente produção de imunoglobulinas de alta afinidade (IgG1 e IgG2), o que é importante para o controle da parasitemia durante a persistência da infecção da *Babesia bovis*. Além disso, as células T CD4⁺ também atuam na ativação

de neutrófilos e macrófagos responsáveis pela fagocitose e na produção de intermediários do nitrogênio reativo e de óxido nítrico (NO), que são tóxicos para o parasito.

Os linfócitos T CD4⁺ exercem um papel importante no controle da maturação da resposta imune humoral pela síntese seletiva de citocinas que regulam a mudança de subclasses de IgG, durante a infecção. A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina 4 (IL-4) enquanto que o IFN- γ estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995). Esses resultados foram confirmados por BROWN *et al.*, (1995), quando observaram que clones de células T CD4⁺ produtores de IFN- γ específicos para RAP-1 de *B. bigemina*, induziam aumento nos níveis de IgG2 produzidos por linfócitos B e que células T com padrão misto de citocinas do tipo zero, capazes de co-expressar IL-4 e IFN- γ forneciam sinais co-estimuladores necessários para o aumento da síntese de IgG1 e IgG2 por células B. Em bovinos, tanto a IgG1 quanto a IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação à IgG1, (McGUIRE *et al.*, 1979).

O paradigma da resposta imune do Tipo 1 ou do Tipo 2, postulado por MOSMANN *et al.*, (1986) em camundongos, de que a proteção imunológica está relacionada à resposta do tipo celular ou humoral, é na verdade uma simplificação de uma complexa rede de mecanismos imunorreguladores. A imunorregulação de infecções difere em relação aos tipos celulares envolvidos, as citocinas e mediadores secretados, assim como seus efeitos supressores ou indutores sobre respostas imunes do tipo 1 e do tipo 2 (COX., 1997; BROWN *et al.*, 1998).

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

CD23, IgM e MHC II, além de aumentar a produção de IgG1 e IgE (ESTES *et al.*, 1995).

De acordo com FIKRI *et al.*, (2000), em bovinos, as células T $\gamma\delta$ constituem uma população proeminente das células mononucleares periféricas bovinas (PBMC), atingindo de 20 a 30% em bovinos jovens. No entanto, existe uma queda desta população em bovinos adultos formando cerca de 10 a 15% da população circulante (WYATT *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1996).

Análises da distribuição tecidual da população WC1⁺ de células T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo revelaram que estas células estavam presentes em altas concentrações no sangue periférico e baixas concentrações nos órgãos linfóides secundários (PARK *et al.*, 2000). Várias análises de expressão gênica sugerem que as células T $\gamma\delta$ WC1⁺ de bovinos representam a população inflamatória caracterizada pela produção de IFN- γ . Estas células T WC1⁺ promovem meios para a estimulação da resposta imune do tipo 1. Por outro lado, as T $\gamma\delta$ WC1⁻ são consideradas células reguladoras, podendo ser encontradas principalmente em órgãos como o baço. Essas células T $\gamma\delta$ WC1⁻ dividem características com células da linhagem mielóide (HEDGES *et al.*, 2003; MEISSNER *et al.*, 2003).

Nos ruminantes segundo TYZARD (1998), as células T $\gamma\delta$ respondem predominantemente na reação linfocitária mista, sugerindo que possam reconhecer antígenos do MHC estranhos e que também possam ser citotóxicas.

As células T $\gamma\delta$ de ruminantes possuem diversas funções, dentre elas o efeito regulador sobre o sistema imune (HOWARD *et al.*, 1999a), atividade citotóxica (WELSH *et al.*, 1997), a capacidade de reconhecer antígenos protéicos (WELSH *et al.*, 2002), apresentarem antígenos as células T CD4⁺ e induzirem a sua proliferação (COLLINS *et al.*, 1998) e de participarem na maturação de células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002; CIPRIANI *et al.*, 2000). Isto sugere que os linfócitos T $\gamma\delta$ podem ter uma ligação com a resposta imune adquirida já que foi demonstrado que células T $\gamma\delta$ humanas estimuladas adequadamente produziam β -quimiocinas, tais como MIP-1 α e MIP-1 β e quimiocinas que induzem a migração de células T. Outros estudos demonstram que o aumento da resistência à infecção por *B. bovis* pode estar relacionado a abundância de células T $\gamma\delta$ (CLARK & JACOBSEN, 1998). Além disso, estudos de infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos exauridos de

células T $\gamma\delta$ WC1⁺ através de anticorpo monoclonal mostrou que essas células poderiam estar associadas a uma polarização da resposta do tipo 1, com isso, acredita-se no papel das células T $\gamma\delta$ WC1⁺ como uma ligação entre a imunidade inata e adquirida, o que é fundamental para uma resposta imune apropriada. (POLLOK & WELSH, 2002).

Vários estudos têm mostrado o potencial das células T $\gamma\delta$ WC1⁺ de murinos e bovinos na secreção de IFN- γ (NAIMAN *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2002). As células T $\gamma\delta$ WC1⁺ podem favorecer uma resposta inflamatória em animais jovens pelo efeito direto de IFN- γ sobre macrófagos, bem como, no desenvolvimento de resposta do tipo 1 (ROGERS *et al.*, 2005).

3.5 Resposta imune contra *Ripicephalus (Boophilus) microplus*

RIEK (1962) relata que a resistência a carrapatos por bovinos pode ser descrita de duas formas: resistência inata e adquirida, sendo a primeira àquela que não necessariamente depende do contato prévio do bovino com o *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, mas de alguns fatores inatos como o comprimento dos pêlos (pêlos curtos favorecem a resistência), espessura e dureza da pele e hábitos do animal. Por outro lado, a resistência adquirida começa a se evidenciar depois que o animal foi exposto a algumas infestações por carrapatos.

As reações imunológicas do hospedeiro que se seguem a repetidas infestações de carrapatos são produzidas a partir de antígenos das glândulas salivares ou das peças bucais do parasito que entram em contato com a pele do hospedeiro. Essa imunidade que outorga resistência pode ser expressa como uma redução no número de fêmeas ingurgitadas, peso, fecundidade, e prolongamento no tempo de alimentação do parasito. Especulações são feitas tentando relacionar alguns fatores como possíveis anticorpos específicos contra glândulas salivares (WILLADSEN *et al.*, 1978), reações celulares (WILLADSEN, 1980) e reações de hipersensibilidade (LEMOS, 1986) ao fenômeno de imunidade adquirida, embora as citações presentes não se refiram, especificamente, a carrapatos de um hospedeiro, como *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. BROSSARD e WIKEL (1989) citaram que o desenvolvimento de resistência a carrapatos, após diversas infestações

sucessivas, é um fenômeno tipicamente imunológico, no qual estariam envolvidas todas as células e fatores intermediários do sistema imune. FIVAZ & NORVAL (1990) e USHIO *et al.*, (1993) constaram uma elevação dos níveis de IgM, IgG e IgE, um quadro típico de reação de hipersensibilidade do tipo 1. Porém SONENSHINE (1991) diz estar envolvida uma reação de hipersensibilidade do tipo 1 ou do tipo 2.

No entanto, existe um fato importante a considerar neste tipo de imunidade adquirida naturalmente. Os antígenos do carrapato são moléculas expostas continuamente ao hospedeiro durante a interação parasito-hospedeiro. É provável que essa exposição gere uma compatibilidade seletiva entre parasito e hospedeiro na evolução. De fato, vários autores concordam em afirmar que as infestações com carrapatos medeiam imunossupressão na maioria dos mecanismos relacionados à resistência adquirida, inibindo a atividade de moléculas biologicamente ativas, das células efectoras (NK, macrófagos) e das respostas proliferativas de linfócitos T que estão envolvidas com a resposta imune do Tipo 1 (WIKEL *et al.*, 1996; 1997).

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

Corroborando a estes dados, KASHINO *et al.*, 2005 estudando raças de bovinos susceptíveis (Holstein, *Bos taurus taurus*) e resistentes (Nelore, *Bos taurus indicus*) à *B. microplus* observou uma diferença significativa na resposta humoral à antígenos da saliva do carrapato entre estas raças. A raça susceptível apresentou níveis relevantes do isotipo IgG1 saliva-específica, que estão associados com uma resposta imune do tipo 2 em bovinos (ESTES & BROWN, 2002; MULCAHY *et al.*, 1998).

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

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

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

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

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

3.6 Resposta imune em tecido linfóide

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

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

WALKER *et al.* (2000), destacam o papel que tem a presença do linfócito TCD4⁺ na geração de uma resposta imune de memória e notavelmente antígeno-específica e a participação da célula dendrítica na migração da célula T ao folículo.

A formação dos CGs freqüentemente é caracterizada pela estratificação de subpopulações linfocíticas em regiões proliferativas e não proliferativas bem conhecidas como zonas escura e clara respectivamente (MACLENNAN, 1994; CAMACHO *et al.*, 1998). Em bovinos essa formação têm sido claramente observada

e o tempo de aparecimento dos mesmos parece depender do imunógeno utilizado (FREITAS, 2000 e RESENDE 2003).

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

3.7 Adjuvantes

A palavra adjuvante deriva latim *adjuvare* que significa auxiliar. Atualmente é o nome genérico que se aplica as substâncias usadas em associação a antígenos. Nos dias atuais tem como objetivo principal auxiliar ou potencializar a resposta imunológica que seria de menor intensidade se o antígeno tivesse sido ministrado isoladamente (ELDEMAM, 1998). Há mais de sessenta anos os adjuvantes vêm sendo utilizados na imunologia experimental, onde seu uso adequado dispensa doses elevadas, bem como aplicações freqüentes do antígeno sensibilizante (AUCOUTURIER, *et al.*, 2001).

Os adjuvantes podem ser classificados baseados em cinco potenciais modelos de ação:

- 1- Imunomodulação (modificação da rede de citocinas).
- 2- Apresentação sem mudança na conformação do antígeno.
- 3- Indução de citotoxicidade.
- 4- Indução de células específicas.
- 5- Servindo como depósitos de antígenos.

A natureza química dos adjuvantes até o momento é bastante variada e os mais citados são: Sais de alumínio, bacterianos como lipopolissarídeo (LPS) e (MDP), óleos minerais, óleos vegetais e a utilização do extrato da saponina, que como foi utilizada no presente estudo será enfatizada (MITCHELL, *et al.*,2001).

3.8 Saponina

As saponinas são um grupo heterogêneo de produtos naturais caracterizados quimicamente por serem: esteróis glicosídeos e triterpenoides glicosídeos, onde são encontrados principalmente nas raízes de plantas, mas também podem ser encontrados nas folhas, no tronco e em flores (OAKENFULL, 1981; REZNICEK & JURESNITSCH., 1991).

Existem muitas espécies de plantas onde se pode obter o extrato de saponina. Dentre estas espécies podemos citar: *Quillaja saponins*, *Smilax aristolochiifolia* e em diversas plantas representadas pelo gênero *Panax* (DALSGAARD, 1974; SOLYOM *et al.*, 1980).

Como capacidade e potencial imunológico é descrito na literatura que a saponina quando aplicada de forma subcutânea tem a capacidade de atrair no local da infecção linfócitos T via quimiocinas produzido por células locais (BOMFORD, 1978). No entanto a aplicação subcutânea de extrato saponina a partir da planta *Quillaja* spp. tem demonstrado um aumento de anticorpos com uma resposta T-independente, indicando que saponina pode ativar diretamente linfócitos B (WHITE *et al.*, 1991; FLEBBE & BRALEY-MULLEN, 1986a; FLEBBE & BRALEY-MULLEN, 1986b).

Em estudo com diferentes linhagens de camundongos foi observado que saponina aumentou a população de células CD 8⁺ citotóxicas no local da aplicação. Também foi observado que saponina induziu o aumento da produção de IFN- γ (HEATH, *et al.*, 1991).

3.9 Vacinação

A palavra vacina vem do latim *vaccina* e significa “da natureza da vaca”, no qual se referia inicialmente a uma doença infecto-contagiosa formadora de pústulas no gado. *Vacum*, e posteriormente, aplicada ao recurso médico contra prevenção de certas moléstias, porque foi pelo contágio daquela doença a humanos que se verificou o aparecimento de imunidade contra varíola (SOARES, 1993).

A vacinação é o maior sucesso médico e veterinário. A vacina proporciona salvar mais vidas através da imunização e uma maior proteção e conseqüentemente maior produção animal. Vacinas têm sido utilizadas antes mesmo da proteção por

mecanismos imunes terem sido descritos. Hoje, a disciplina vacinologia adquiriu um status científico próprio como uma área de pesquisa interdisciplinar que emerge da microbiologia e imunologia. Devido às vacinas “fazerem dinheiro” – para os veterinários e indústrias farmacêuticas – muito dinheiro tem sido investido na pesquisa com vacinas. Isto tem resultado em um progresso impressionante.

Atualmente a importância da vacinação profilática contra doenças infecciosas é bem mais ilustrada pelo fato de que os programas mundiais de vacinação induziram uma completa ou quase completa erradicação dessas doenças em países desenvolvidos.

As vacinas induzem proteção contra a infecção estimulando o desenvolvimento das células efectoras de vida longa e das células de memória. A maioria das vacinas em uso de rotina funciona através da imunidade humoral. (ABBAS, 2003).

As vacinas em medicina veterinária têm, classicamente, enorme importância para a proteção de animais de companhia e em saúde pública, controlando doenças como febre aftosa em bovinos, parvovirose em cães, rinotraqueíte em gatos, pseudorraiva em suínos e a raiva em praticamente todas as espécies domésticas (MARTINOD, 1999).

O desenvolvimento de vacinas anti-carrapato representam uma das mais promissoras alternativas de controle ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e tem a vantagem de ser espécie alvo específica, apresentar segurança ambiental e à saúde humana, bem como à animal, fácil administração e custo acessível. Avanços no entendimento da imunologia bovina, biologia molecular e biotecnologia têm feito da pesquisa com vacinas anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* uma realidade (SOSSAI, 2004).

3.10 Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos são seqüências de aminoácidos construídas e derivadas de uma ou várias proteínas com características claramente imunogênicas.

O grande interesse na utilização de peptídeos sintéticos decorre da capacidade de simulação dos sítios antigênicos ou dos receptores protéicos, da qual provém a seqüência aminoacídica do peptídeo (PATARROYO & GUZMAN, 2004).

A opção por peptídeos sintéticos deve-se às características intrínsecas dessa técnica como à possibilidade de síntese de peptídeos mínimos, com estrutura antigênica bem definida capaz de estimular resposta imune específica e efetiva, além de oferecer vantagens sobre as preparações antigênicas como alto grau de pureza, ausência de contaminantes, alta estabilidade, entre outras (NEURATH & KENT, 1986; BEM-YEDIDIA & ARNON, 1997).

3.11 Peptídeo SBbo 23290

O Laboratório de Biologia e Controle de hematozoários e Vetores – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa associado ao FIDIC – Fundación Instituto de Immunologia da Colômbia confeccionaram alguns peptídeos sintéticos baseados na estrutura da proteína de roptria de *B. bovis* (RAP-1 de *B. bovis*). Um conjunto de dez peptídeos sintéticos baseados na estrutura íntegra da proteína RAP-1 foi testado em ensaios de imunogenicidade. Para essa avaliação utilizaram células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com amostra atenuada e com exoantígenos de *B. bovis*. Essas células foram estimuladas *in vitro* com peptídeos sintéticos para a identificação dos peptídeos estimuladores da resposta imune celular e/ou humoral. Dos dez peptídeos testados, três estimularam linfócitos T e outros três estimularam linfócitos B (PATARROYO *et al.*, 1999).

Para um peptídeo ser um bom imunógeno é necessário a união de epitopos T e B reativos em sua estrutura (JACKSON *et al.*, 2000). Com base neste estudo, os peptídeos 5084 e 5081, que apresentaram maior estímulo para células T e B, respectivamente, foram hibridizados e originaram o peptídeo 23290.

Os resultados obtidos por FREITAS (2001) em experimento com células *ex vivo* mostram que a resposta ao peptídeo híbrido 23290 foi caracterizada pelas maiores taxas de produção IFN- γ , TNF- α e IL-12 por PBMC, sendo então o peptídeo que apresentou maior reconhecimento celular.

CASTRO (2005) em seus estudos constatou que o peptídeo sintético SBbo 23290 utilizando saponina como adjuvante foi eficaz estimulando a resposta imune dos animais. Os animais vacinados com o peptídeo SBbo 23290 desenvolveram uma resposta imune celular satisfatória nas sub-populações de linfócitos. Principalmente nas sub-populações de linfócitos B CD 21⁺ e T $\gamma\delta$ WC1⁺. Além disto foi demonstrado

que houve formação de estruturas que conferiram especificidade e memória nos tecidos linfóides após as vacinações.

Os resultados apresentados no parágrafo anterior juntamente com os dados de FREITAS (2001) demonstram que o peptídeo SBbo 23290 possui características adequadas para o controle da Babesiose em bovinos.

3.12 Peptídeo SBm 7462

WILLADSEN *et al.*, (1989), isolaram e purificaram uma proteína que mimetizava as alterações biológicas no *Ripicephalus (Boophilus) microplus* induzida pelas inoculações com extratos brutos de carrapatos bovinos. Essa glicoproteína foi denominada Bm86, com um peso estimado de 89 KD e ponto isoelétrico 5,5. Posteriormente, determinou-se a seqüência aminoácídica desta proteína, constando-se por 650 aminoácidos e que se encontrava em pequena quantidade no intestino do carrapato adulto.

A partir da seqüência da Bm86, escolheram-se alguns peptídeos com possíveis características antigênicas. A escolha de tais peptídeos dentro da estrutura íntegra da proteína se baseou em estudos de predição computacional de sítios imunogênicos, com base nas propriedades de proteínas, tais como, antigenicidade (HOOP & WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta hélice e beta sheet (CHOU & FASMAN, 1978), hidrofobicidade e hidrofiliçidade (KYTE & DOOLITTLE, 1982).

A partir destas análises, pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de hematozoários e Vetores – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa desenharam três seqüências peptídicas denominadas 4822, 4823 e 4824, provenientes de Bm86. Os números dos peptídeos foram dados de acordo com a sua catalogação no livro de seqüências do Instituto de Imunologia da Colômbia, onde foram sintetizados.

A junção das seqüências de aminoácidos dos três peptídeos 4822 – 4824 – 4823, nesta ordem, deu origem ao antígeno vacinal SBm 7462 cuja tecnologia já tem sido repassada à indústria de medicamentos. O peptídeo sintético SBm 7462 foi testado em experimentos distintos.

De acordo com os achados de PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.*, (2002) o peptídeo SBm 7462 produz uma resposta imune protetora contra *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, mesmo sob condições de estresse, devido ao manejo.

Na avaliação da resposta imune pelo SBm 7462, GONZÁLEZ (2003) demonstrou que o peptídeo estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isotipo IgG1 sobre o isotipo IgG2. De acordo com seus resultados, considera-se que o peptídeo sintético SBm 7462 induz eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolve mecanismos do sistema imune tanto celulares quanto humorais.

De acordo com pesquisas realizadas no LBCHV/BIOAGRO utilizando peptídeos sintéticos conclui-se que quando bem desenhados e convenientemente testados tais peptídeos comportam-se como uma proteína nativa; portanto esse trabalho tem por intuito realizar estudos sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunológica celular aos imunógenos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

A coleta de sangue periférico foi realizada no Isolamento contra Artrópodes e Vetores de Hematozoários para Bovinos, localizado no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) do Departamento de Veterinária (DVT), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), e no Laboratório de Doença de Chagas (LADOC) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

4.2 Animais

Foram utilizados em todos os ensaios de imunização, dezesseis bovinos machos *Bos taurus taurus* da raça holandesa com idade de 7 meses. Os animais foram submetidos à condição de isolamento desde o nascimento até o final de todo o experimento.

Durante a realização do experimento os animais receberam ração balanceada com 17% de proteína e capim Mapier *Pennisetum purpureum*, duas vezes totalizando 30 quilos em cada cocho por dia. Todos os animais receberam água *ad-libitum*.

4.3 Grupo de Experimentação

Os dezesseis animais foram divididos em quatro grupos iguais para a vacinação. Todos os grupos foram mantidos em condições ambientais semelhantes. Os animais foram vacinados por via subcutânea (sc) na região do pescoço de acordo com a Tabela 1.

O presente trabalho possuía dois grupos experimentais que foram vacinados com os peptídeos SBbo 23290 anti *Babesia bovis* e SBm 7462 anti *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. Os dois grupos citados acima foram vacinados de diferentes formas. No primeiro grupo os animais foram vacinados com o peptídeo SBbo 23290 de um lado da região do pescoço e com o peptídeo SBm 7462 no lado oposto. Este grupo foi denominado de tratamento I. No outro grupo os animais foram vacinados na mesma região do grupo acima, porém com um coquetel contendo os dois peptídeos. Este grupo foi denominado de tratamento II. Ao longo de todo o experimento as vacinações foram injetadas sempre no mesmo local.

Foi utilizado saponina como adjuvante (Saponine®) na dose 1,5mg/animal/dose de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Grupos de Experimentação

Nome do grupo	Número de animais	Vacinação (n.ºdoses/via)	Intervalo de tempo	Produto Utilizado em cada vacinação
Tratamento I	04	3X Subcutâneo(SC)	30 dias	2 mg SBbo 23.290 2 mg SBm 7462 2 mL H ₂ O destilada 1,5 mg saponina (Em cada lado)
Tratamento II	04	3X Subcutâneo(SC)	30 dias	2 mg SBbo 23.290 2 mg SBm 7462 2 mL H ₂ O destilada 1,5 mg saponina (Localizado)
Saponina	04	3X Subcutâneo(SC)	30 dias	1,5 mg saponina 2 mL H ₂ O destilada
Controle	04	3X Subcutâneo(SC)	30 dias	2 mL H ₂ O destilada

4.4 Desafio

4.4.1 Desafio com *Ripicephalus (Boophilus) microplus*

Amostras de larvas de *Ripicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da UFRS (cepa Porto Alegre), comprovadamente livres de hematozoários, foram utilizadas no desafio. Foram colocadas 4000 larvas de carrapato em cada animal. Todos os bezerros permaneceram imobilizados durante 8 horas para garantir que um maior número de larvas de *Ripicephalus (Boophilus) microplus* fixa-se no corpo dos animais. O desafio ocorreu trinta dias após a última vacinação (Tabela 2).

4.4.2 Desafio com *Babesia bovis*

Uma amostra comprovadamente virulenta de *Babesia bovis* da cepa Bbo UFV1, nona passagem, mantida sob criopreservação em nitrogênio líquido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCH) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO)-UFV, foi descongelada para o desafio. Após o descongelamento, o parasito foi inoculado em um bezerro para reativação do mesmo. Quando a parasitemia alcançou 1,4% coletou-se o sangue para ser usado como inoculo nos animais do experimento.

Todos os animais receberam 1,0ml de sangue por via endovenosa, contendo aproximadamente $1,0 \times 10^6$ hemácias infectadas por ml. O desafio foi realizado trinta e cinco dias após a última vacinação (Tabela 2).

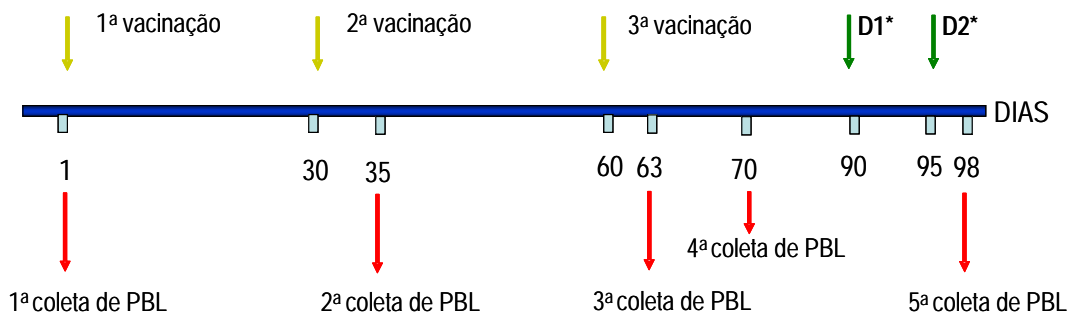
4.5 Isolamento e estimulação de linfócitos de sangue periférico (PBL) bovino

O isolamento de linfócitos do sangue periférico (PBL) dos animais vacinados foi realizado com o objetivo de avaliar a cinética dos linfócitos T e B ao longo de todo o experimento. O PBL foi obtido assepticamente no isolamento de bovinos. Foi

coletado sangue em dois tubos de 5 ml com anticoagulante (EDTA) através de punção jugular, totalizando 8 ml de sangue por animal. Após a coleta o material foi enviado para o LBCH/BIOAGRO para ser processado. Foi realizada uma rigorosa assepsia com álcool 70% em todos os tubos para evitar contaminações. Os tubos foram abertos em capela de fluxo laminar e o sangue foi vertido em tubos de centrifuga de 15 ml. O sangue foi centrifugado à 300g por 15 minutos a 18°C com o objetivo de isolar os leucócitos.

Após o isolamento dos linfócitos periféricos as células foram criopreservadas com solução de congelamento (30% de albumina sérica bovina SIGMA® a 20%, 60% de solução crioprotetora FARMOTERÁPICA, 10% de solução de dimethylsulfoxido (DMSO) SIGMA® e 2UI de heparina sódica SIGMA® por mL) em nitrogênio líquido até o descongelamento para posteriores experimentos com citometria de fluxo no Centro de Pesquisas René Rachou CPqRR no laboratório de Doença de Chagas LADOC em Belo Horizonte – MG. O sangue foi coletado como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Dias referentes à coleta de PBL e Desafio



* D1 = **Desafio com *Ripicephalus (Boophilus) microplus***

* D2 = **Desafio com *Babesia bovis***

Os linfócitos foram analisados por citometria de fluxo com o auxílio de marcadores de superfície. Foram utilizados anticorpos monoclonais, específicos para antígenos de superfície celular bovina CD4, CD8, CD21 e WC1 das células T $\delta\gamma$.(Tabela 3).

Tabela 3 - Anticorpos usados para Citometria de Fluxo

Especificidade	Diluição	Isotipo	Origem
Anti-CD 4 conjugado com FITC	1:20	Camundongo IgG 2a	Serotec
Anti-CD8 conjugado com FITC	1:20	Camundongo IgG 2a	Serotec
Anti-CD21 conjugado com FITC	1:20	Camundongo IgG2a	Serotec
Anti-WC1 conjugado com FITC	1:4	Camundongo IgG2a	Serotec

As células foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho Maria a 37°C por 2 minutos. Foi retirado todo o PBL do criotubo e colocado em tubos de centrifugas de 10 ml. As células foram lavadas por centrifugação a 300g durante 10 minutos a 4°C em 2 ml de RPMI suplementado com 0,5% de albumina serica bovina a 7,5% e 2UI de Heparina/ml. Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de pipetas. O “pellet” foi ressuscitado em 1 ml de RPMI. Foi coletado 30µL dessa suspensão e colocado em 150 µL de RPMI (diluição1:6). As células foram levadas ao citômetro de fluxo e ajustadas a 800 eventos/segundos que equivale a aproximadamente 8×10^6 células por mL.

Após o ajuste 30 µL da suspensão celular o PBL foi incubada com 15 µL de anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8, anti-CD21 (diluição 1/20) e anti-WC1 (diluição 1:4) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os linfócitos foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz a temperatura ambiente. Ao final da incubação as células foram acrescentadas com 2ml de solução de lise e incubadas por mais 10 minutos. Os linfócitos foram então centrifugados a 300g por 7 minutos a 4°C e por fim o sobrenadante foi vertido. Foi adicionado 200µL de RPMI em cada amostra e analisado imediatamente no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson). A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram feitas através do “software” Cell Quest que está instalado em um computador acoplado ao citômetro. Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais,

denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Foward Scatter” - FSC) versus granulidade (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC) (Figura 1). Em seguida, gráficos de intensidade relativa de fluorescência - FL1 (CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺ ou CD21⁺) versus FL2 foram construídos para identificar as sub-populações de linfócitos T e a população de linfócito B, respectivamente (Figura 2). Estas características são detectadas, utilizando-se um sistema óptico – eletrônico acoplados, que avaliam a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula, suspensa em meio líquido (hidrodinamicamente focalizada) (MARTINS-FILHO, 1992).

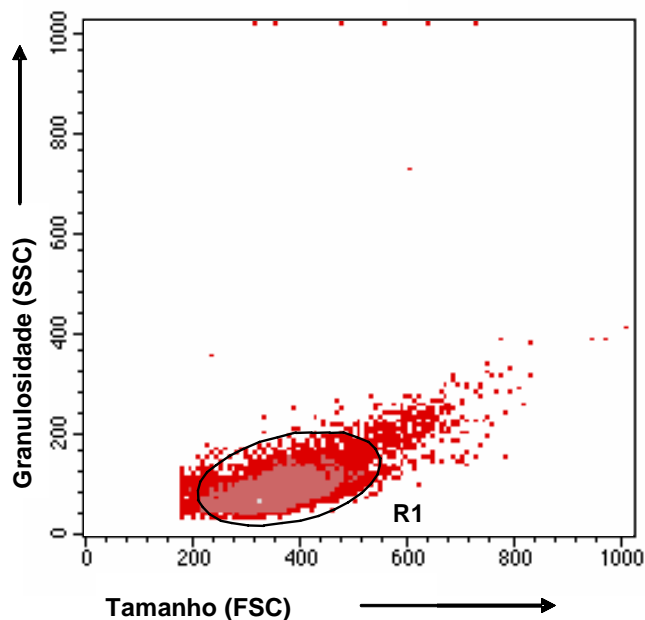


Figura 1. Perfil dos leucócitos periféricos bovinos (PBL) analisado pelo tamanho versus a granulidade. O “gate” R1 representa a população de linfócitos totais.

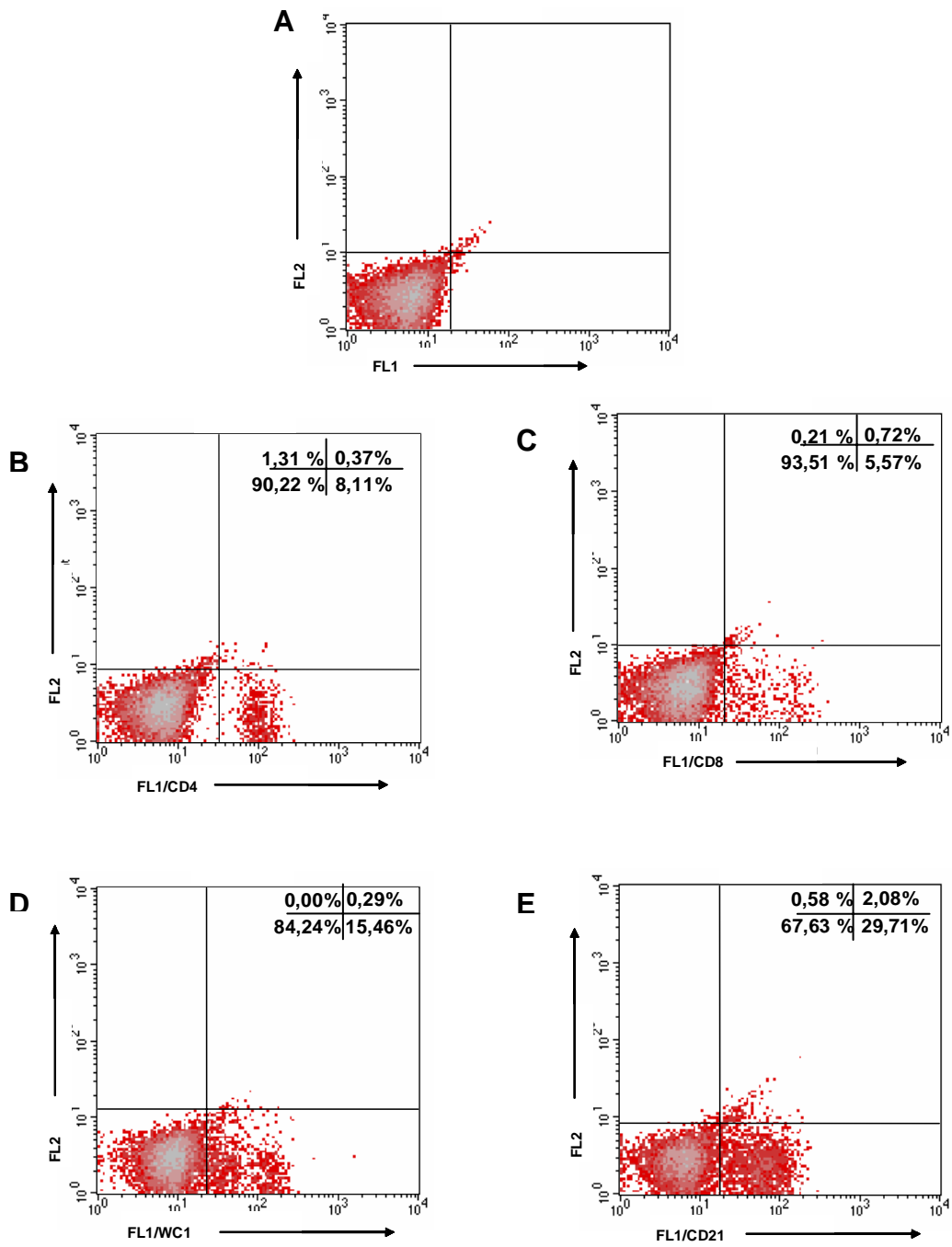


Figura 2. Representação gráfica do percentual das sub-populações de linfócitos T e da população de linfócitos B de PBL bovino obtido através da fluorescência FL1 por fluorescência FL2. **A)** Isotipo controle, **B)** População marcada com anticorpos específicos para linfócitos T CD4⁺, **C)** T CD8⁺, **D)** T WC1⁺ e **E)** B CD21⁺

4.6 Estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) bovino

Amostras de sangue foram coletadas dos animais em tubos com heparina sódica abrangendo um volume total de aproximadamente 15ml por bovino. A estimulação de PBMC foi realizada sempre sete e catorze dias após cada vacinação e também no dia do desafio com *Ripicephalus (Boophilus) microplus*.

Para a obtenção do PBMC foi adotado o método de separação por gradiente de densidade celular utilizando-se Ficoll-Paque já usado rotineiramente no LBCH-V (BROWN et al, 1991). O sangue foi centrifugado na proporção de 1/1 em Ficoll-Paque em tubos de centrifuga de 50 ml estéreis, a 300g por 40 minutos a 18°C.

A interfase esbranquiçada contendo as células mononucleares periféricas foi retirada cuidadosamente, sendo em sua grande maioria linfócitos. Estes foram transferidos para novos tubos de centrifuga de 50 ml contendo solução balanceada de sais de Hank-HBSS pH 7,2 (0,4 g de KCL; 0,06 g de KH₂PO₄; 8,0 g de NaCl; 0,35 g de NaHCO₃; 0,048g de Na₂HPO₄; 1,0 g de D-glucose; 0,01 g de vermelho de fenol e água milliQ q.s.p. 1000 ml) suficiente para um volume final equivalente a 30 ml. As células então foram lavadas por centrifugação com HBSS a 300g durante 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado após a lavagem. O “pellet” celular foi ressuscitado em 3 ml de Acetato Tris – Amônia (ACK) pH 7,2 (0,75g de NH₄CL; 0,23g de Tris e água Milli-Q q.s.p 100 ml) com a finalidade de hemolisar as hemácias restantes e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação o PBMC foi centrifugado a 300g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas novamente por um período de 10 minutos com HBSS. O “pellet” celular foi ressuscitado em 5ml em meio de cultivo Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM –SIGMA®) suplementado com D- glucose (4,0g/l), ácido fólico (6mg/l), L-arginina (116 mg/l), L- asparagina (36mg/l) HEPES (2,38 g/l), NaHCO₃ (2,0g/l), solução antibiótica e antimicótica 100 X SIGMA® (10ml/l). Imediatamente antes do uso no meio de cultivo foi acrescentado 10 % de Soro Fetal Bovino, L-glutamina 2 mM e 2 –mercaptoetanol (50uM). As células foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

O PBMC foi transferido para placas de 24 wells (Costar Cambridge, Mass.) a uma concentração de 2 x 10⁶ células por ml com um volume final de 2 ml/well. As

placas de 24 wells foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. É importante ressaltar que este experimento foi realizado em duplicata.

O PBMC foi estimulado após dezoito horas de cultura com os peptídeos sintéticos SBm7462 (1ug/ml) e SBbo 23290 (1ug/ml) para avaliar a capacidade de ativação proliferativa dos mesmos sob os linfócitos. Além disso, foram feitos controles negativos e positivos, sem estímulo e com 12,5 ug/ml de Concanavalina A, respectivamente. As placas foram incubadas novamente e o sobrenadante foi recolhido após 120 horas e congelados em eppendorfs a -30°C.

4.7 Dosagem de IL-4 a partir de sobrenadante de cultivo de PBMC através do teste de ELISA

Os testes de ELISA foram realizados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores situado no BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa. Através do teste de ELISA de captura foram dosados os níveis da citocina IL-4 produzida e secretada em sobrenadante de cultivo de PBMC. Todos os anticorpos monoclonais e reagentes utilizados no teste foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jayne Hope do Instituto de Saúde Animal (Institute for Animal Health) na Inglaterra.

As placas Maxisorp (cat.nº 439454A) foram sensibilizadas em temperatura ambiente overnight com o anticorpo primário CC314 (6µg/ml), específico para IL-4 bovina, diluído em água destilada.

Após sensibilização as placas foram lavadas cinco vezes com PBS (0.05% Tween 20) e bloqueadas por no mínimo uma hora com 200µl /well de tampão de bloqueio (2% de Caseína, PBS pH = 7,6, 8,5 g de NaCl 1,28g de N₂HPO₄, 0,16g de Na₂HPO₄ 2H₂O e água destilada q.s.p. 1000ml). Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes novamente com PBS (0.05% Tween 20) e foi adicionado 100 µl/well de cada amostra testada, em duplicata. As amostras foram incubadas uma hora a temperatura ambiente e os passos de lavagem foram repetidos.

Às placas foram adicionados 100 µl/well do anticorpo biotinilado CC313 (2 mg/ml) diluído no tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por no mínimo uma hora a temperatura ambiente e os passos de lavagem foram repetidos.

Foram adicionados às placas 100 µl/well de estreptoavidina – HRP diluída 1:500 em tampão de bloqueio e 0.05% Tween 20. Posteriormente as placas foram incubadas por quarenta e cinco minutos a temperatura ambiente e os passos de lavagem repetidos.

Finalmente, foram adicionados 100 µl/well do substrato TMB e a reação foi bloqueada com 50 µl/well de ácido sulfúrico (H₂SO₄)1M. As placas foram lidas em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492nm (TiterTek Multiskan® PLUS).

4.8 Análise estatística

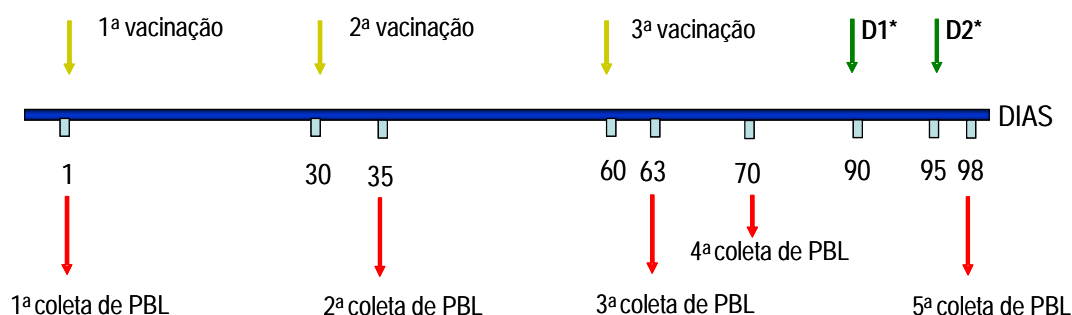
No presente trabalho foi usado o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon para comparação de cada grupo de bovinos em diferentes coletas de sangue periférico. E o teste não paramétrico não pareado de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para uma comparação entre todos os grupos de bovinos na mesma coleta de sangue periférico. Em ambos os casos foram usados 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA). É importante ressaltar que as figuras no formato de barra não estatisticamente significativas foram adicionadas no item Anexo do presente trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imunofenotipagem dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ em sangue periférico de bovinos

Considerando o grande número de informações geradas neste estudo e com o objetivo de facilitar a identificação do cronograma proposto para os estudos com PBL, segue abaixo novamente a Tabela 2 referente aos dias de coleta e realização do desafio, como descrita no item Material e Métodos.

Tabela 2 - Dias referentes à coleta de PBL e Desafio



* D1 = **Desafio com *Ripicephalus (Boophilus) microplus***

* D2 = **Desafio com *Babesia bovis***

5.1.1 Linfócitos periféricos T CD4⁺

O linfócito T CD4⁺ auxiliar controla a resposta imune do organismo de um modo geral. Essa célula proporciona estímulos que são importantes para a proliferação e diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ e B CD21⁺ (ABBAS, 2003). APPAY (2004) afirma que os linfócitos T helper desempenham uma variedade de funções auxiliares para montar uma resposta adaptativa eficiente contra *B. bovis*, visto que esse parasito intracelular obrigatório de eritrócito onde este não possui MHC.

A maior média do percentual de linfócitos T CD4⁺ foi do grupo controle foi 19,00 (±8,66) no dia um e o menor valor para este grupo foi de 5,04 (±1,21) no dia sessenta e três (Tabela 4 e Figura 3).

Para o grupo saponina a maior e menor média do percentual de T CD4⁺ foi de 14,13 (±4,02) no dia trinta e cinco e 7,38 (±2,09) no dia noventa e oito, respectivamente (Tabela 4 e Figura 3)

O grupo tratamento I apresentou sua maior média do percentual de 25,40(±9,19) no dia trinta e cinco e seu menor valor foi 6,41 (±1,42) no dia setenta. O grupo tratamento II apresentou seu maior e menor valor de 7,26 (±7,23) no dia um e 3,66 (±2,63) no dia trinta e cinco, respectivamente (Tabela 4 e Figura 3).

Quando analisado o percentual de linfócitos T CD4⁺ somente no dia trinta e cinco entre os grupos observou-se uma diferença estatisticamente significativa do grupo tratamento II em relação ao grupo tratamento I (Figura 4).

A média do percentual de linfócitos T CD4⁺ nos grupos saponina, tratamento I e tratamento II no dia um apresentou-se menor em comparação com o grupo controle (Tabela 4). Este resultado, onde o controle obteve maiores valores na média do percentual de T CD4⁺ em relação aos estímulos, provavelmente ocorreu uma adaptação ao ambiente de isolamento, isso talvez possibilitou um maior aumento de algumas populações celulares do sistema imune nos primeiros dias de experimento. No dia trinta e cinco, observou-se que tanto o grupo saponina quanto o tratamento I apresentaram uma maior média do percentual de linfócitos T CD4⁺ comparados com o controle, entretanto, a vacina tratamento II apresentou uma diminuição em relação ao controle. Esses dados sugerem que a ativação do sistema imune com saponina e tratamento I induziram um envolvimento de linfócitos T CD4⁺ cinco dias após a segunda vacinação (dia trinta e cinco), mas com recrutamento tecidual destas células tardia. Já a vacina tratamento II induziu um envolvimento de linfócitos T CD4⁺ com recrutamento tecidual precoce. Nos tempos posteriores dia setenta e noventa e oito, após uma cronicidade de estimulação antigênica, ambas as vacinas apresentaram a mesma dinâmica de recrutamento tecidual de linfócitos TCD4⁺.

Sustentando o argumento anterior ABBAS (2003) afirma que o movimento contínuo dos linfócitos via corrente sangüínea e linfática, de um tecido linfóide periférico (secundário) para outro, e então para os sítios inflamatórios, é essencial para respostas imunes contra os antígenos estranhos. O que sugere que após um processo de ativação tardio, as células T CD4⁺ dos animais do grupo tratamento I

migraram do sangue periférico para o local onde foi aplicada a vacina (sítio inflamatório) saindo, portanto, de circulação. Isso explicaria a queda no percentual de T CD4⁺ do sangue periférico do grupo tratamento I. A ativação precoce de T CD4⁺ no grupo tratamento II poderia estar associada a causas bioquímicas como, por exemplo, a concentração da dose da vacina e ou competição de ambos os peptídeos na ativação de T CD4⁺.

CASTRO (2005) ao testar o peptídeo sintético anti *Babesia bovis* SBbo 23290 encontrou um perfil de linfócitos T CD4⁺ semelhante ao do presente trabalho para o grupo tratamento I. A autora observou um aumento destas células no dia trinta e sete e após esse período constatou uma queda na média do percentual destes linfócitos até o final do experimento no grupo vacinado com o peptídeo. Esses resultados reafirmam o processo biológico descrito acima.

Média do percentual de linfócitos periféricos T CD4 ⁺					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	19,00 ±8,66	11,92 ±5,21	5,04 ±1,21	7,03 ±2,59	8,28 ±2,88
Saponina	9,73 ±4,72	14,13 ±4,02	11,90 ±2,45	9,10 ±4,45	7,38 ±2,09
Trat.I	16,13 ±5,81	25,40 ±9,19	9,65 ±5,12	6,41 ±1,42	7,66 ±1,34
Trat.II	7,26 ±7,23	3,66 ±2,63	3,95 ±2,19	4,62 ±4,58	4,95 ±3,74

Tabela 4- Média do percentual de linfócito T CD4⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

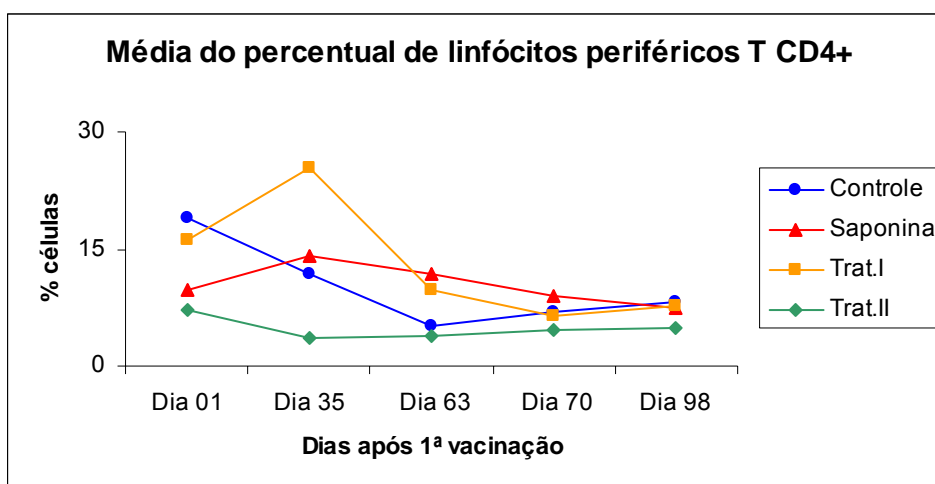


Figura 3- Cinética de T CD4⁺ dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

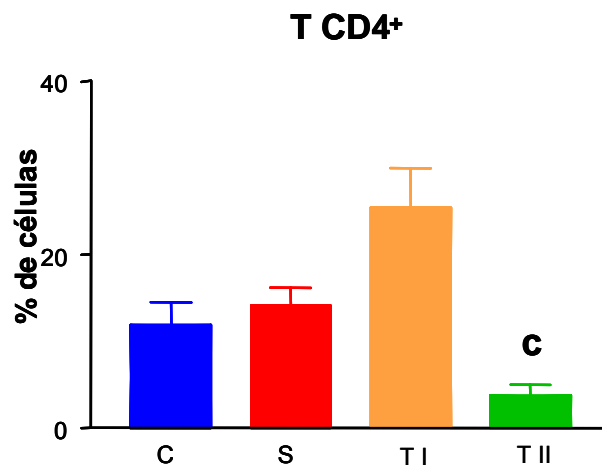


Figura 4 -Percentual de linfócitos T CD4⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia trinta e cinco. A letra c representa diferença significativa no percentual de células T CD4⁺ no grupo Tratamento II em relação ao grupo Tratamento I.

5.1.2 Linfócitos periféricos T CD8⁺

Na imunidade adquirida, os linfócitos T CD8⁺ estão relacionados ao combate de vírus, parasitas intracelulares, ou antígenos citosólicos. Estas formas biológicas são apresentadas pelo Complexo Maior de Histocompatibilidade I (MHC I) (ABBAS, 2003). As propriedades destes linfócitos têm sido estudadas mais em nível de citotoxicidade do que como células efectoras (CERWENKA *et al.*, 1999).

Neste trabalho a maior média do percentual de células T CD8⁺ para o grupo controle foi 13,26 ($\pm 11,02$) no dia um e o seu menor valor foi 3,36 ($\pm 1,23$) no dia sessenta e três. Após esta última data citada este grupo obteve um aumento da população de T CD8⁺ até o final do experimento (Tabela 5 e Figura 5).

O grupo saponina apresentou uma média do percentual de 9,00 ($\pm 0,73$) no dia trinta e cinco, sendo este o maior percentual apresentado pelo grupo. Em contrapartida a menor média do percentual para grupo saponina foi de 3,10 ($\pm 1,71$) no dia setenta. Após esta data até o final do experimento o grupo saponina praticamente não variou (Tabela 5 e Figura 5).

Da mesma forma que o grupo saponina a maior média do percentual do grupo tratamento I foi 12,18 ($\pm 4,27$) no dia trinta e cinco. Enquanto a sua menor média do percentual foi de 3,77 ($\pm 0,86$) no dia setenta (Tabela 5 e Figura 5).

Contraditoriamente com o grupo saponina e tratamento I o grupo tratamento II apresentou sua menor média do percentual no dia trinta e cinco, onde o valor para este grupo foi de 4,24 ($\pm 1,42$). Já a maior média do percentual para o grupo foi de 8,45 ($\pm 1,58$) no dia noventa e oito (Tabela 5 e Figura 5). É importante ressaltar ainda que o grupo tratamento II foi o que menos variou ao longo do experimento, sendo, portanto o grupo mais estável.

Quando analisado o percentual de linfócitos T CD8⁺ no dia trinta e cinco entre os grupos observou-se uma diferença estatisticamente significativa do grupo tratamento II em relação ao grupo tratamento I (Figura 6) e no dia noventa e oito observou-se uma diferença estatisticamente significativa do grupo tratamento II em relação ao grupo saponina (Figura 7).

As células T CD8⁺ de todos os grupos com exceção do grupo tratamento II estiveram mais baixas ao longo do experimento em relação às células T CD4⁺ (Tabela 4 e 5). Fato este observado também por CASTRO (2005), GONZÁLEZ (2003), e BITTAR (2002). Isto sugere que os peptídeos presentes na vacina

tratamento I não estariam sendo processados pelo MHC I e conseqüentemente apresentados para T CD8⁺ e sim apresentados via MHC II levando a ativação de T CD4⁺. De acordo com BROWN & PALMER (1999) as hemácias não possuem complexo de MHC isto estaria limitando a apresentação de antígenos a outras células como APCs e células T ativadas. Portanto a resposta imune desenvolvida contra *Babesia bovis* é pouco provável que esteja ligada aos linfócitos T CD8⁺.

Média do percentual de linfócitos periféricos T CD8+					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	13,26 ±11,02	5,01 ±2,18	3,36 ±1,23	5,21 ±3,13	6,82 ±1,51
Saponina	8,52 ±7,94	9,00 ±0,73	4,55 ±1,41	3,10 ±1,71	4,61 ±0,17
Trat.I	9,14 ±4,51	12,18 ±4,27	5,13 ±2,83	3,77 ±0,86	5,33 ±0,77
Trat.II	7,94 ±4,44	4,24 ±1,42	5,31 ±2,34	6,78 ±3,20	8,45 ±1,58

Tabela 5- Média do percentual de linfócito T CD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

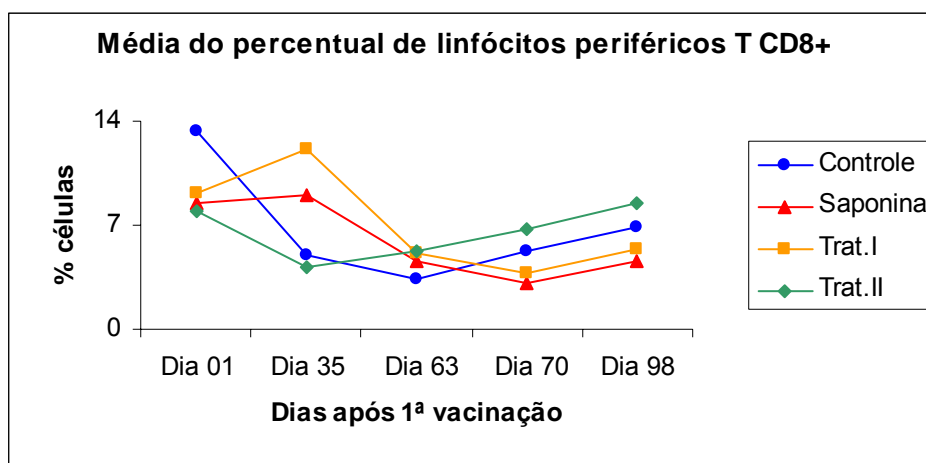


Figura 5- Cinética de T CD8⁺ dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

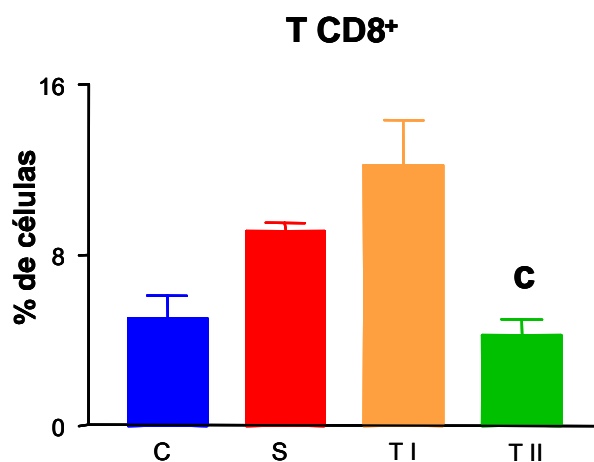


Figura 6- Percentual de linfócitos T CD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia trinta e cinco. A letra c representa diferença significativa no percentual de células T CD8⁺ no grupo Tratamento II em relação ao grupo Tratamento I.

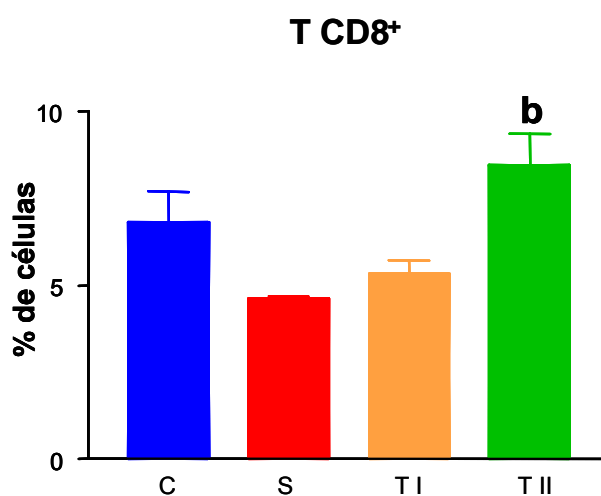


Figura 7-Percentual de linfócitos T CD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia noventa e oito. A letra b representa diferença significativa no percentual de células T CD8⁺ no grupo Tratamento II em relação ao grupo Saponina.

5.1.3 Linfócitos periféricos T $\gamma\delta$ WC1⁺

Os linfócitos T WC1⁺ apresentaram uma variação nos diferentes grupos estudados.

O grupo controle obteve uma queda ao longo de quase todo o experimento. A maior média do percentual para este grupo foi 22,81 (\pm 20,36) no dia um do experimento. Enquanto a menor média do percentual para o grupo foi 12,50 (\pm 4,78) no dia noventa e oito (Tabela 6 e Figura 8).

O grupo saponina apresentou um aumento na média do percentual de linfócitos T WC1⁺ ao longo de quase todo o experimento. O maior e o menor valor foram 23,46 (\pm 9,42) no dia setenta e 9,05 (\pm 4,66) no dia um, respectivamente (Tabela 6).

O grupo tratamento I variou em sua média do percentual de linfócitos T WC1⁺ sendo o maior valor para este grupo de 17,01 (\pm 8,79) no dia setenta e o menor valor 9,51 (\pm 5,03) no dia um do experimento (Tabela 6).

O grupo tratamento II variou em sua média do percentual de linfócitos T WC1⁺ de 21,03 (\pm 10,65) no dia trinta e cinco sendo este o maior valor e 13,02 (\pm 4,36) no dia setenta (Tabela 6).

Os resultados do presente trabalho mostram que houve um aumento na média do percentual de linfócitos T WC1⁺ de forma quase linear no grupo tratamento I (Tabela 6 e Figura 8). Estes dados correlacionam com CASTRO (2005) que utilizou o peptídeo SBbo 23290. No trabalho da autora a população vacinada com o peptídeo possui valores elevados na média do percentual de linfócitos T WC1⁺.

As células T WC1⁺ possuem grande importância no sistema imune dos bovinos. Elas possuem diversas funções, dentre elas a capacidade citolítica, o efeito regulador sobre o sistema imune (HOWARD *et al.*, 1999a), a capacidade de reconhecer antígenos protéicos (WELSH *et al.*, 2002), apresentarem antígenos às células T CD4⁺ e induzirem a sua proliferação (COLLINS *et al.*, 1998) e de participarem na maturação das células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002).

Além disso, em estudo realizado por VALDEZ *et al.*, (2002), observou-se que bezerros timentomizados tratados com anticorpos monoclonal anti-CD4 foram capazes de controlar a anaplasmoze aguda induzida, em contraste com a predição de que uma depressão significativa de linfócitos T CD4⁺ entre os grupos tratados

pudesse anular a resistência a uma infecção aguda. Isso sugere um possível papel para os linfócitos $T\gamma\delta$ no controle da anaplasmoose aguda.

No presente trabalho também se observou um papel importante destas células na infecção por *Babesia bovis*, uma vez que no grupo tratamento I mesmo com o decréscimo das células T $CD4^+$ a partir do dia trinta e cinco, as células $T\gamma\delta$ continuaram aumentando após esse período (Figura 8). Esses dados corroboram com o autor citado acima, onde as células $T\gamma\delta WC1^+$ podem exercer sua função efetora independente das células T $CD4^+$.

Já no grupo tratamento II observou-se uma constante oscilação da população de células $T\gamma\delta$ durante o experimento, porém seus valores sempre estão elevados. Isso sugere que essas células neste grupo também possuem um papel fundamental para controlar a infecção. Observou-se também que as células T $CD4^+$ estão sempre em níveis inferiores que as células $T\gamma\delta$, não ocorrendo uma relação na cinética entre ambas. Esses dados mais uma vez afirmam a hipótese de VALDEZ *et al.*, (2002) que demonstra uma independência da função das células $T\gamma\delta$ em relação aos linfócitos T $CD4^+$. De acordo com os resultados do presente trabalho e provavelmente o que pode ter acontecido com os animais vacinados com o tratamento II foi a permanência das $T\gamma\delta WC1$ no sangue periférico enquanto as células T $CD4^+$ migravam precocemente para o tecido.

Média do percentual de linfócitos periféricos T WC1+					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	13,17 ±9,06	22,81 ±20,36	19,37 ±8,81	13,92 ±5,78	12,50 ±4,78
Saponina	9,05 ±4,66	19,23 ±10,21	20,91 ±10,71	23,46 ±9,42	21,80 ±6,82
Trat.I	9,51 ±5,03	10,63 ±3,69	15,08 ±5,80	17,01 ±8,79	15,62 ±7,68
Trat.II	19,94 ±14,90	21,03 ±10,65	14,31 ±4,91	13,02 ±4,36	18,41 ±9,04

Tabela 6- Média do percentual de linfócito $T\gamma\delta$ WC1⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

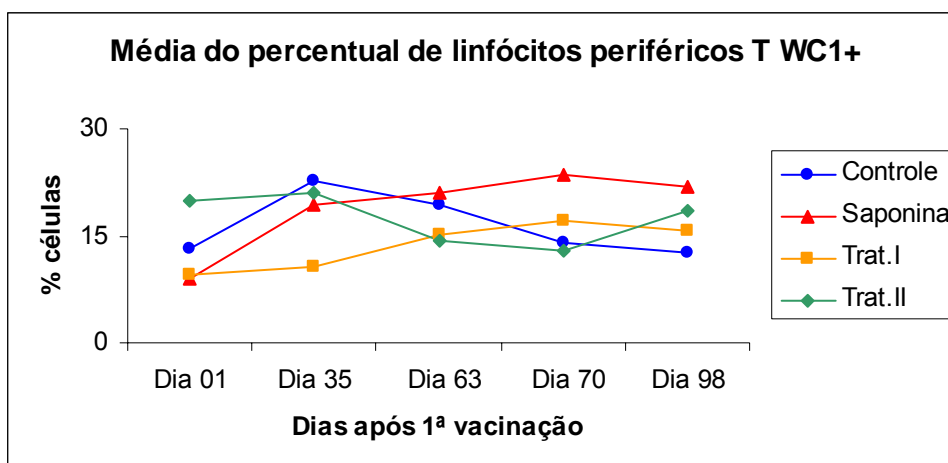


Figura 8- Cinética de $T\gamma\delta$ WC1⁺ dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

5.1.4 Linfócitos periféricos B CD21⁺

As células B CD21⁺ apresentaram a maior média do percentual de todo o estudo quando comparadas com outros tipos celulares já citados acima. De fato estas células tiveram um percentual muito elevado e variado nos grupos tratamento I, saponina e controle. No entanto, apesar de também apresentar um percentual muito elevado, o grupo tratamento II se apresentou como o grupo mais estável (Tabela 7 e Figura 9).

No grupo controle foi observado um aumento na média do percentual de células B CD21⁺ que ocorreu durante quase todo experimento. No dia sessenta três ocorreu a maior média do percentual onde este valor foi de 53,29 ($\pm 9,66$) e 14,45 ($\pm 9,14$) no dia um, onde este grupo apresentou seu menor valor (Tabela 7 Figura 9).

O grupo saponina obteve sua maior média do percentual de linfócito B CD21⁺ no dia noventa e oito onde foi observada uma média do percentual de 38,87 ($\pm 10,49$) sendo este o maior valor observado para o grupo. O menor valor foi observado no dia um igual a 11,30 ($\pm 6,02$). Esse grupo ao longo experimento apresentou no geral um aumento da população de células CD21⁺ (Tabela 7 Figura 9).

Os dados do presente trabalho corroboram com o trabalho de DALSGAARD *et al.*, (1999). O referido autor afirma que as saponinas são estimuladores de linfócitos B “*in vitro*” e podem também ter efeito imunoestimulatório inespecífico para linfócito B “*in vivo*”. Sustentando o argumento anterior as saponinas também têm a habilidade de aumentar a produção de anticorpos (BAR *et al.*, 1998). De fato, a capacidade de estimular o sistema imune inespecificamente é uma propriedade das saponinas, como ocorreu no presente trabalho. Outros estudos mostram que a administração oral de saponina em cobaios elicitou efeito imunoestimulatório inespecífico, assim como cobaios vacinados intraperitonealmente contra raiva mostraram maior resistência a desafios após administração oral de saponina (CHAVALI & CAMPBELL, 1987).

No grupo tratamento I houve uma variação muito grande no percentual de células CD21⁺. No dia setenta a média do percentual foi de 52,33 ($\pm 11,18$), sendo este o maior valor para este grupo. No entanto a menor média do percentual foi 12,76 ($\pm 6,41$) no dia um (Tabela 7 Figura 9).

O grupo tratamento II apresentou a maior média do percentual de células CD21⁺ ao longo do experimento e a menor variação quando comparado aos outros grupos. O maior valor foi de 54,39 ($\pm 7,54$) no dia setenta e o menor valor foi de 44,36 ($\pm 8,62$) no dia noventa e oito (Tabela 7 Figura 9). Esses dados mostram que o grupo tratamento II apresentou um maior percentual de células CD21⁺ em relação ao grupo tratamento I. Quando analisado o percentual de linfócitos CD21⁺ no dia setenta entre os grupos observou-se uma diferença estatisticamente significativa do grupo tratamento I e tratamento II em relação ao grupo saponina (Figura 10).

Ao contrário do presente trabalho, BENAVIDEZ, (2006) ao estudar a produção de IgG antígeno-específico para os peptídeos SBbo 23290 (anti - *Babesia bovis*) e SBm 7462 (anti - *Ripicephalus (Boophilus) microplus*) com os mesmos animais usados no presente estudo, observou que tanto o grupo tratamento I como o tratamento II apresentou níveis satisfatórios desta imunoglobulina. Porém, o grupo tratamento I apresentou níveis mais elevados do anticorpo-específico para o peptídeo SBm 7462 em relação ao grupo tratamento II.

Estudos realizados com o peptídeo SBm 7462 que foram sintetizados a partir da proteína Bm86 situada no intestino do carrapato adulto e que tem potencial de agir como antígeno oculto demonstram que a maior proteção conferida contra este artrópode é humoral e não celular (PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002; GONZÁLEZ, 2002).

De fato como afirma CASADEVALL & PIROFSKI (2003) nem sempre a imunologia (Imunofenotipagem) e a vacinologia apresentam o mesmo resultado. A imunofenotipagem no presente trabalho foi uma ferramenta para auxiliar na determinação do perfil celular desenvolvido pelos animais frente a uma vacina, mas nem sempre esses dados corroboram com os dados sorológicos. Isso sugere que a imunofenotipagem apesar de ser uma tecnologia de ponta e extremamente prática ela não determina por si só o que ocorre frente a uma vacina e sim pode auxiliar em uma maior compreensão desta. Para complementar o entendimento da eficácia de uma vacina é necessário o estudo da resposta imune humoral uma vez que anticorpos têm a função de impedir a invasão dos parasitos nas hemácias e aumentar a fagocitose de parasitos livres e de células infectadas (TAYLOR-ROBINSON, 1995).

No trabalho de CASTRO (2005), não foi observada uma grande variação no percentual de células CD21⁺ entre os três grupos estudados pela autora: peptídeo

SBbo 23290 (anti *Babesia Bovis*), saponina e controle ao longo do experimento. No entanto, CASTRO (2005) trabalhando em conjunto com JARDIM (2005) observou que a produção IgG foi muito superior no grupo peptídeo em relação aos demais grupos durante todo o experimento. JARDIM (2005) ainda afirma em seu trabalho que observou uma curva clássica de IgG, mostrando uma resposta intensa.

Esses dados reafirmam a hipótese de que a imunofenotipagem nem sempre apresentam os mesmos resultados da sorologia.

Média do percentual de linfócitos periféricos B CD21+					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	14,45 ±9,14	29,11 ±8,96	53,29 ±9,66	46,92 ±4,47	45,40 ±7,76
Saponina	11,30 ±6,02	25,71 ±14,34	20,21 ±9,14	35,47 ±11,73	38,87 ±10,49
Trat.I	12,76 ±6,41	34,95 ±4,65	38,96 ±18,38	52,33 ±11,18	51,42 ±13,01
Trat.II	48,35 ±9,19	46,42 ±12,38	53,41 ±8,94	54,39 ±7,54	44,36 ±8,62

Tabela 7- Média do percentual de linfócito B CD21⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

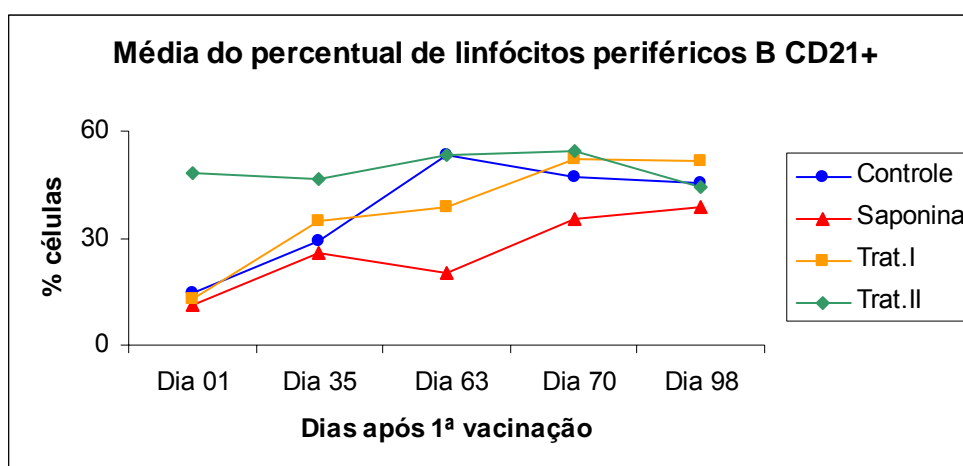


Figura 9- Cinética de linfócitos B CD21⁺ dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

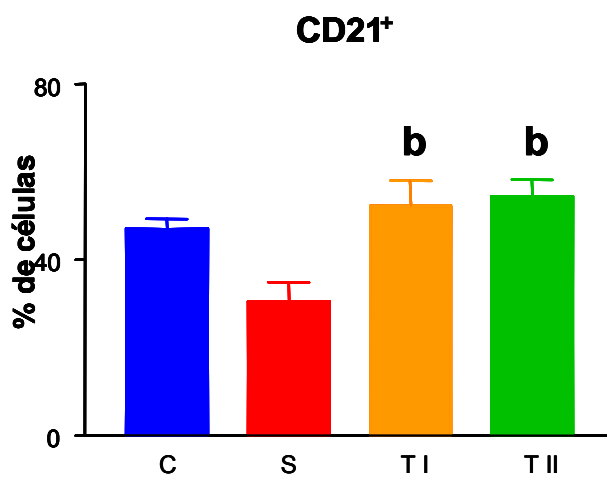


Figura 10- Percentual de linfócitos B CD21⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia setenta. A letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD21⁺ nos grupos Tratamento I e Tratamento II em relação ao grupo Saponina.

5.1.5 Imunofenotipagem da soma dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T WC1⁺ (T Total)

A maior média do percentual de linfócitos T totais no grupo controle foi de 45,44 ($\pm 20,40$) no dia um e o menor valor foi de 26,16 ($\pm 2,22$) no dia setenta. O grupo saponina apresentou seu maior e menor valor de linfócitos T totais respectivamente de 42,37 ($\pm 7,32$) no dia trinta e cinco e de 27,60 ($\pm 15,81$) no dia um. O grupo tratamento I obteve seu maior percentual de 48,23 ($\pm 12,80$) no dia trinta cinco e seu menor valor foi 27,18 ($\pm 8,29$) no dia setenta. Já o grupo tratamento II apresentou seu maior e menor percentual respectivamente de 35,14 ($\pm 26,09$) no dia um e 23,59 ($\pm 3,74$) no dia sessenta e três (Tabela 8 e Figura 11).

Da mesma forma do presente estudo CASTRO (2005) e GONZÁLEZ (2003) observaram a maior média do percentual de linfócitos T totais, pelos peptídeos estudados pelas autoras, no dia trinta e sete e trinta e cinco respectivamente. Estas duas datas correspondem ao período mais próximo após a segunda vacinação e indicam que ocorreu uma maior ativação do sistema imune adquirido na data acima já mencionada. Isto sugere de um modo geral que houve uma maior ativação de células T tardiamente.

Média do percentual de linfócitos T totais					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	45,44 ±20,40	39,74 ±20,94	27,76 ±6,68	26,16 ±2,22	27,60 ±5,91
Saponina	27,60 ±15,81	42,37 ±7,32	37,37 ±8,44	35,67 ±14,4	33,82 ±8,57
Trat.I	34,77 ±7,13	48,23 ±12,80	29,87 ±9,32	27,18 ±8,29	28,62 ±9,34
Trat.II	35,14 ±26,09	28,94 ±11,67	23,59 ±3,74	24,42 ±7,17	31,81 ±7,25

Tabela 8- Média do percentual de linfócitos T CD4⁺ + CD8⁺ + WC1⁺ (T total) obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

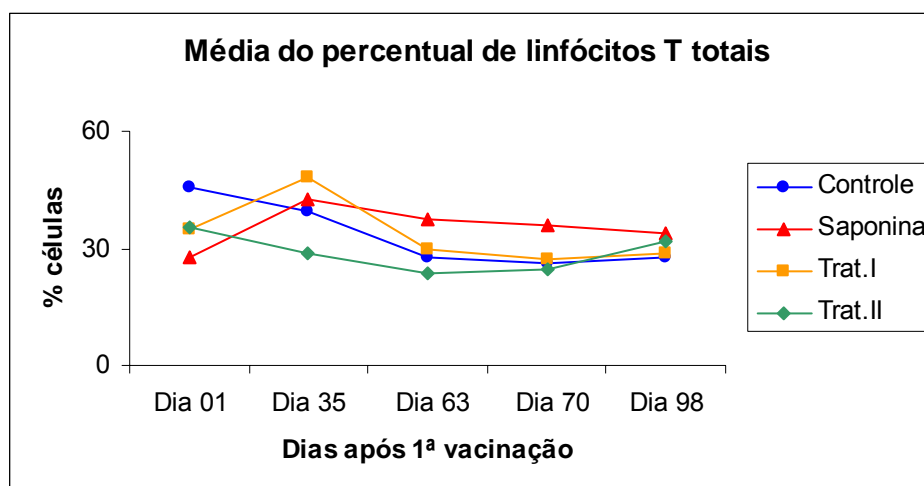


Figura 11- Cinética de linfócitos T totais dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

5.1.6 Células não T e não B (NTNB) do sangue periférico de bovinos

O grupo controle obteve sua maior média do percentual de células NTNB de 40,12 ($\pm 23,92$) no dia um e seu menor valor foi de 18,95 ($\pm 10,46$) no dia sessenta e três (Tabela 9 e Figura 12).

O grupo saponina obteve a maior média de células NTNB durante praticamente todo o experimento quando comparado com os outros grupos. A maior média do percentual para este grupo foi 61,11 ($\pm 21,05$) no dia um. No entanto o menor percentual de células observado foi de 27,30 ($\pm 9,14$) no dia noventa e oito (Tabela 9 e Figura 12).

O grupo tratamento I obteve sua maior media do percentual de células NTNB, como no grupo saponina, no dia um onde o seu valor foi de 52,47 ($\pm 12,55$). Porém este grupo atingiu o menor percentual médio de células NTNB no dia trinta e cinco de 16,81 ($\pm 14,95$) (Tabela 9 e Figura 12).

O grupo tratamento II foi o grupo mais estável quando comparado a media do percentual com os outros grupos. Seu menor valor foi de 21,19 ($\pm 10,99$) no dia setenta. Porém, no dia trinta e cinco observou-se o maior valor de células NTNB onde o grupo atingiu uma média do percentual de 24,63 ($\pm 16,21$) (Tabela 9 e Figura 12).

As células não T e não B (NTNB) correspondem a todos os linfócitos que não se encontram nas sub-populações seguintes: T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ WC1⁺, CD21⁺. Portanto as células NTNB estariam relacionadas à célula matadora natural (NK). O que para o presente trabalho é uma ferramenta valiosa. De acordo com ABBAS (2003) em infecções virais onde o patógeno inibe a expressão de MHC I nas células infectadas, o receptor inibidor das células NK não é engajado, e conseqüentemente, as funções destas células ocorrem adequadamente. Sustentando o argumento anterior, ANFOSSI *et al.*, (2006) e GOFF *et al.*, (2006) afirmam que os linfócitos NK quando encontram com células com expressão diminuída de moléculas de MHC I elas não permanecem muito tempo submetidas a ação de sinais inibitórios iniciados pelo engajamento com receptores específicos de MHC I, podendo assim promover sua função de citotoxicidade e produção de citocinas. Esses dados oferecem um suporte para a hipótese de que estas células possam ter papel importante no controle da infecção por *Babesia bovis*, uma vez que esses parasitos infectam hemácias que conhecidamente não expressam moléculas de MHC I.

GONZÁLEZ (2003) observou ao vacinar seus animais com o peptídeo SBm 7462 anti-carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* uma queda de células NTNB nos animais imunizados. Segundo a autora, esta diferença no percentual destas células fica mais evidente no dia trinta e cinco. Esse resultado também foi observado no presente trabalho com os grupos saponina e tratamento I, sendo que no último grupo citado o decréscimo de células NTNB ficou mais evidente. A autora sugere que a diminuição destas células estaria ligada ao aumento de outros tipos celulares como, por exemplo, linfócitos B e sub-populações de linfócitos T.

BITTAR (2002) em seu trabalho também observou uma diminuição no percentual das células NTNB. De acordo com JAMES (1988) as células NK são responsáveis pela proteção dos animais em estágios precoces de infecção, por controlarem a multiplicação da *Babesia bovis* no pico de parasitemia. Portanto, a autora acredita que a redução destas células em seu estudo está relacionada, provavelmente, à ausência de *B. bovis*.

Média do percentual de células não T e não B (NTNB)					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	40,12 ±23,92	31,15 ±16,59	18,85 ±10,46	26,92 ±3,29	26,99 ±9,61
Saponina	61,11 ±21,08	31,92 ±13,75	42,41 ±7,46	28,87 ±8,52	27,30 ±9,14
Trat.I	52,47 ±12,55	16,81 ±14,95	31,17 ±10,6	20,50 ±4,03	19,96 ±4,74
Trat.II	21,34 ±11,37	24,63 ±16,21	23,00 ±11,03	21,19 ±10,99	23,82 ±8,11

Tabela 9- Média do percentual de linfócitos não T e não B (NTNB) obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

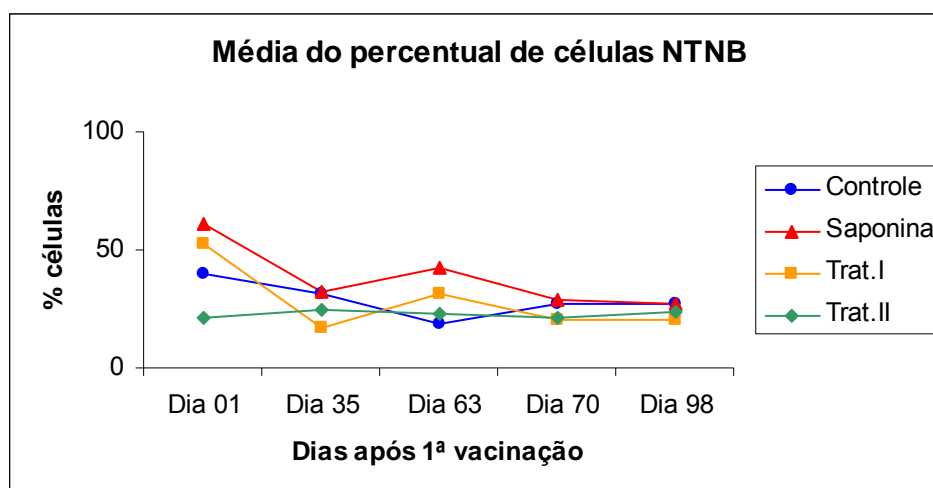


Figura 12- Cinética de linfócitos NTNB dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

5.1.7 Média do Percentual da razão de T CD4⁺/T CD8⁺

O grupo controle apresentou o maior percentual médio na razão CD4⁺/CD8⁺ quando comparado com os outros grupos em todo o experimento. A maior média do percentual para este grupo foi 3,88 ($\pm 4,67$) no dia trinta e cinco e o menor percentual de CD4⁺/CD8⁺ para este grupo foi 1,21 ($\pm 0,33$) no dia noventa e oito (Tabela 10 e Figura 13).

O grupo saponina obteve um aumento no percentual médio da razão de CD4⁺/CD8⁺ ao longo de quase todo experimento. A maior e a menor média do percentual para este grupo foi de 3,17 ($\pm 1,06$) no dia setenta e 1,53 ($\pm 1,16$) no dia um (Tabela 10 e Figura 13).

O grupo tratamento I obteve uma queda na média do percentual da razão de CD4⁺/CD8⁺, do início ao fim do experimento. O maior valor para este grupo foi 2,55 ($\pm 2,34$) no dia um do experimento enquanto o menor valor foi 1,45 ($\pm 0,26$) no dia noventa e oito (Tabela 10 e Figura 13).

No grupo tratamento II a maior média do percentual de CD4⁺/CD8⁺ foi 0,99 ($\pm 0,73$) no dia trinta e cinco. A partir desta data foi observado um decréscimo na média do percentual de CD4⁺/CD8⁺, onde este grupo terminou o experimento com o valor 0,54 ($\pm 0,38$) no dia noventa e oito (Tabela 10 e Figura 13). Quando analisado a razão do percentual de linfócitos T CD4⁺/TCD8⁺ no dia sessenta e três e no dia setenta entre os grupos observou-se uma diferença estatisticamente significativa do grupo tratamento II em relação ao grupo saponina (Figura 14 e 15).

A razão de CD4⁺/CD8⁺ nos indica a proporção das duas células durante toda a coleta de PBL. A partir desses dados fica claro que houve uma maior participação de células T CD4⁺ em relação a T CD8⁺ no grupo tratamento I ao longo de todo o experimento. De fato T CD4⁺ tem uma maior importância no controle da babesiose do que T CD8⁺ como já citado anteriormente. Além disso, RHODES *et al.*, (2000) afirma a população de T CD4⁺ é considerada uma das populações mais envolvidas nas respostas imunes adquiridas na maioria dos antígenos protéicos. Os dados do presente trabalho para o grupo tratamento I corroboram com os dados de CASTRO (2005), GONZÁLEZ (2003), e BITTAR (2002) que também observaram em seus respectivos estudos uma maior proporção de T CD4⁺ em relação a T CD8⁺. No entanto, quando se observa a razão de T CD4⁺ em relação a T CD8⁺, no grupo tratamento II, é notado que esta última população esteve maior durante todo o

experimento (Figura 3 e 5). Na verdade essa proporção se deve por uma ativação precoce de T CD4⁺ no grupo tratamento I, como já discutido anteriormente.

Quando comparado o percentual das populações de T CD8⁺ do grupo tratamento I com o grupo tratamento II observa-se um menor percentual de células T CD8⁺ para o ultimo grupo citado ao longo de quase todo o experimento.

Média do percentual da razão T CD4+/CD8+					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	2,30 ±1,99	3,88 ±4,67	1,61 ±0,40	1,83 ±1,09	1,21 ±0,33
Saponina	1,53 ±1,16	1,58 ±0,49	2,83 ±1,01	3,17 ±1,06	1,61 ±0,48
Trat.I	2,55 ±2,34	2,20 ±0,80	2,01 ±0,84	1,71 ±0,19	1,45 ±0,26
Trat.II	0,78 ±0,50	0,99 ±0,73	0,78 ±0,35	0,61 ±0,63	0,54 ±0,38

Tabela 10- Média do percentual da razão de T CD4⁺/CD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

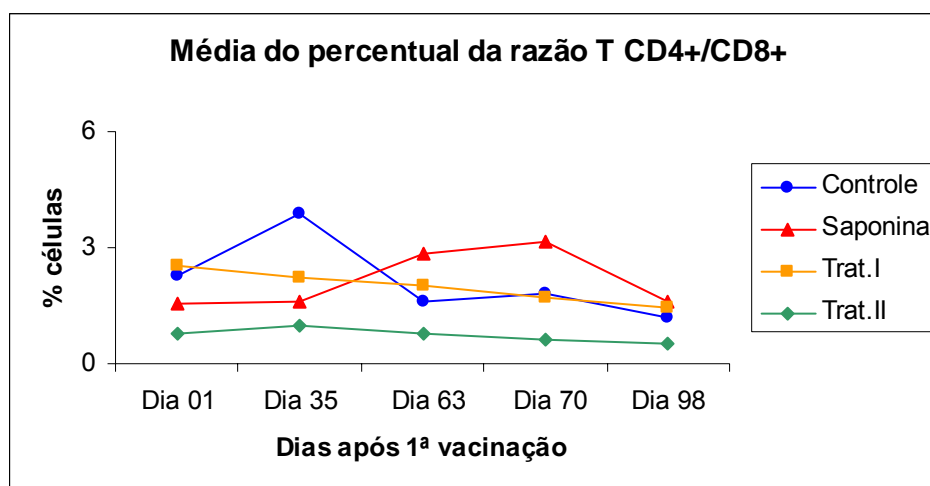


Figura 13- Cinética de linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺ dos grupos Controle, Saponina Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

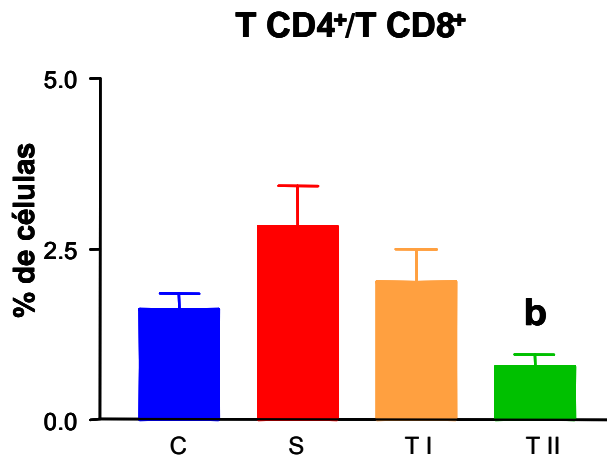


Figura 14 –Razão do percentual de linfócitos TCD4⁺/TCD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia sessenta e três. A letra b representa diferença significativa da razão do percentual de células TCD4⁺/TCD8⁺ no grupo Tratamento II em relação ao grupo Saponina

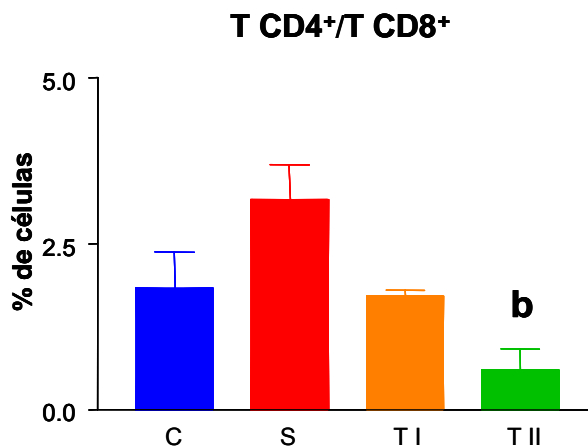


Figura 15 –Razão do percentual de linfócitos TCD4⁺/TCD8⁺ obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL) nos grupos Controle (C), Saponina (S), Tratamento I (TI) e Tratamento II (TII) no dia setenta. A letra b representa diferença significativa da razão do percentual de células TCD4⁺/TCD8⁺ no grupo Tratamento II em relação ao grupo Saponina.

5.1.8 Percentual médio da razão de T/B

O grupo controle foi o que mais variou ao longo do experimento. A maior média do percentual foi 5,16 ($\pm 4,26$) enquanto seu menor valor foi 0,55 ($\pm 0,20$). Estes resultados ocorreram nos dias um e sessenta e três respectivamente (Tabela 11 e Figura 16).

Para o grupo saponina observou-se uma queda ao longo de todo o experimento em relação a sua média do percentual de T/B. O maior valor para este grupo foi 2,78 ($\pm 1,03$) no dia trinta e cinco enquanto seu menor valor foi 0,93 ($\pm 0,37$) no dia noventa e oito (Tabela 11 e Figura 16).

O grupo tratamento I obteve uma queda ao longo de quase todo experimento na média do percentual de T/B. No dia um do experimento este grupo obteve seu maior valor 3,62 ($\pm 2,48$), e no dia setenta este grupo obteve seu menor valor 0,57 ($\pm 0,33$) (Tabela 11 e Figura 16).

O grupo tratamento II praticamente não variou, sendo este o grupo mais estável. Sua maior média do percentual de T/B foi 0,82 ($\pm 0,80$) no dia um antes da primeira vacinação e seu menor valor ocorreu em duas coletas de PBL seguidas 0,45 ($\pm 0,07$) e 0,45 ($\pm 0,14$) no dia sessenta e três e setenta, respectivamente (Tabela 11 e Figura 16).

Ambos os grupos vacinados com peptídeo sintético mostraram um aumento da população de linfócitos B em relação aos linfócitos T ao longo do experimento. Esse aumento da população de linfócitos B em relação a T fica muito mais evidente no grupo tratamento I. Isto se deve ao fato da população de células B já se apresentarem extremamente altas desde o início do experimento. Este aumento na população de linfócitos B em relação a T e no aumento de IgG já citado no tópico pertinente as células CD21⁺ sugere que as células B são importantes no controle da fase crônica da infecção por *Babesia bovis*.

WELSH *et al.* (2002) sustentado o argumento anterior em seus estudos já demonstrava que a imunidade humoral também é considerada importante na avaliação da resposta a imunógenos peptídicos do tipo sintético. A importância dos linfócitos B também é descrita por BROWN *et al* (1998) quando a autora afirma que uma ótima proteção imune contra as infecções pela babesia está relacionada ao requerimento do complemento, anticorpos opsonizados e ativação de macrófagos.

GONZÁLEZ (2003) ao longo do seu trabalho também observou como no presente estudo um aumento da população de células B em relação a T. Sustentando mais uma vez a importância das células B no controle da fase crônica da infecção por *Babesia bovis*.

Média do percentual da razão T/B					
Grupo	Dia 01	Dia 35	Dia 63	Dia 70	Dia 98
Controle	5,16 ±4,26	1,56 ±1,14	0,55 ±0,20	0,56 ±0,10	0,63 ±0,18
Saponina	2,62 ±1,03	2,78 ±2,96	2,30 ±1,18	1,20 ±0,89	0,93 ±0,37
Trat.I	3,62 ±2,48	1,39 ±0,33	1,15 ±0,84	0,57 ±0,33	0,64 ±0,45
Trat.II	0,82 ±0,80	0,65 ±0,27	0,45 ±0,07	0,45 ±0,14	0,77 ±0,33

Tabela 11- Média do percentual da razão de T/B obtidos de leucócitos do sangue periférico (PBL). As vacinações foram realizadas nos dias 1, 30, e 60.

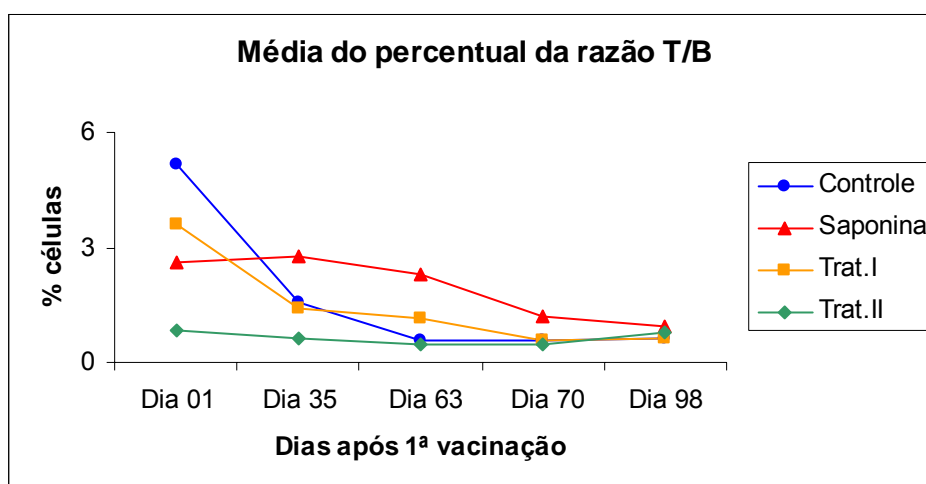


Figura 16- Cinética de linfócitos T/B dos grupos Controle, Saponina, Tratamento I e Tratamento II durante as coletas de PBL.

5.2 Avaliação da produção da citocina IL-4 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que os grupos saponina, tratamento I, tratamento II apresentaram uma resposta similar quando comparados entre si. Nos três grupos citados acima observou-se que o PBMC estimulado após dezoito horas de cultura e coletado após 5 dias de cultivo com os peptídeos sintéticos SBm7462 e SBbo 23290 apresentou a menor produção de IL-4 quando comparado aos controles negativos (sem estímulo) e positivos (Concavalina A) (Figuras 18, 19 e 20)

No entanto, no grupo controle observou-se que o PBMC estimulado após dezoito horas de cultura e coletado após 5 dias de cultivo com os peptídeos sintéticos SBm7462 e SBbo 23290 apresentou maior produção de IL-4 quando comparado aos controles negativos (sem estímulo) e positivos (Concavalina A) (Figura 17).

Vários parâmetros podem ser analisados em testes de memória imunológica, sendo um deles a produção de determinadas citocinas envolvidas com a proteção do hospedeiro (BROWN et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1996). Segundo TANCHOT e ROCHA (1998), a produção e secreção de citocinas qualificam uma célula como efetora, sendo que, a quantificação destas proteínas constitui-se em um método eficaz de estudo dos mecanismos efetores envolvidos na resposta imune.

BALDWIN *et al.*, (2002) trabalhando com sangue periférico bovino de animais que foram vacinados contra *Leptospira borgpetersenii* e reestimulados com antígenos do mesmo microorganismo em cultura de PBMC constatou pela técnica de imunofluorescência e citometria de fluxo que quando analisado a secreção de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 pelas células $T\gamma\delta$ foi somente observado a secreção de $IFN\gamma$. ROGERS *et al.*, (2005) afirma que as células $T\gamma\delta$ WC1.1⁺ após a vacinação secretam $IFN\gamma$ e estimulam uma resposta imune do tipo 1. Principalmente se a vacina for contra bactérias intracelular, protozoários patogênicos e vírus.

Além das hipóteses já citadas anteriormente envolvendo e provando mais uma vez a importância das células $T\gamma\delta$ na resposta imune de bovinos, as células T $CD4^+$, de acordo com BROWN *et al.*, (1998), tem um papel crucial na imunidade contra a Babesiose. As células T $CD4^+$ secretam $IFN\gamma$ que ativa monócitos/

macrófagos a fagocitarem o agente agressor (*Babesia*) e produzir NO. Este fenômeno é uma forte evidencia da correlação positiva entre a produção de IFN γ e IgG2a.

No presente trabalho houve uma ativação de células T CD4⁺ no tratamento I juntamente com um aumento de células T CD8⁺ e T WC1⁺. Isto sugere que provavelmente tenha ocorrido uma ativação destas populações através da secreção de IFN γ , proporcionando o aumento destas células no sangue periférico dos animais submetidos ao tratamento I (Figura 3, Figura 5, Figura 8). No entanto para o presente trabalho existem três possibilidades plausíveis para a secreção do IFN γ . Primeira hipótese: as células NK após a vacinação estariam entrando em contato com os peptídeos e estes estariam induzindo este linfócito a secretar primariamente IFN γ "in vivo" e "in vitro" (GOFF *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2006). Em uma segunda hipótese, as células T $\gamma\delta$ WC1⁺ concomitantemente com as células T CD4⁺ ao entrarem em contato com os peptídeos seriam induzidas a secretar primariamente IFN γ como parte de uma resposta do tipo 1 (ROGERS *et al.*, 2005 ; BROWN *et al.*, 2006). Em uma terceira hipótese, as células T $\gamma\delta$ WC1⁺ estariam apresentando antígenos para T CD4⁺ e induzindo que esta célula proliferasse também com o auxílio do IFN γ (COLLINS *et al.*, 1998).

Estudos realizados por FREITAS (2001) com o peptídeo SBbo 23290 demonstraram níveis elevados de citocinas do tipo 1 com por exemplo IFN γ , TNF α e IL-12. GONZÁLEZ (2003) trabalhando com peptídeo SBm7462 observou ausência de citocinas do tipo 1 e resposta polarizada do tipo 2. Com base nestes estudos torna-se plausível a hipótese de que no presente trabalho o peptídeo SBbo23290 possui uma predominância sobre o peptídeo SBm7462 mas não necessariamente excluindo a ação da citocina IL-4.

Outra hipótese importante adicionando às anteriores é que ambas as citocinas poderiam agir juntas sem uma estar prejudicando totalmente a ação da citocina antagônica. No entanto mais estudos devem ser desenvolvidos para que ocorra uma maior compreensão do assunto.

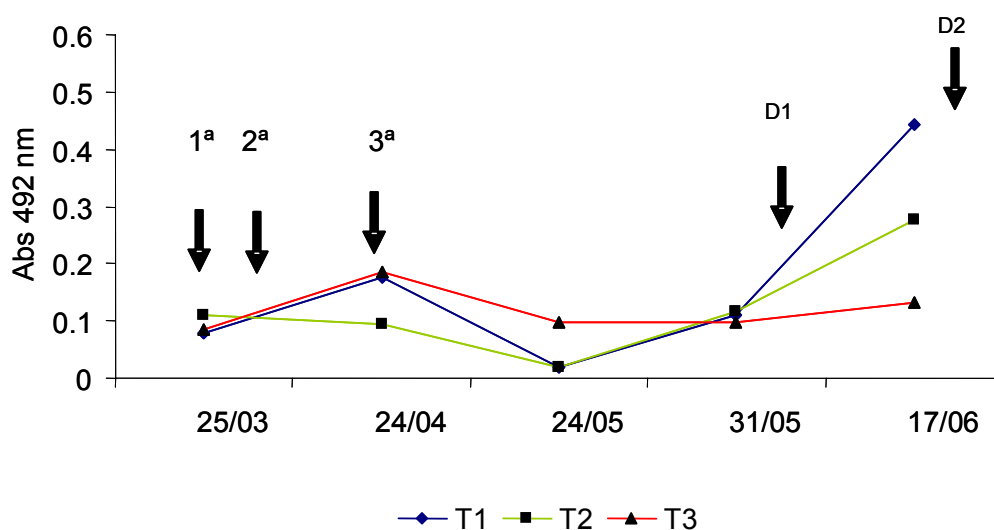


Figura 17- Dosagem da citocina IL-4 para o grupo Controle. Controle Positivo (T1); Controle Negativo (T2); Grupo estimulado com os peptídeos SBbo 23290 SBm 7462 (T3). As setas representam os dias das três vacinações e dos desafios com *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (D1) e *Babesia bovis* (D2). As datas representam o dia da coleta do sobrenadante.

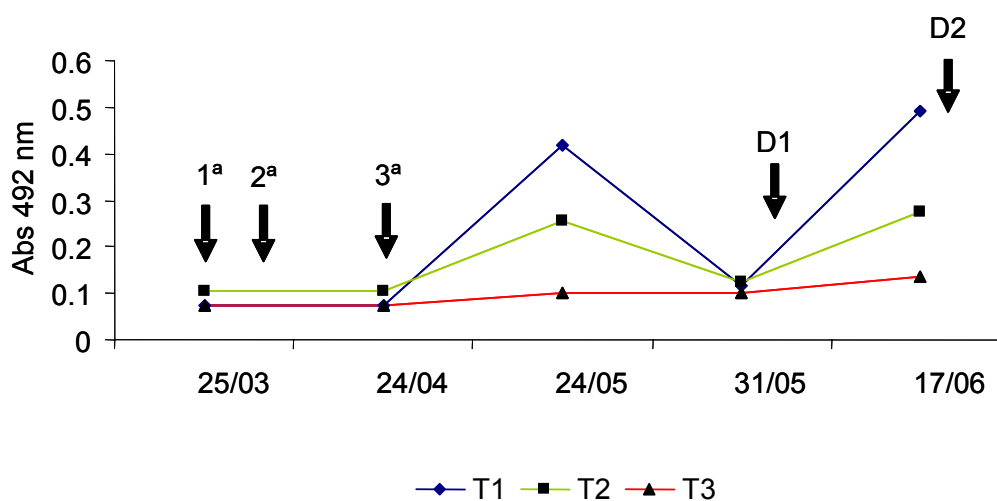


Figura 18- Dosagem da citocina IL-4 para o grupo Saponina. Controle Positivo (T1); Controle Negativo (T2); Grupo estimulado com os peptídeos SBbo 23290 SBm 7462 (T3). As setas representam os dias das três vacinações e dos desafios com *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (D1) e *Babesia bovis* (D2). As datas representam o dia da coleta do sobrenadante.

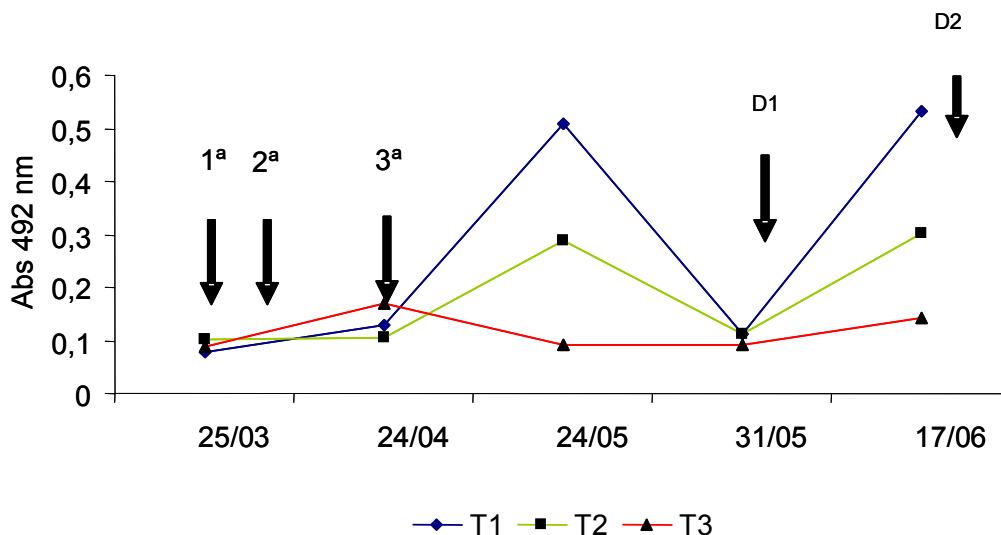


Figura 19-Mensuração da citocina IL-4 para o grupo de animais submetidos ao Tratamento I. Controle Positivo (T1); Controle Negativo (T2); Grupo estimulado com os peptídeos SBbo 23290 SBm 7462 (T3). As setas representam os dias das três vacinações e dos desafios com *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (D1) e *Babesia bovis* (D2). As datas representam o dia da coleta do sobrenadante.

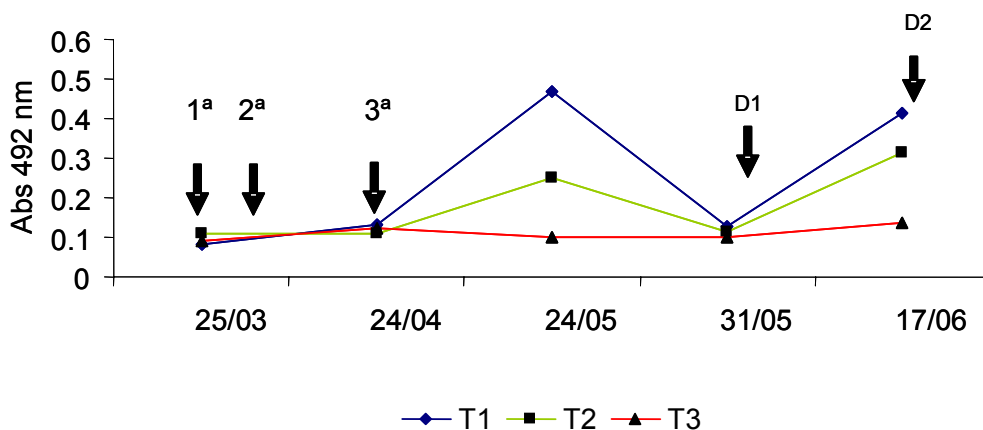


Figura 20- Dosagem da citocina IL-4 para o grupo de animais submetidos ao Tratamento II. Controle Positivo (T1); Controle Negativo (T2); Grupo estimulado com os peptídeos SBbo 23290 SBm 7462 (T3). As setas representam os dias das três vacinações e dos desafios com *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (D1) e *Babesia bovis* (D2). As datas representam o dia da coleta do sobrenadante.

6. CONCLUSÕES

Os peptídeos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462 no Tratamento I e II utilizando saponina como adjuvante, provocaram alterações no perfil de linfócitos do sangue periférico.

Houve oscilações nas sub-populações de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ do sangue periférico dos bovinos ao longo de todo estudo com a utilização dos tratamentos I e II.

A sub-população de linfócito B CD21⁺ foi a que mais aumentou ao longo do estudo nos grupos, Tratamento I e Saponina e a que esteve mais alta durante todo o estudo no tratamento II.

O adjuvante saponina provocou oscilações ao estimular as sub-populações de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ do sangue periférico dos bovinos ao longo de todo estudo.

Na comparação somente da resposta imune celular entre os grupos que se utilizou os peptídeos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462 o Tratamento I se destacou em relação ao Tratamento II no início do estudo com um maior aumento das sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

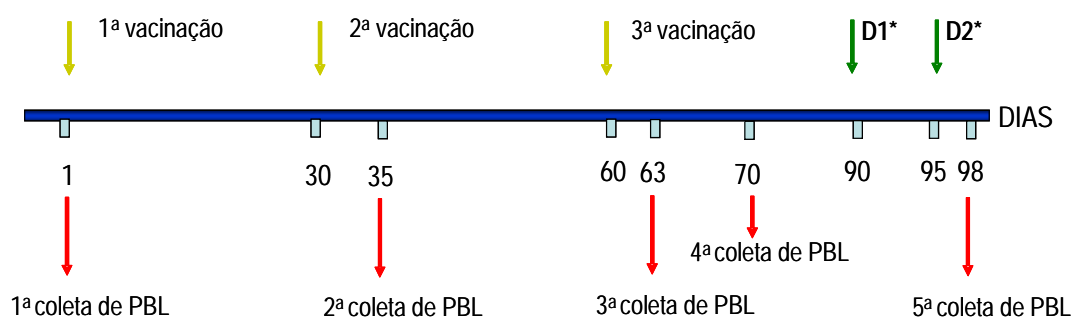
Os Tratamentos I, II e o adjuvante saponina induziram baixos níveis da produção de IL-4.

Mais estudos serão necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos da resposta imune celular utilizando os peptídeos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462 simultaneamente como imunógenos.

7. ANEXOS

Como descrito anteriormente todos os gráficos que não foram estatisticamente significativos foram adicionados neste item. Eles são de grande importância, pois ilustram e tornam a compreensão do presente mais didático e completo.

Tabela 2 - Dias referentes à coleta de PBL e Desafio



* D1 = **Desafio com *Ripicephalus (Boophilus) microplus***

* D2 = **Desafio com *Babesia bovis***

7.1 Comparação de cada grupo de bovinos em diferentes coleta (Tempo) do sangue periférico

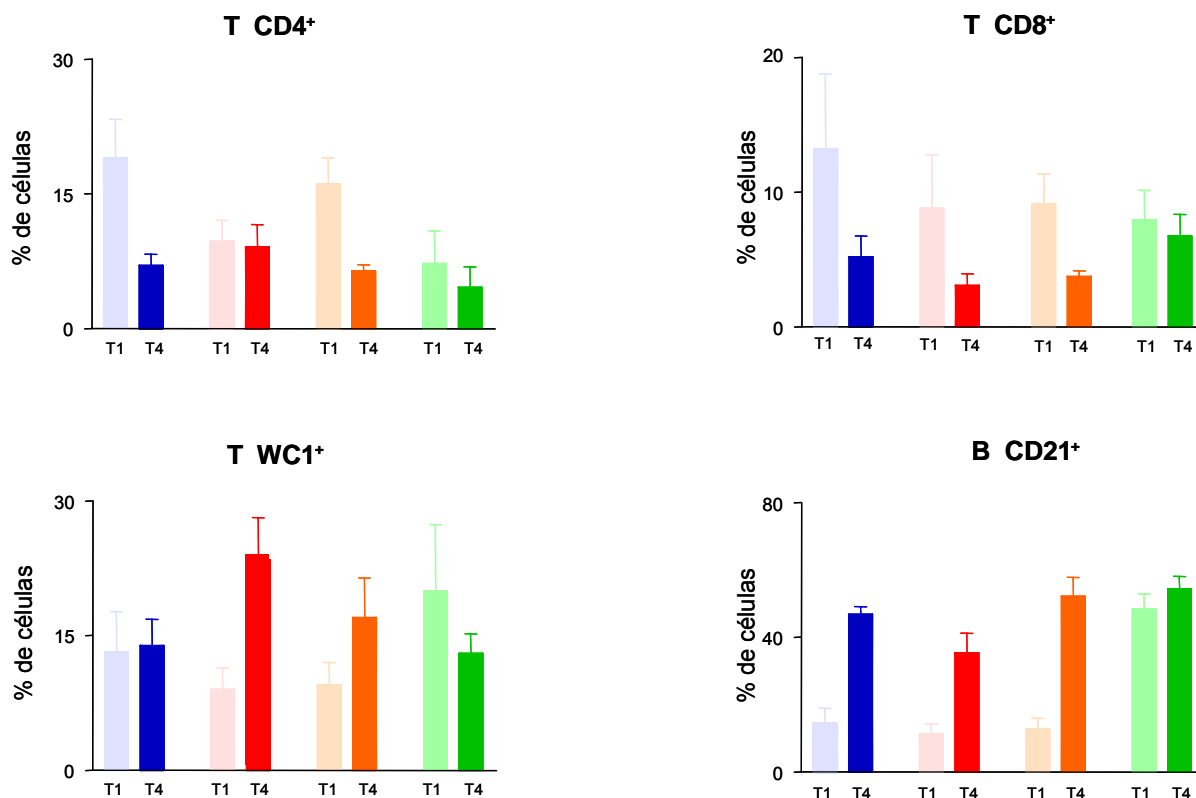


Figura 21: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 4(T4). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

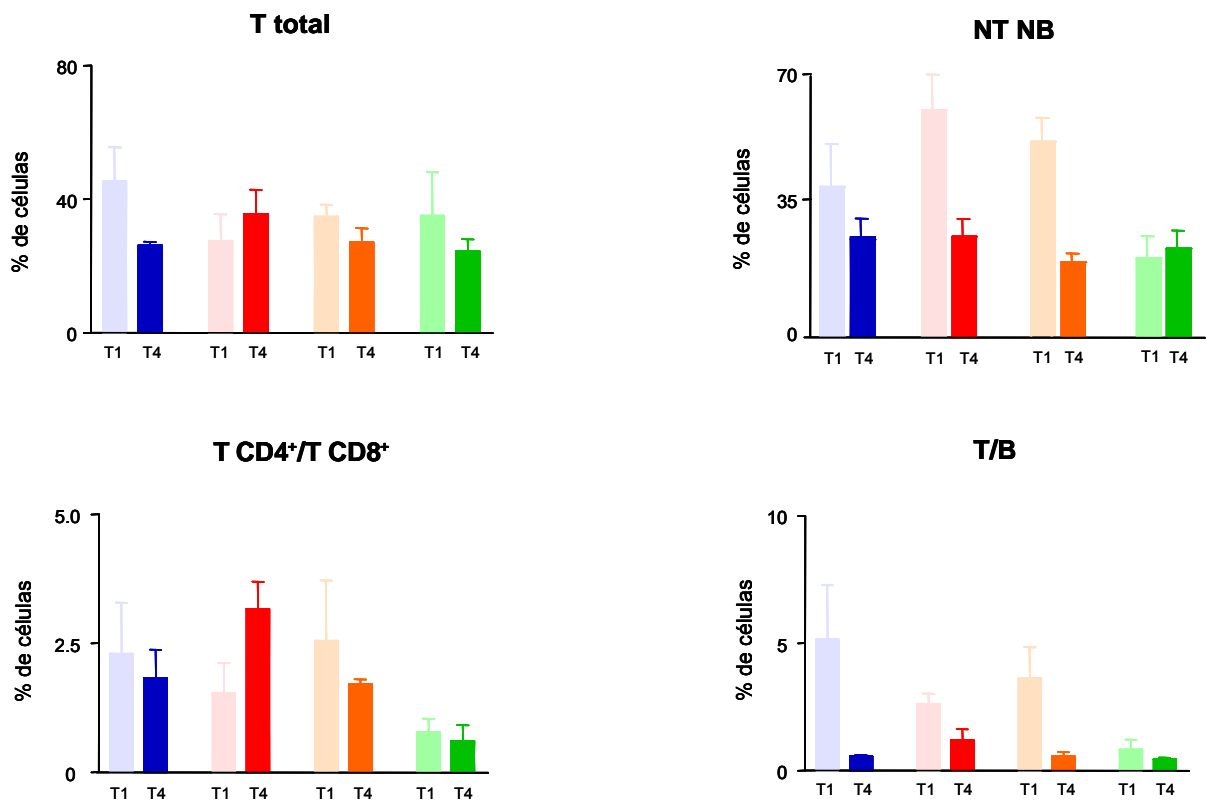


Figura 22: Média do percentual de células das populações T total, NTN B e das razões TCD4⁺/ CD8⁺ e T/B respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 4(T4). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

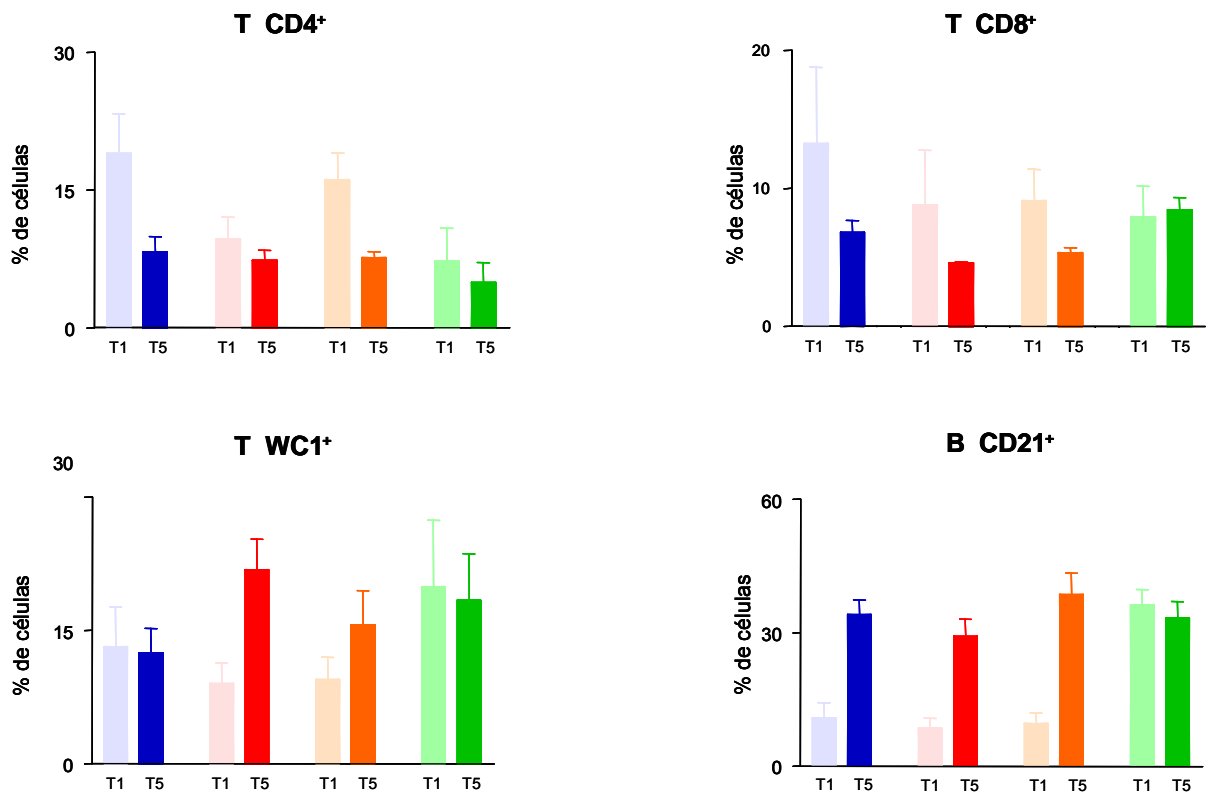


Figura 23: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 5(T5). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

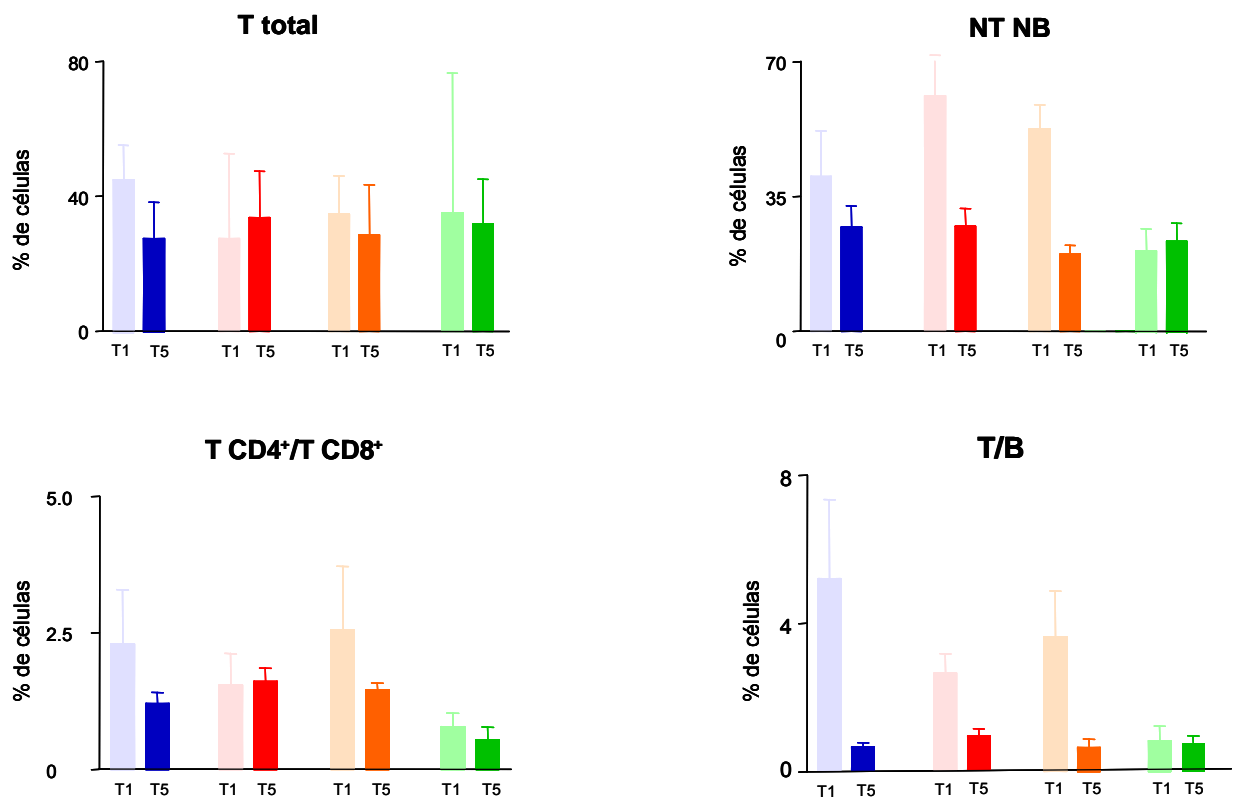


Figura 24: Média do percentual de células das populações T total, NTNB e das razões TCD4⁺/ CD8⁺ e T/B respectivamente, no tempo 1(T1) e tempo 5(T5). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

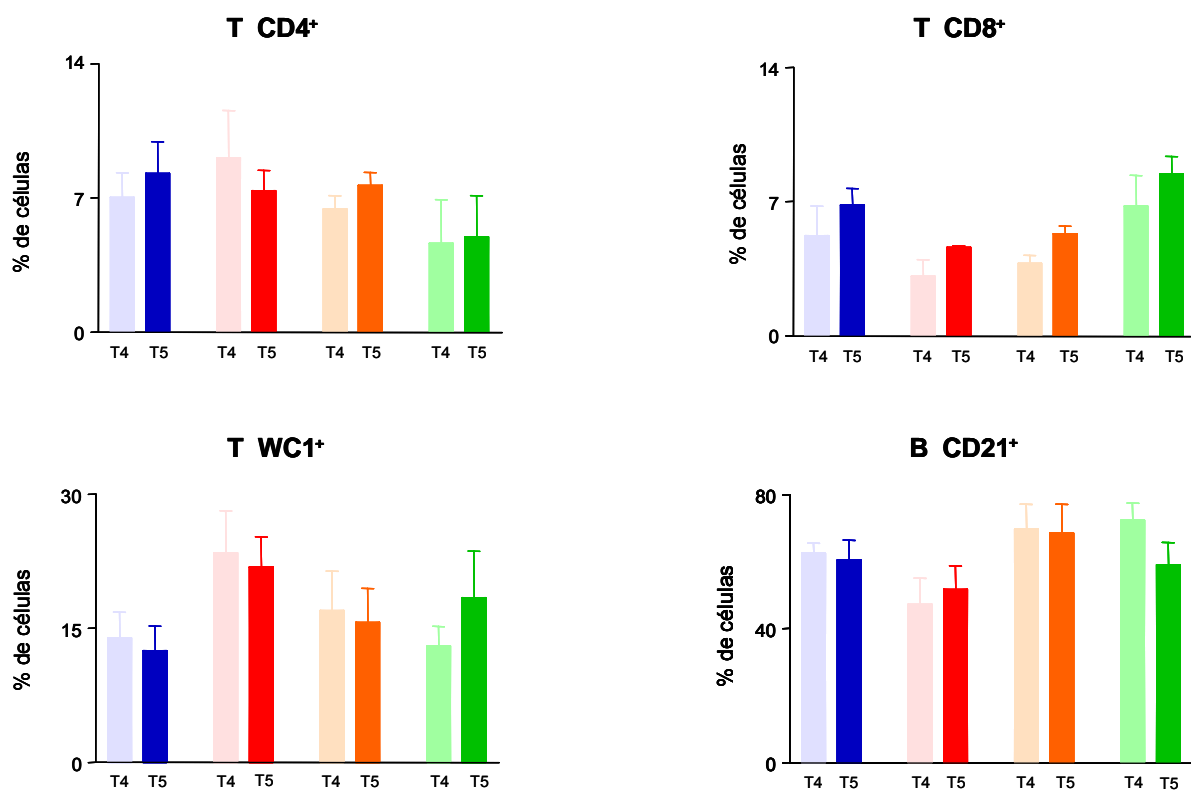


Figura 25: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e B CD21⁺ respectivamente, no tempo 4(T4) e tempo 5(T5). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

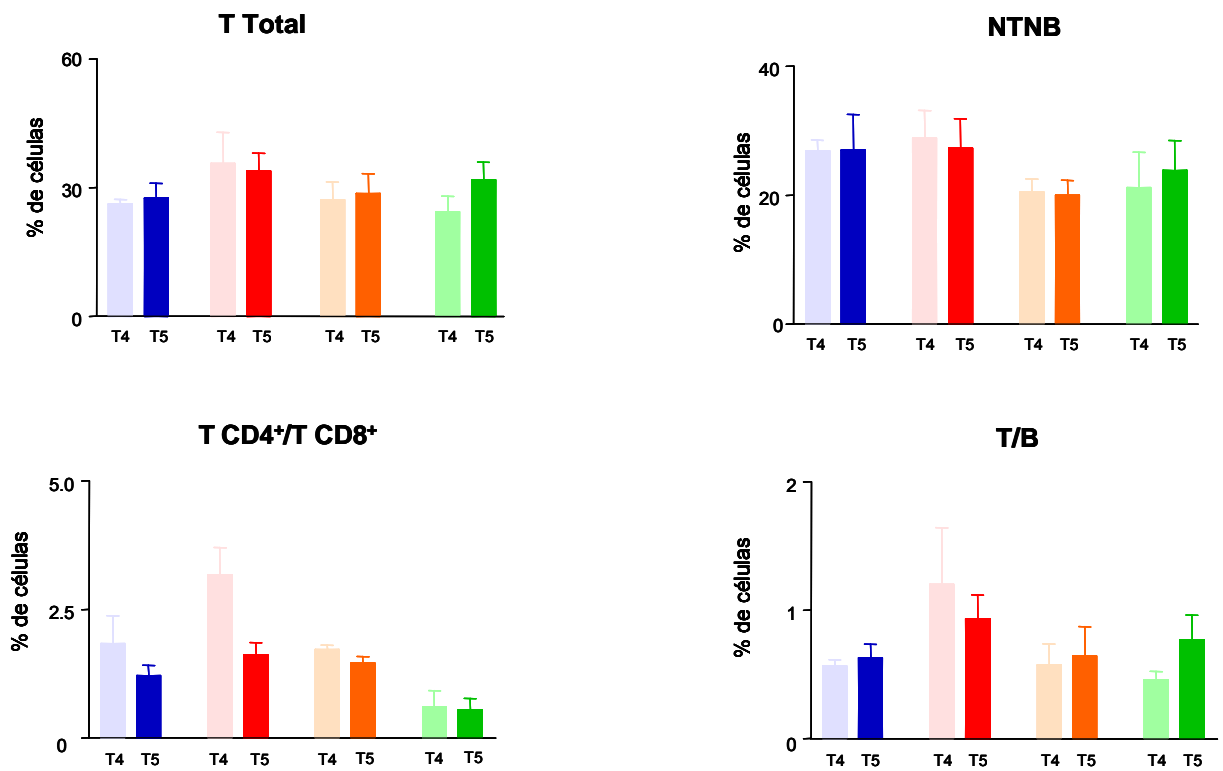


Figura 26: Média do percentual de células das populações T total, NTNB e das razões TCD4⁺/ CD8⁺ e T/B respectivamente, no tempo 4(T4) e tempo 5(T5). Controle (Azul); Saponina (Vermelho); Tratamento I (Laranja); Tratamento II (Verde). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Wilcoxon.

7.2 Comparação entre todos os grupos de bovinos na mesma coleta (Tempo) de sangue periférico

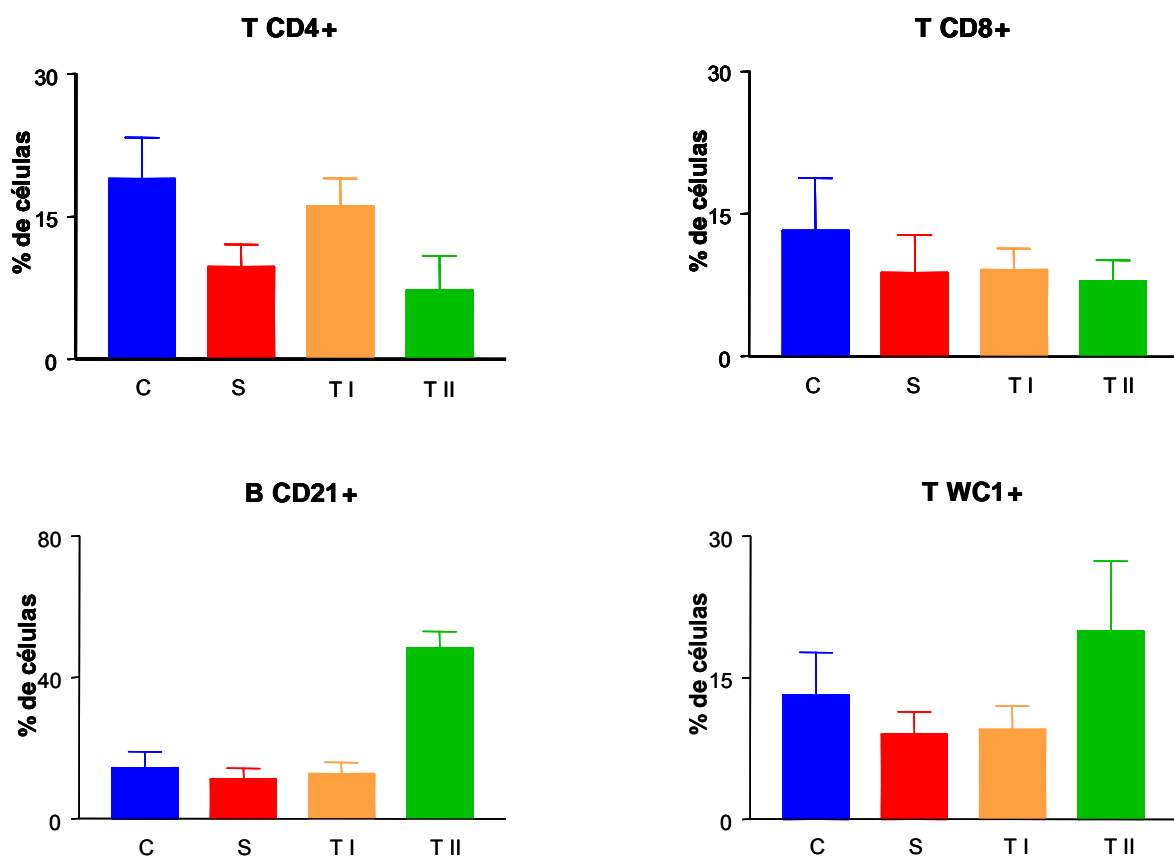


Figura 27: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, B CD21⁺ e T WC1⁺ respectivamente, no tempo 1. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

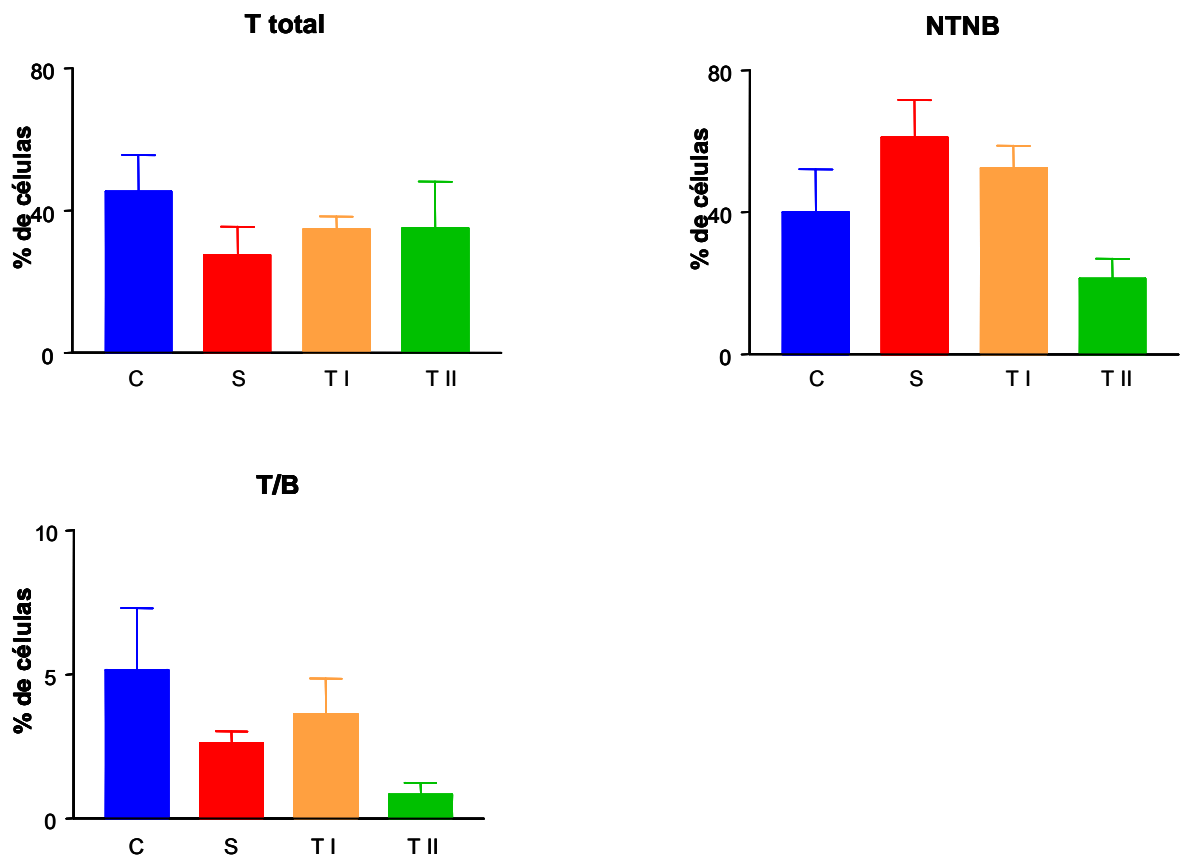


Figura 28: Média do percentual de células das populações T total, NTNB e da razão T/B respectivamente, no tempo 1. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

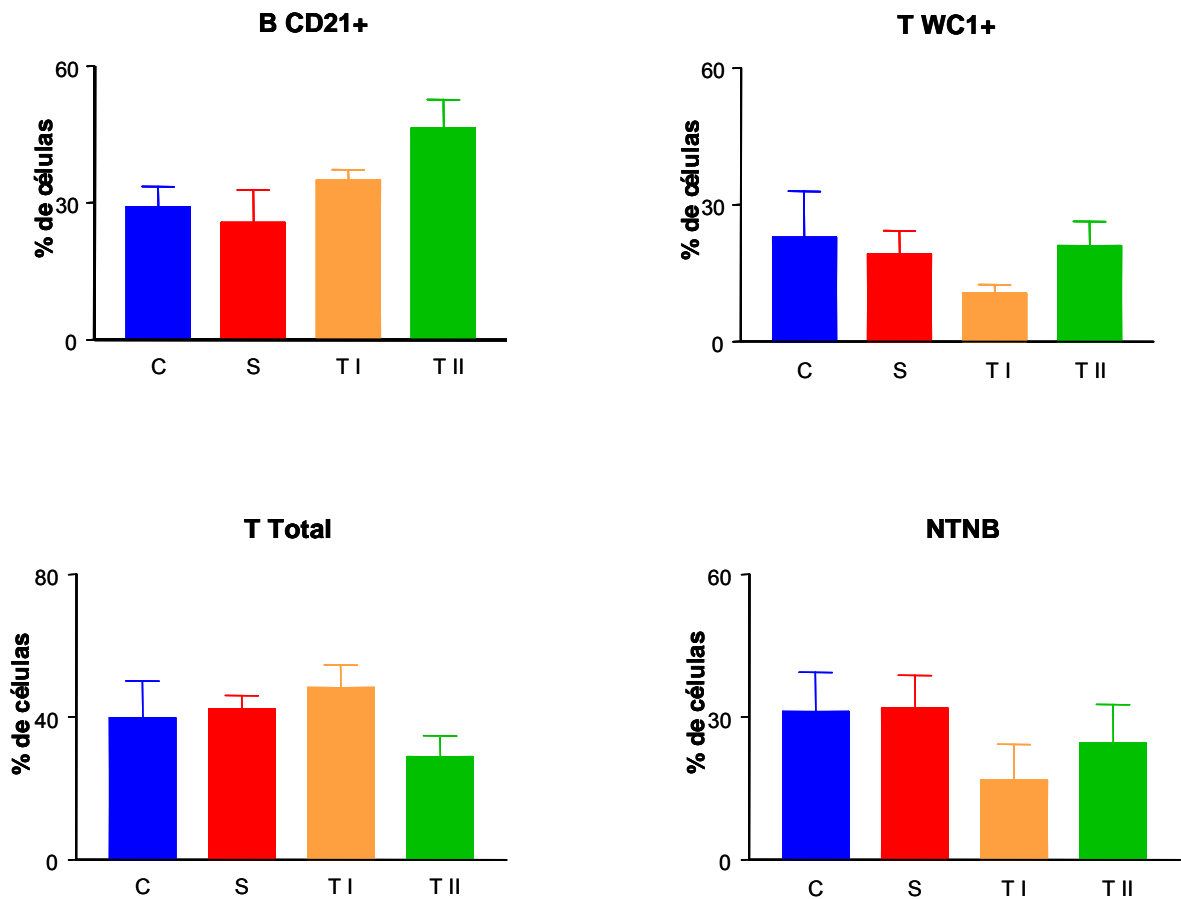


Figura 29: Média do percentual de células das populações B CD21⁺, T WC1⁺, T total e NTNB respectivamente, no tempo 2. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney.

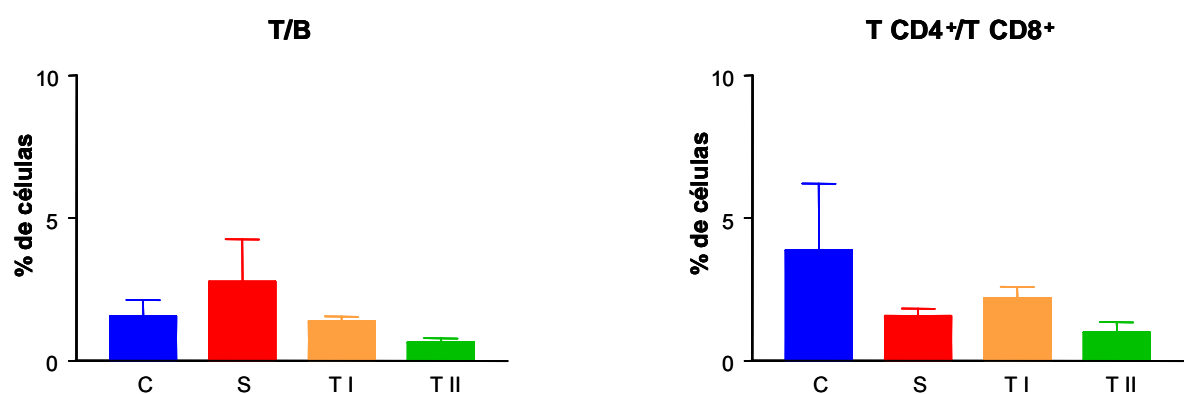


Figura 30: Média do percentual de células das razões T/B e TCD4⁺/CD8⁺ respectivamente, no tempo 2. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney.

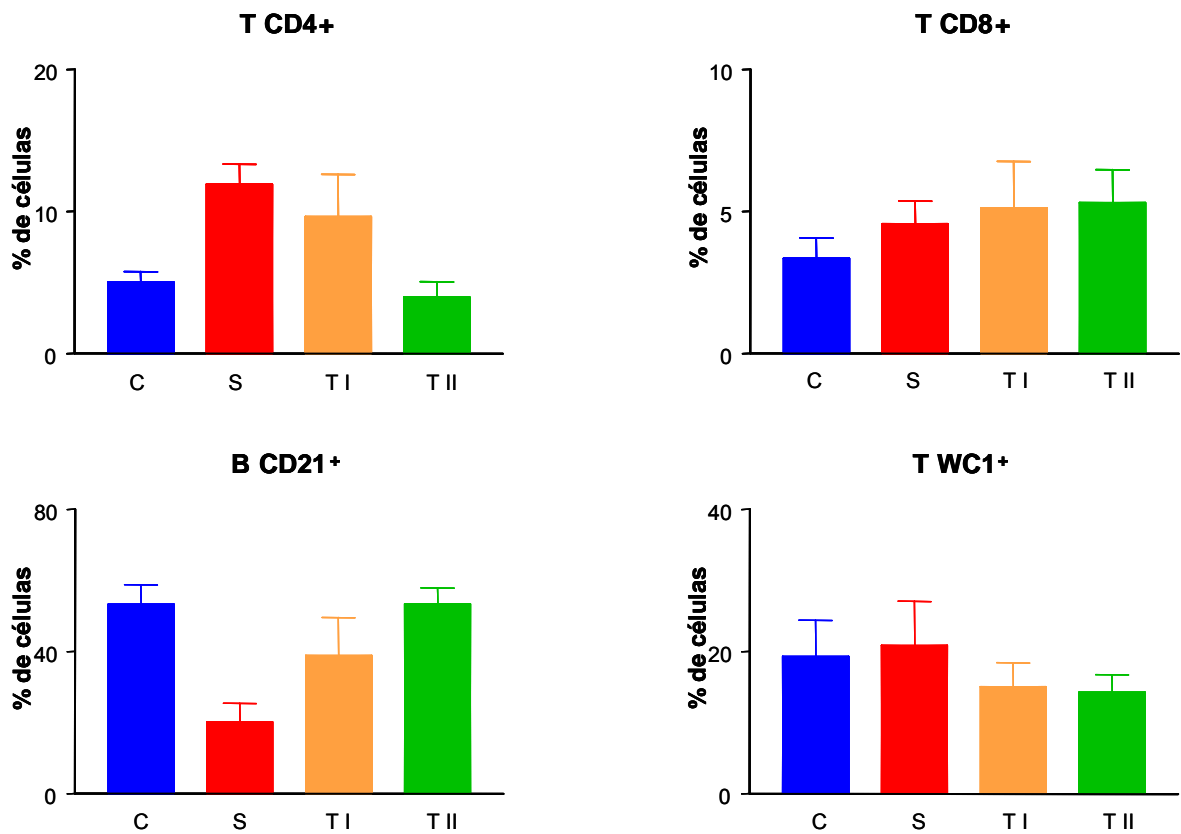


Figura 31: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, B CD21⁺ e T WC1⁺ respectivamente, no tempo 3. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

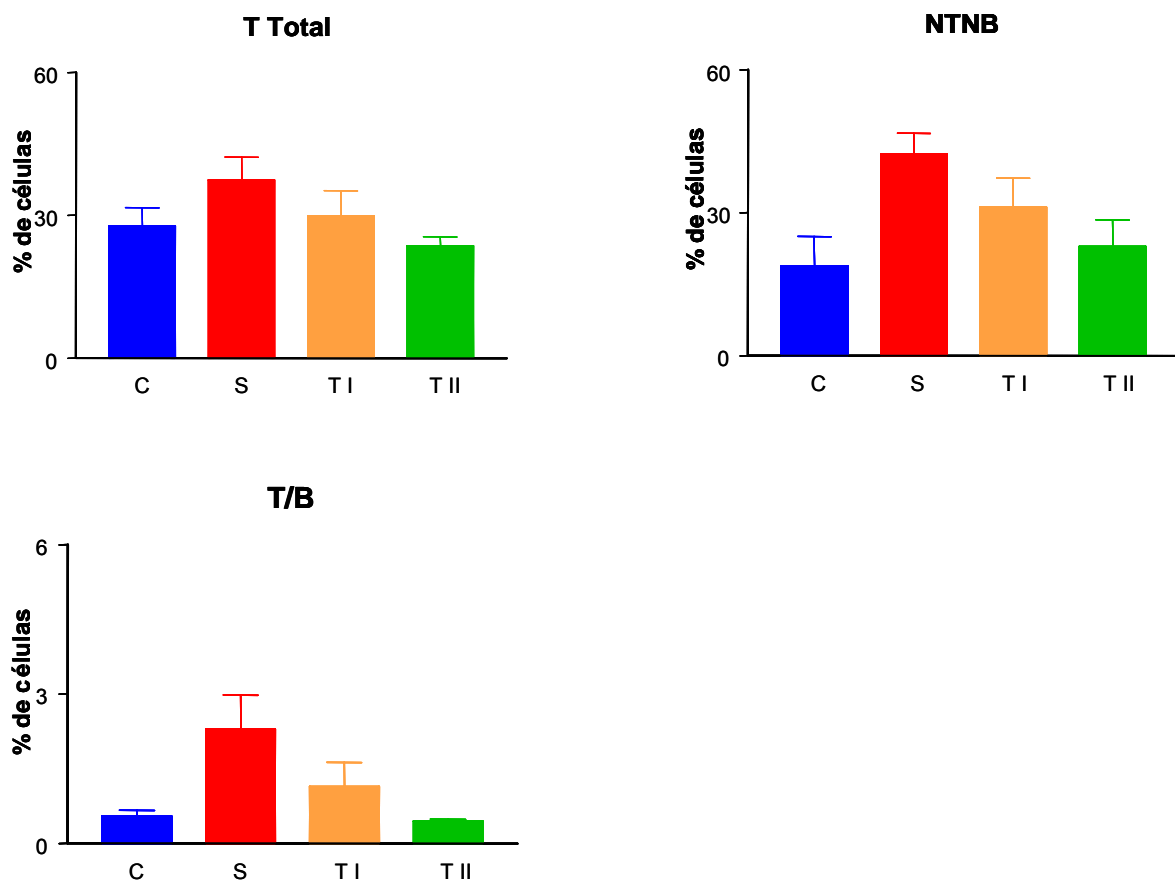


Figura 32: Média do percentual de células das populações T total, NTNB e da razão T/B respectivamente, no tempo 3. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

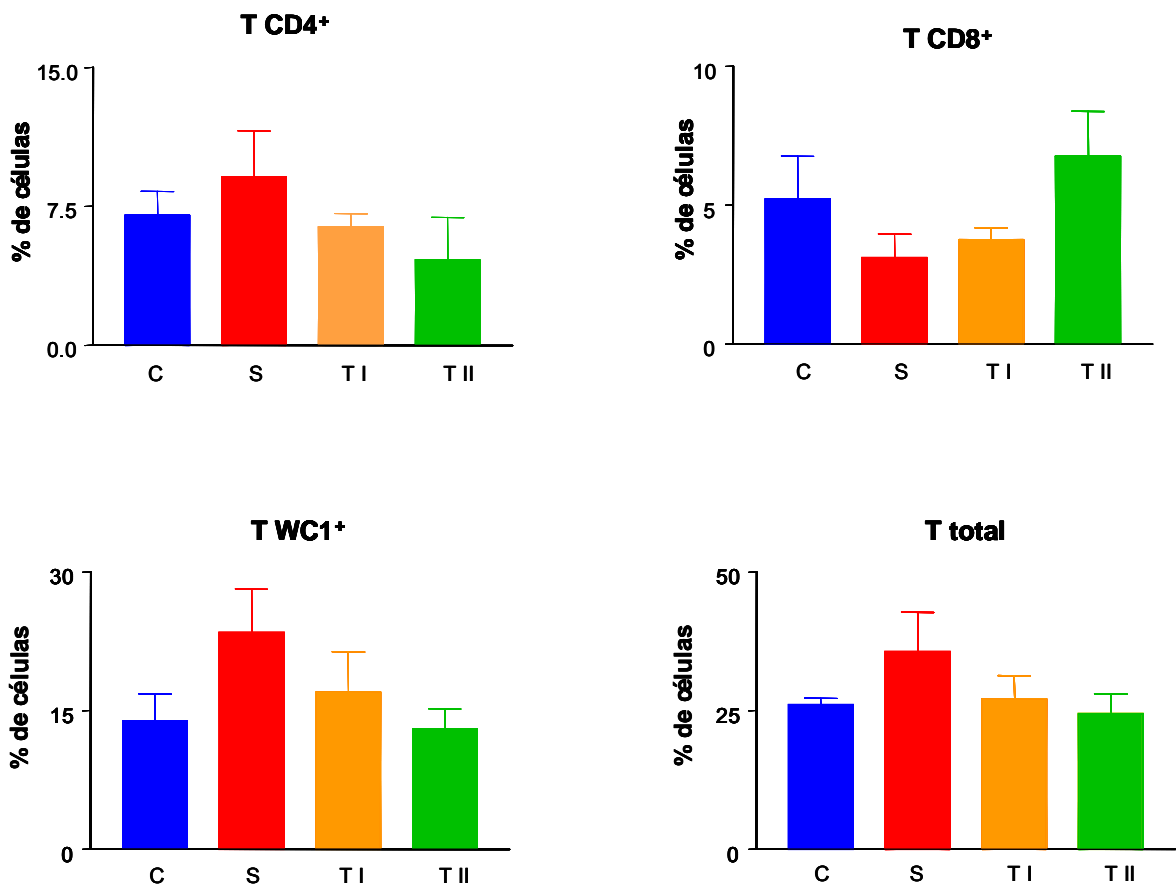


Figura 33: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, T CD8⁺, T WC1⁺ e T total respectivamente, no tempo 4. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

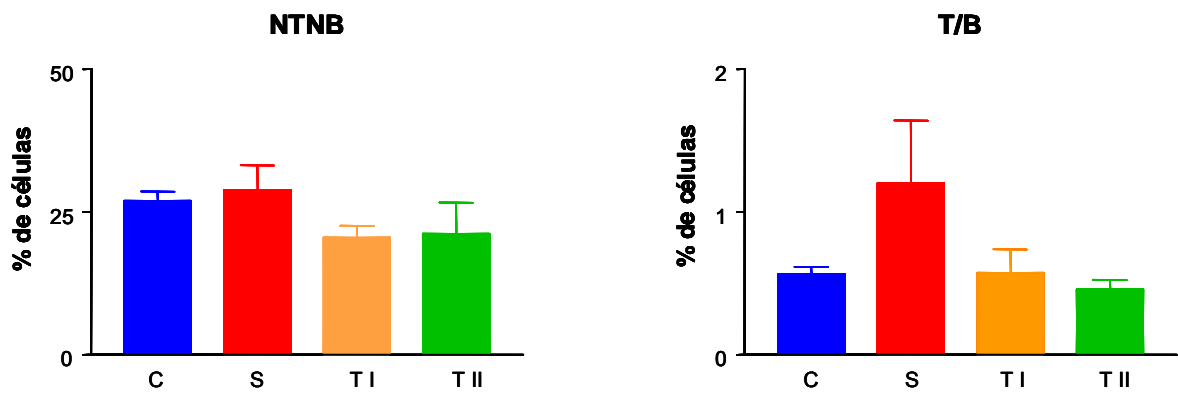


Figura 34: Média do percentual de células da população NTNB e da razão T/B respectivamente, no tempo 4. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

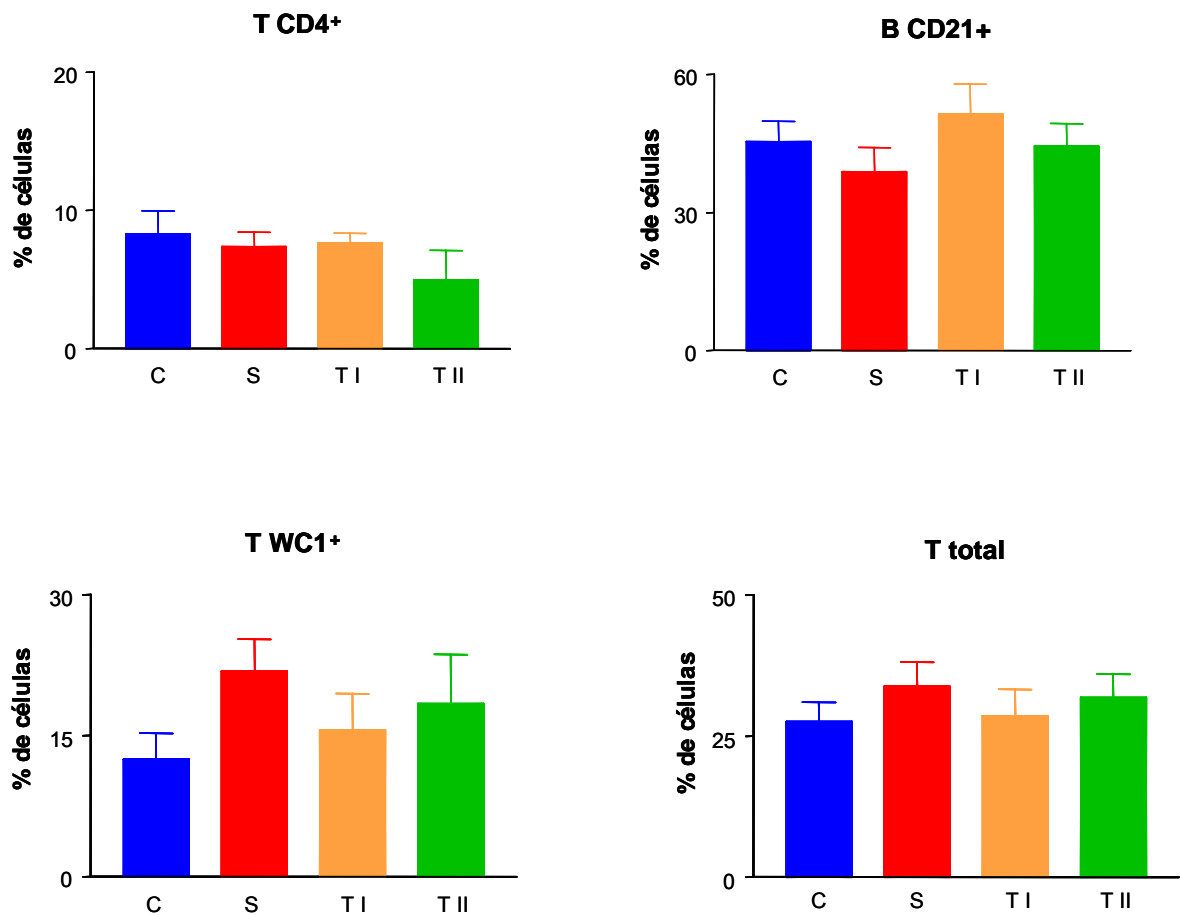


Figura 35: Média do percentual de células das populações T CD4⁺, B CD21⁺, T WC1⁺ e T total respectivamente, no tempo 5. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

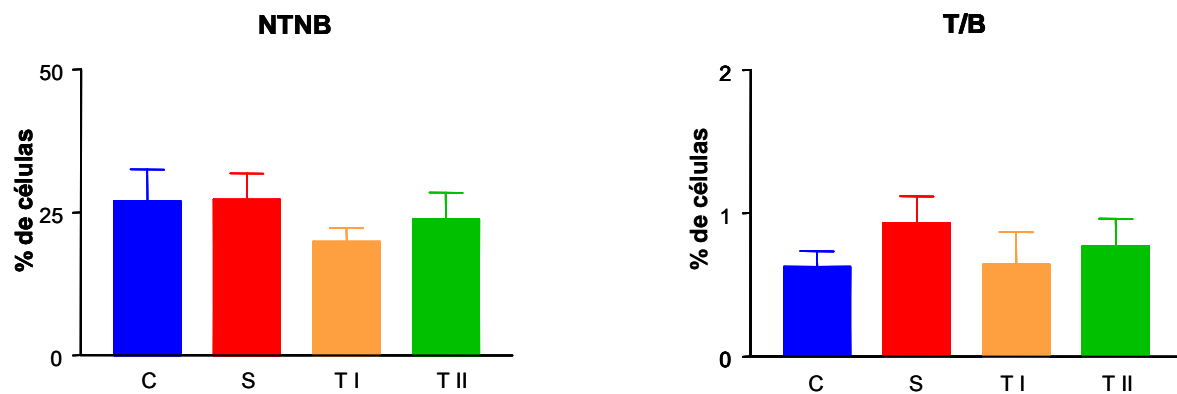


Figura 36: Média do percentual de células da população NTN B e da razão T/B respectivamente, no tempo 5. (C) Controle; (S) Saponina; (TI) Tratamento I e (TII) Tratamento II. As análises foram realizadas através do teste estatístico Mann-Whitney. .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2003. 544p.

AFONSSI, N.; ANDRÉ, P.; GUIA, S.; FALK, S.C.; ROENTYNCK, S.; STEWART, C.A.; BRESO, V.; FRASSATI, C.; REVIRON, D.; MIDDLETON, D.; ROMAGNÉ, F.; UGOLINI, S.; VIVIER, E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. **Immunity**, v.25, p.3313-3442, 2006.

APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T cells: the holy grail? **Clin. Experimental Immunol**, v.138, p.10-13, 2004.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. **Pharmacology Research**, v.15, p.1111-1116, 1998.

BALDWIN, C.L.; SATHIYASEELAN, T.; NAIMAN, B.; WHILE, A.M.; BROWN, R.; BLUMERMAN, S.; ROGERS, A.; BLACK, S.J. Activation of bovine peripheral blood gd T cells for cell division and IFN g production . **Veterinary immunology and Immunopathology**. v.87, p.251-259, 2002.

BALDWIN, C.L.; GODDERIS, B.H.; MORIISON, W.I. Bovine helper t-cell clones specific for lymphocytes infected with *Theileria parva* (Muguga). **Parasite Immunol**, v.9, n.4, p. 499-513, 1987.

BAR, I.G.; SJOLANDER, A.; COX, J.C. ISCOMs and other saponin based adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 32 p. 247-271, 1998.

BENAVIDEZ, J.M. **Mensuração da resposta imune humoral, em bovinos pelos imunógenos sintéticos contra: *Babesia bovis* SBbo 23290 e contra *Ripicephalus (Boophilus) microplus* SBm7462, e de um imunógeno sintético tratamento II, composto pelos dois, na ativação simultânea**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de viçosa, 2006. Em andamento.

BEN-YEDIDIA, T.; ARNON, R. Design of peptide and polypeptide vaccines. **Cur. Opin. Biotechn.**, v.8, p.442-448, 1997.

BITTAR, J.F.F. **Vacinação experimental de bovinos com o peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*: Avaliação de parâmetros parasitológicos e**

imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 90 p.

BOMFORD, R. Studies on the cellular site of action of the adjuvante activity of saponin for sheep erythrocytes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** v.67, p.127-131, 1982.

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

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

BROWN, W. C. et al. Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis* immune cattle. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3273-3281, 1993.

BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C. Use of a helper T cells to identify potentially protective antigens of *Babesia bovis*. **Parasitol. Today**, v.10,p. 145-149, 1994.

BROWN, W.C.; LOGAN, K.S.; ZHAO, S.; BERGMAN, D.K.; RICE-FICHT, A.C. Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous-flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper Tcell clones derived from *B. bovis*. Immune Cattle. **Infect. Immunity**, v.63: p.3106-3116, 1995.

BROWN, W.C., RICE-FICHT, A.C., ESTES, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.63, p.45-55, 1998.

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

BROWN, W.C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.233-248, 2001.

BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.75-87, 2006.

BUTCHER, E.C.; PICKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**. v.272: p. 60-67, 1996.

CANALES. M.; ENRIQUEZ. A.; RAMOS. E.; CABRERA. D.; DANDIE. H.; SOTO. A.; FALCON. V.; RODRIGUEZ. M.; DE LA FUENTE. J.; Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. **Vaccine**, v.15, n.4, p.414-422, 1997.

CASEDAVAL, A.; PIROFSKI, L.A. Exploiting the redundancy in the immune system: Vaccines can mediate protection by the eliciting “unnatural” immunity. **J. Exp. Med.**, v.197, n.11, p.1401-1404, 2003.

CASTRO, C.C.M.. **Estudo experimental da resposta imune celular de bovinos vacinados com o peptídeo sintético SBbo 23290 no controle da babesiose por *Babesia bovis* (Babes, 1888)**. Dissertação (Mestrado)-Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 93 p.

CERWENKA, A.; MORGAN, T.M.; HARMSEN, A.G.; DUTTON, R.W. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. **Exp. Med.**, v.189, n.2 p.423-434, 1999.

CHAVALI, S R.; CAMPBELL, J.B. Adjuvant effect of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**, v.174, p. 347-359, 1987.

CHOU, P.Y.; FASMAN, G.D. Prediction of secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 47, p. 145-148, 1978.

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

CLARK, I.A.; JACOBSEN, L.S. Do babesiosis and malaria share a common disease process ? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.92, p.483-488, 1998.

COLLINS, R.A.; WERLING D.; DUGGAN, S.E.; BLAND, A.P.; PARSONS, K.R.; HOWARD. Gamma delta T cells present antigen to CD4+ alpha beta T cells. **J Leukoc Biol.**, v.63, n.6, p.707-714, 1998.

COURT, R.A.; JACKSON, L.A.; LEE, R.P. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. **Int J Parasitol.**, v.31, p.29-37, 2001.

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

DAALSGARD, K. Saponins adjuvantes. **Arch Ges Virusforsch.** v.44, p.243-254.

DAALSGARD, K.; HILGERS, L.; TROUVE, G. Classical and new approaches to adjuvante use in domestic food animals. In: SCHULTZ., R.D. **Veterinary vaccines and diagnostics**. London: Academic press, 820 p., 1999.

DEBES, G.F.; ARNOLD, C.N.; YOUNG, A.J.; KRAUTWALD, S.; LIPP, M.; HAY, J.B.; BUTCHER, E.C. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. **Nature Immunology**. v.6, n.9, p.889-894, 2005.

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

ELDEMAN, R. An Overview of vaccine adjuvants. Retirado de: International MEETING ON VACCINES, Salvador 1998, Anais...Salvador, p.16, 1998.

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

ESTES, D.M.; BROWN, W.C. Type 1 and type 2 response in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology.**, v.90, p.1-10, 2002.

EUGUI, E.M.; ALLISON, A.C. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. **Parasite Immunol.**, v.2, p.277-292, 1980.

FARIAS, N.A R.; **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 80p.

FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S.; Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.64, n.3, p.279-293, 1998.

FELL, A.H.; CURRIER J.; GOOD, M.F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth *in vitro* by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from non-exposed donors. **Parasite Immunol.**, v. 16, p. 579-86, 1994.

FIKRI, Y.; NYABENDA, J.; DENIS, M.; PASTORET, P.P. Purification and characterisation of bovine WC1+ $\gamma\delta$ Y lymphocytes from peripheral blood. **Vet. Res.**, v.31, p.229-239, 2000.

FIVAZ, B.H.; NORVAL, A.; Immunological responses of the rabbit host to infestation by the brown ear tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Exp. Appl. Acarol.**, v.9, p.219-238, 1990.

FLEBBE, L.M.; BRADLEY- MULLEN, H. Immunopotenziation by SPG and Quil A.I Antibody responses T-independent antigens. **Cell Immunol**. v.99, p.119-127, 1986a.

FLEBBE, L.M.; BRADLEY- MULLEN, H. Immunopotentization by SPG and Quil A.II. Identification of responding cell populations **Cell Immunol.** v.99, p.128-139, 1986b.

FREITAS, C.M.B. **Avaliação da resposta imune de bovinos, inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893).** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 105p.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Boca Raton: CRC Press, 1988. cap 2., 23-52.

GOFF W.L.; JOHNSON W.C.; PARISH S.M.; BARRINGTON G.M.; ELSASSER T.H.; DAVIS W.C.; VALDEZ R.A. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gamma- and TNF-alpha-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Vet Immunol Immunopathol.**, v.84, n.3-4, p.237-251, 2002.

GOFF, W.L.; STORSET, A.K.; JOHNSON, W.C.; BROWN, W.C. Bovine splenic NK cells synthesize IFN- γ in response to IL-12 containing supernatants from *Babesia bovis* exposed monocyte culture. **Parasite immunology**, v.28, n.5, p.221-228, 2006.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos.** Porto Alegre: Sulina, 1974, 103p.

GONZÁLEZ, C.Z.L. **Resposta imune de bovinos vacinados com o peptídeo sintético SBm.7462 com vistas ao controle do *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2003, 74 p

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

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

HEATH, A.W.; NYAN, O.; RICHARDS, C.E.; PLAYFAIR, J.H.L. Efectes of interferon gamma and saponin on lymphocyte traffic are inversely related to adjuvanticity and enhancement of MHC class II expression. **Int. Immunol.** v.3, p.285-292, 1991.

HEDGES, J.F.; COKRELL, L.; JACKIW, N.; MEISSNER.; JULITA, M.A. Differential mRNA expression in circulating $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. **J. Leukocyte Biol.**, v.73, p.306-314, 2003.

HEMMER, R.M.; FERRICK, D.A.; CONRAD P.A. Role of T cells and cytokines in fatal and resolving experimental babesiosis: protection in TNFRp55-/- mice infected with the human *Babesia* WA1 parasite. **J. Parasitol.**, v.86, p.736-742, 2000.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v13, n.03, p.451-469, 2000.

HOOP, T.P.; WOODS, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.78, n.6, p.3824-3828, 1981.

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

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

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

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

JACKSON, L.A.; OPDEBEECK, J.P. The effect of antigen concentration and vaccine regimen on the immunity induced by membrane antigens from the midgut of *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. **Immunology**, v.68, n.2, p.272-276, 1989.

JACKSON, L.A.; OPDEBEECK, J.P. Humoral immune responses of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Immunol.**, v.12, n.2, p.141-151, 1990.

JAMES, M.A. Immunology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestical animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.119-130

JARDIM, L.F.B., **Avaliação de alguns parâmetros clínicos em bovinos inoculados com o imunógeno sintético SBbo 23290 e desafiados com amostra virulenta de *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1893)**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 60p.

KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDEZ, M.; GERSHWIN, L.J.; DE MIRANDA SANTOS, I.K.F. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine

immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology.**, v.110, p.12-21, 2005.

KEMP, D.H.; AGBEDE, R.I.S.; JOHNSTON, L.A.Y.; GOUGH, J.M. Immunization of cattle against *Ripicephalus (Boophilus) microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of parasite on vaccinated cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.16, n.2, p.115-120, 1986.

KLONOWSKI, K.D.; WILLIAMS, K.J.; MARZO, A.L.; BLAIR, D.A.; LINGENHELD, E.G.; LEFRANÇOIS, L. Dynamics of Blood-Borne CD8 Memory T Cell Migration In Vivo. **Immunity.** v.20, p.551-562, 2004.

KUMARATILAKE, L.M.; FERRANTE, A. IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* "in vitro". A possible parasite-immune evasion mechanism. **J. Immunol.**, v.149, p.194-199, 1992.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F.A. Simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v.157, n.1, p.105-132, 1982.

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

LESLIE, D.S.; VINCENT, M.S.; SPADA, F.M.; DAS, H.; SUGITA, M.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. **Exp Med.**, v.12, p.1575-1584, 2002.

MACKAY, C.R.; MARSTON, W.L.; DUDLER, L.; SPERTINI, O.; TEDDER, T.F.; HEIN, W.R. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. **Eur. J. Immunol.** v. 22, n. 4, p.887-895, 1992

MAHONEY D.F. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. **Ann Trop. Med. Parasitol.**, v.63, 1-14, 1969.

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

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

MARTINOD, S. Vaccination practices in Veterinary Medicine: Standardization versus tailored to needs? In: SCHULTZ, R.D., **Veterinary Vaccines and Diagnostics**. London: Academic Press, 1999, 820p.

MARTINS-FILHO, O.A. **Aspectos celulares da esquistossomose mansoni humana durante as fases aguda e crônica da infecção: Uma Análise fenotípica.** Dissertação (Mestrado)-Departamento de Bioquímica e Imunológica, Universidade Federal de Minas Gerais, 1992, 96 p.

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

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

McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis.in: RISTIC, M.; KREIER, J. P. **Babesiosis.** Academic Press: New York, 1981. p.2-18. 1981.

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

MEISSNER, N.; RADKE, J.F.; HEDJES, M.; WHITE, M.; BEHNKE, M.; BERTOLINNO, S.; ABRAHAMSEN, M.; JULITA, M.A. Serial analysis of gene expression in circulating $\gamma\delta$ T cell sub sets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. **J. Immunol.**, v.170, p.356-364, 2003.

MITCHELL, T.C.; HILDEMAN, D.; KEDL, R.M.; TEAGUE, T. K.; SHAEFER, B.C.; WHITE. J.; ZHU, Y.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of BCL-3. **Nature Immunology**, v.2, n.5, p. 397-402

MOTENEGRO-JAMES, S. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, p.27-36, 1992. Supl. 3.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIELDIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone: Definition according two profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p.2348-2357, 1986.

MULCAHY, G.; O'CONNOR, F.; McGONIGLE, S.; DOWD, A.; CLERY, D.G.; ANDREWS, S.J.; DALTON, J.P. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. **Vaccine.**, v.16, p.932-939, 1998.

NAIMAN, B.M.; ALT, D.; BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.; BALDUWIN, C.I. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 potent immunity comprising responses by CD4 and $T\gamma\delta$ T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v.69, p.7550-7558, 2001.

NEURATH, A.R.; KENT, S.B.H.; Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur.Virol.** 137E: p.513-514, 1986.

OAKENFULL, D. Saponins in food: a review. **Food Chem.** v.6, p. 19-40, 1981.

PARK, Y.H.; YOO, H.S.; YOON, J.W.; YANG, S.J.; NA, J.S.; DAVIS, W.C. Phenotypic and functional analysis of bovine $\gamma\delta$ lymphocytes. **J. Vet. Sci.**, v.1, n.1, p.39-48, 2000.

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

PATARROYO, J.H.; MAFRA, C.L.; SEIXAS, P.B.; SAMMARCO, P.; PRATES, A.A.; GUZMAN, F.; PEREIRA, R.W. Peptídeos sintéticos como vacinas para o controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinária**. Campo Grande, 1995.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; FREITAS, C.M.; MACEDO, P.A.; PRATES, A.A.; PORTELA, R.W.; CAETANO, B.C. Mapeamento de epitópos T reativos da proteína B_v60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Salvador, 1999.

PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; PIMENTEL, J.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Ripicephalus (Boophilus) microplus* gut protein (Bm86). **Vet Immunol Immunopathol.** v.88, n.3-4, p.163-72, 2002.

PATARROYO, J.H.; SOSSAI, S. Alternativa para o controle de carrapatos: vacinas e medicamentos. **IV Simposio de produção de gado de corte**. Viçosa – MG, 2004.

PEREIRA, M.C. ***Ripicephalus (Boophilus) microplus* - Revisão taxonômica e morfo-biológica**. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 1982.

PICKER, L.J.; MARTIN, R.J.; TRUMBLE, A.; NEWMAN, L.S.; COLLINS, P.A.; BERGSTRESSER, P.R.; LEUNG, D.Y. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. **Eur. J. Immunol.**, v.24, n.6, p.1269-77, 1994.

PIMENTEL, J C. **A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) em animais estabulados e a campo**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2002, 77 p.

POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D. The WC1+ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.89, p.105-114, 2002.

PORTELA, R.W.D. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)***. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2000. 87p.

REZNICEK, G.; JURESNITSCH, J. Der therapeutische welt von triterpensaponine: Anspruch und wirklichkeit. **Pharm Unserer Zeit**. v.20, p.278-281, 1991.

RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v.13, p.532-550, 1962.

RHODES, S.G.; BUDDLE, B.M.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. **Immunol.**, v.99, n.2, p.195-202, 2000.

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C.L.; DA FONSECA, A.H.; RAMOS, N.F.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Ripicephalus (Boophilus) microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-1808, 1995.

RODRIGUEZ, S.D.; PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F.; McGUIRE, T.C.; RUEF, B.J.; CHITKO-McKOWN, C.G.; BROWN, W.C. CD4⁺ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry associated protein 1. **Infct. Immun.**, v.64, p.2079-2087, 1996.

ROGERS, A.N.; VANBUREN, D.G.; HEDBLUM, E.; TILAHUN, M.E.; TELFER, J.C.; BALDWIN, C.L. $\gamma\delta$.T cell function varies whit the expressed WC1 coreceptor. **The Journal of Immunology**, v.108, p.211–217, 2005.

SHAIO, M.F.; LIN, P.R. A case study cytokine profiles in acute human babesiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.335-337, 1998.

SOARES, J.L. **Dicionário etimológico e circunstanciado de biologia**. São Paulo:Scipione., 1993, 483p.

SOLLYOM, F.; MAKAR, A.; FAZEKAS, A. Immunogenicity studies of foot and mouth disease vaccines at different concentrations of antigen and soponins. **Ann. Rech. Vet.** v.11, p.35-44.

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

SOSSAI, S. **Polimorfismo do gene *bm 86* de *Ripicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) e analise de conservação genética de peptídeos integrantes da vacina sintética SBm 7462**. Dissertação (mestrado)

– Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 105 p.

TANCHOT C.; ROCHA, B. The organization of mature T-cell pools. **Immunol. Today**, v.19, n.12, p.575-579, 1998.

TAYLOR-ROBINSON, A.W. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. **Parasitol. Today**, v.11, p.334-342, 1995.

TUO, W.; ESTES, D.M.; BROWN, W.C. Comparative effects of interleukin-12 and interleukin-4 on cytokine responses by antigen-stimulated memory CD4⁺ T cells of cattle: IL-12 enhances IFN- γ production, whereas IL-4 has marginal effects on cytokine expression. **J. Interf. Cyt. Res.**, v.19, p.741-749, 1999.

TYZARD, I.R.; **Imunologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002. 86 p.

USHIO, H.; WATANABE, N.; KISO, Y.; HIGUSHI, S.; MATSUDA, H. Protective and immunity and mast cell and eosinophil responses in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Parasit. Immunol.**, v.15, p.209-214, 1993.

VALDEZ, R.A.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; JORDAN, J.M.; KNOWLES, D.P. Selective in vivo depletion of CD4⁺ T lymphocytes with anti-CD4⁺ monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.9, n.2, p.417-424, 2002.

WELSH, R.M.; LIN, M.Y.; LOHMAN, B.L.; VARGA, S.M.; ZAROZINSKI, C.C.; SELIN, L.K. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections. **Immunol. Rev.**, v.159, p.79-93, 1997.

WELSH, M.D.; KENNEDY, H.E.; SMYTH, A.J.; GIRVIN, R.M.; ANDERSEN, P. Responses of bovine WC1(+) gamma delta T cells to protein and non protein antigens of *Mycobacterium bovis*. **Infect. Immun.**, v.70, n.11, p.6114-6120, 2002.

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

WIKEL, S.K.; BERGMAN, D. Tick-Host Immunology: Significant advances and challenging opportunities, **Parasitology Today**, v.13, n.10, p.383-388, 1997.

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

WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v.18, p.293-313, 1980.

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

WHITE, A.C.; CLOUTIER, P.; COUGHLIN, R.T. **A purified saponin acts as an adjuvants for a T-independent antigeno**. New York, Editora: MZ Atassi, 1991, 207p.

WHITE, A.M.; BLUMERMAM, S.; NAIMAN, B.; BALDWIN, C.L. Expression of the bovine high affinity IL-12 receptor β 2. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.84, p. 127-142, 2002.

WONG, J.Y.; OPDEBEECK, J.P. Larval membrane antigens protect Hereford cattle against infestation with *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasite Immunol.**, v.12, n.1, p.75-83, 1990.

WYATT, C.R.; MADRUGA, C.; CLUFF, C.; PARISH, S.; HAMILTON, M.J.; GOFF, W.; DAVIS, W.C. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.40, n.3, p.187-199, 1994.