

DANIELA DE MELO RESENDE

**RESPOSTA CELULAR EM LINFONODOS DE BOVINOS
INOCULADOS COM *Anaplasma marginale***

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

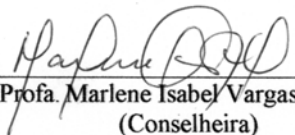
**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

DANIELA DE MELO RESENDE

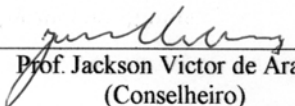
**RESPOSTA CELULAR EM LINFONODOS DE BOVINOS
INOCULADOS COM *Anaplasma marginale***

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

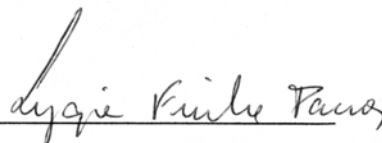
APROVADA: 28 de fevereiro de 2003



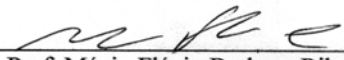
Prof. Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Conselheira)



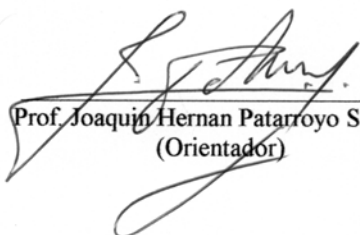
Prof. Jackson Victor de Araújo
(Conselheiro)



Prof. Lygia Maria Friche Passos



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro



Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

Aos meus queridos pais, **Gláucio Jesus de Melo Resende** e **Yara de Melo Resende**, por todo o amor, confiança e apoio que sempre demonstraram em toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela coragem e pela fé que encontro nas orações.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo e pela confiança em mim depositada. Obrigada por tudo, eu amo vocês.

À minha irmã, Vivi, pela amizade e correção ortográfica deste trabalho. Ao meu cunhado, Bruno, e à minha sobrinha, Yara, e à Vivi, pelos momentos felizes e pelos almoços em família.

Ao professor Joaquín H. Patarroyo Salcedo, pela orientação e amizade nesses anos de convivência. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Marlene I. Vargas Vilorio, pela amizade e ensinamentos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Carlos Roberto Carvalho, do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV, por ceder espaço e equipamentos do seu laboratório para a realização de análises, fundamentais à conclusão deste trabalho.

Aos amigos Aline e Marcinho, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pelo auxílio na resolução de problemas técnicos no decorrer deste trabalho. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Márcio e Sidimar, pela ajuda indispensável nas coletas de sangue e pela amizade.

Aos funcionários Zé Carlos e Cauzinho, por toda a colaboração na fase de amamentação dos bezerros e pelo trato dos animais.

Aos estudantes de especialização André, Daniel, Débora e Miriam, pela realização das cirurgias para retirada dos linfonodos.

Ao Zé de Oliveira, pelo apoio nos cuidados com os animais.

Aos funcionários Cláudio e Adão, do Laboratório de Histopatologia Veterinária, pela colaboração no processamento dos linfonodos.

Aos meus colegas de curso Bráulia, Carla, Jorge, Mayra, Policarpo, Sidimar, Irma, Claudia, Mário, Flávia, Shirley, Waneska, Marcelo, Vivi, Gisele, Fernanda, Sandra, Priscila, Fabiana, pela amizade.

Às minhas amigas de coração, Fabiana e Helaíne, que estiveram sempre comigo, apesar da distância.

Às minhas grandes amigas Valéria e Walquíria, pelos momentos de descontração e pela amizade sincera.

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

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

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS	5
2.1 – Objetivo geral.....	5
2.2 – Objetivos específicos.....	5
3 – REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 – Anaplasnose bovina.....	6
3.2 – Controle da anaplasnose.....	9
3.2.1 – Infecção persistente: proteínas de superfície.....	10
3.3 – Imunidade contra o <i>A. marginale</i>	13
3.4 – Linfonodos.....	15
3.4.1 – Centros germinais e resposta imunológica.....	16
3.4.2 – Morte celular programada.....	18
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 – Animais utilizados no experimento.....	21
4.2 – Esquema de inoculação.....	21
4.3 – Coletas dos linfonodos.....	22

4.4 – Histopatologia dos linfonodos bovinos.....	22
4.5 – Pesquisa de antígenos de <i>A. marginale</i> em linfonodos bovinos através da técnica de imunoperoxidase indireta.....	23
4.6 – Pesquisa de antígenos CD4, CD8 e WC1 em linfonodos bovinos através da técnica de imunoperoxidase indireta.....	24
4.7 – Hibridização <i>in situ</i> para detecção de apoptose pela técnica de TUNEL em linfonodos bovinos.....	25
4.8 – Contagem de células TUNEL positivas em linfonodos bovinos..	26
4.9 – Coleta de sangue para obtenção de soro.....	26
4.10 – Teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>A. marginale</i>	27
4.11 – Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	28
4.12 – Isolamento de corpúsculos iniciais de <i>A. marginale</i> a partir de sangue congelado.....	29
4.13 – Desenho dos peptídeos sintéticos.....	30
4.14 – Estimulação <i>ex vivo</i> de células mononucleares periféricas com peptídeos sintéticos.....	31
4.15 – Análise estatística.....	31
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 – Exame clínico dos animais e teste ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>A. marginale</i>	32
5.2 – Identificação dos corpúsculos iniciais de <i>A. marginale</i> isolados..	33
5.3 – Avaliação histopatológica de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de <i>A. marginale</i> AUFV-1.....	33
5.4 – Avaliação imunohistoquímica de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de <i>A. marginale</i> AUFV-1.....	38
5.5 – Apoptose em linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de <i>A. marginale</i> AUFV-1.....	43
5.6 – Proliferação de PBMCs isoladas de bovinos inoculados com a amostra de <i>A. marginale</i> AUFV-1 após estímulo com os peptídeos sintéticos 13590 e 13591.....	48

6 – CONCLUSÕES.....	51
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

RESENDE, Daniela de Melo M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2003. **Resposta celular em linfonodos de bovinos inoculados com *Anaplasma marginale***. Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Jackson Victor de Araújo.

Foi avaliada a resposta imune contra o patógeno *Anaplasma marginale* através da inoculação, em bezerros, da amostra AUFV1 2^a passagem. Para tanto, foram realizadas técnicas de coloração de rotina e técnicas imunohistoquímicas em cortes de linfonodos superficiais. Inicialmente, foi observada uma resposta proliferativa na área paracortical e, a partir da terceira semana pós-inoculação, grande reatividade de centros germinais. Através da técnica de TUNEL, foram observadas inúmeras células em apoptose, em número estatisticamente significativo aos seis e 13 dias pós-inoculação. Antígenos de *A. marginale* apresentados por células dendríticas foram detectados pela técnica da Imunoperoxidase Indireta já aos seis dias pós-inoculação, não sendo observados no linfonodo do animal controle negativo. A técnica da Imunoperoxidase Indireta também foi utilizada para a detecção de antígenos CD4, CD8 e WC1, sendo observado um pequeno aumento apenas de linfócitos CD4+. Paralelamente a estes estudos, foram isoladas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), nos mesmos dias em que eram feitas as coletas de linfonodos, para

estudos de proliferação e de produção de citocinas após reestimulação *ex vivo*. Como controle positivo, foi utilizado o mitógeno celular Concanavalina A, além de corpúsculos iniciais de *A. marginale*. As PBMCs foram estimuladas com dois peptídeos sintéticos baseados na estrutura da proteína de superfície de *A. marginale* MSP-2, os peptídeos 13590 e 13591. Também foi feito um controle negativo, onde era adicionado apenas meio de cultivo incompleto. Nos testes proliferativos, apenas aos seis dias pós-inoculação os peptídeos tiveram desempenho melhor, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), com relação ao controle negativo. Dessa forma, pode-se concluir que os animais inoculados desenvolveram uma resposta imune adaptativa contra o *A. marginale*, provavelmente envolvendo células T auxiliares. Quanto aos peptídeos sintéticos testados, serão necessários mais estudos, podendo-se afirmar apenas que eles são candidatos ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o *A. marginale*.

ABSTRACT

RESENDE, Daniela de Melo M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2003. **Cellular response in bovine lymph nodes inoculated with *Anaplasma marginale*.** Adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Committee members: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Jackson Victor de Araújo.

The immune response against the pathogen *Anaplasma marginale* was evaluated after the inoculation, in calves, with the strain AUFV1 2nd passage. For this, routine coloration techniques and immunohistochemistry techniques were performed in slides of superficial lymph nodes. In the first week post inoculation, a proliferative response was observed in the paracortical areas and, in the third week, a great number of germinal centers. With the TUNEL technique, many cells in apoptosis were observed, in a number statistically significant six and 13 days post inoculation. Antigens of *A. marginale* presented by dendritic cells were detected with the Indirect Immunoperoxidase technique six days post inoculation, and these were not observed in the lymph node of the negative control animal. The same technique was also performed with the purpose of identifying the surface antigens CD4, CD8 and WC1, and a little augment was observed only on the population of lymphocytes CD4+. Another experiment evolved the isolation of peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs), which were isolated in the same days the lymph nodes were collected, for studies of proliferation and production of cytokines after reestimation *ex vivo*. The mitogen Con A and initial bodies of *A. marginale* were utilized as positive controls. The PBMCs were stimulated with two synthetic peptides based on the structure of the surface protein of *A. marginale* MSP-2, named 13590 and 13591. A negative control was also utilized, which was added incomplete medium only. On the proliferative tests, only six days post inoculation the peptides were better than the negative control, with numbers statistically significant ($p < 0,05$). On this way, we could conclude that the inoculated animals developed an adaptive immune response against *A. marginale*, probably evolving T helper cells. In relation to the synthetic peptides tested, we can only affirm that they are good candidates for the development of a vaccine against bovine anaplasmosis, but more studies have to be performed in this area.

1 – INTRODUÇÃO

O *Anaplasma marginale*, rickettsia causadora da anaplasmose, o patógeno de bovinos transmitido por artrópodes hematófagos mais prevalente no mundo, é responsável por altas morbidade e mortalidade em regiões de clima temperado, subtropical e tropical (Palmer et al., 2000), sendo especialmente importante em países em desenvolvimento (Patarroyo et al., 1994). Inicialmente descrito como um estágio intraeritrocitário do protozoário *Babesia bigemina*, o *A. marginale* foi identificado pela primeira vez por Arnold Theiler, em 1908, como um patógeno intraeritrocitário distinto (Palmer et al., 2000).

A doença inicia-se com a inoculação de formas infectantes de *A. marginale* em bovinos susceptíveis, que pode ser feita tanto por carrapatos (vetores biológicos) quanto por moscas hematófagas (vetores mecânicos), sendo as últimas importantes vetores na América Latina (Leal et al., 2000; de la Fuente et al., 2001b). A transmissão também pode ser feita através de fômites contaminados (de la Fuente et al., 2001b).

A anaplasmose é uma doença economicamente importante na América do Sul, pois leva a perdas econômicas tanto em bovinos de leite quanto em bovinos de corte, podendo causar perdas massivas em bovinos importados e não vacinados (Guglielmone, 1995). Prova disso são os prejuízos econômicos causados pelas doenças transmitidas por carrapatos aos bovinos, que foram

avaliados em mais de um bilhão de dólares por ano no Brasil (Kessler, 1999). A doença faz parte do complexo conhecido como Tristeza Parasitária Bovina, que é relacionada, no Brasil, aos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e à rickettsia *A. marginale* (Souza, 2000).

Demonstrou-se que a transferência de soro imune, proveniente de bovinos previamente infectados ou vacinados, a bovinos susceptíveis não confere nenhuma proteção contra a infecção com *A. marginale*. Outras evidências de que apenas os anticorpos não são capazes de proteger contra a anaplasmoze bovina são dadas pela observação de que bezerros não são protegidos por anticorpos colostrais, e bovinos portadores têm recaídas graves após esplenectomia, apesar de altos níveis de anticorpos circulantes anti-*Anaplasma* estarem presentes. Logo, é provável que a imunidade contra *A. marginale* envolva mecanismos mediados por células, como a ativação de macrófagos mediada por células T, que são importantes na resolução de outras infecções bacterianas intracelulares. Neste sentido demonstraram-se, em um experimento, altos níveis de interferon- γ (IFN- γ) em sobrenadante de cultivo após estímulo com antígenos de *A. marginale*, associados com a proliferação de linfócitos periféricos, o que é consistente com o provável envolvimento de resposta imune mediada por células na imunidade contra *A. marginale* (Gale et al., 1996a).

Também tem-se sugerido que a imunidade protetora contra *A. marginale* requer a indução de IgG2 contra proteínas de membrana e a ativação de macrófagos, com aumento da atividade fagocítica; embora a transferência passiva de anticorpos não seja capaz de proteger contra infecção experimental. Assim, tanto a imunidade humoral quanto a imunidade celular estão associadas com a proteção após a vacinação com *A. marginale* vivo ou inativado. Em bovinos, o IFN- γ é responsável pelo aumento na produção de IgG2 e ativação de macrófagos (Brown et al., 1998a), levando à especificidade na fagocitose, por opsonização, e ao aumento na produção de óxido nítrico por estas células. Este modelo é a base para uma imunidade mediada por células específica para um patógeno intraeritrocitário obrigatório, que não pode, conseqüentemente, ser atingido por linfócitos citotóxicos restritos ao complexo de histocompatibilidade

maior (MHC) da classe I (Palmer et al., 1999).

A anaplasmosose pode ser controlada pelo uso de acaricidas para o controle do vetor ou pela vacinação. Entretanto, no mundo inteiro, procuram-se meios para diminuir a utilização de acaricidas devido ao aumento do custo desses produtos, ao desenvolvimento de resistência, aos resíduos em produtos de origem animal e ao impacto ambiental (Molloy et al., 2001). Por outro lado, a utilização de vacinas vivas, apesar de ser o método mais utilizado atualmente, também tem graves problemas. Por requerer a utilização de bovinos para a purificação do patógeno, os custos dessa vacina são muito altos. Além disto, pode haver contaminação por membrana de eritrócitos e por outros patógenos, levando a riscos para os animais vacinados e a variações na eficiência da vacina (Blouin et al., 2000). Na verdade, o termo "vacinas" é utilizado pela maioria dos autores, apesar de ela não ser considerada realmente uma vacina, devido aos problemas que ocorrem durante a sua atenuação e durante o cultivo de *A. marginale*.

Por esses motivos, pesquisas têm sido desenvolvidas buscando o reconhecimento de antígenos conservados em diferentes amostras de *A. marginale*, para o desenvolvimento de vacinas de peptídeos sintéticos padronizadas e de eficiência constante. Neste sentido, a proteína de superfície MSP-2 (*Major Surface Protein 2*) tem sido apontada como possível candidata para o desenvolvimento de vacinas sintéticas, sendo comprovadamente importante na imunidade natural contra *A. marginale*. O desenvolvimento de vacinas sintéticas visa à diminuição nos custos de produção da vacina, tornando-a mais acessível aos pecuaristas, e à diminuição do impacto da anaplasmosose na pecuária.

No Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/BIOAGRO/DVT/UFV, existe a MSP-2, clone 11.2, sintetizada em 10 peptídeos, tendo sido feito anteriormente o mapeamento de epítomos B. Há também no Laboratório dois peptídeos híbridos (13590 e 13591), que correspondem aos clones 11.2 e DF.5 da MSP-2.

Desta forma, torna-se importante o estudo da resposta imune contra o *A. marginale ex vivo*, mediante re-estimulação com os peptídeos sintéticos

citados, para uma possível caracterização destes peptídeos como imunógenos contra este patógeno.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Estudar os eventos da resposta imune celular em linfonodos de bovinos *Bos taurus taurus* inoculados com a amostra de *Anaplasma marginale* AUFV1 e a memória imunológica pós-vacinal induzida mediante estimulação *ex vivo* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com peptídeos sintéticos provenientes da proteína de superfície MSP-2 de *Anaplasma marginale*, clones 11.2 e DF.5.

2.2 – Objetivos específicos

- Estudar a dinâmica das alterações microscópicas em folículos linfóides e centros germinais de linfonodos periféricos.
- Realizar testes imunohistoquímicos para detecção de apoptose e fenotipagem celular.
- Verificar a resposta imune celular *ex vivo* aos peptídeos sintéticos híbridos provenientes da proteína de superfície MSP-2 através da mensuração de citocinas.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Anaplasmosose bovina

As espécies com importância patogênica que afetam os bovinos são o *Anaplasma marginale* e o *Anaplasma centrale*, sendo o último responsável por uma forma mais branda da doença. O *A. marginale*, que provoca uma forma mais grave de anaplasmosose, também é capaz de parasitar cervos e diversos outros ruminantes silvestres, tornando o controle da doença mais difícil (Jones et al., 2000).

No atual esquema de classificação, os microrganismos causadores da anaplasmosose estão incluídos na ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Anaplasma* (Jones et al., 2000), sendo que apenas recentemente o gênero *Anaplasma* foi reconhecido como um membro da tribo Ehrlichieae, após a análise de seqüências de rRNA 16S (Palmer et al., 2000), confirmado pela análise de seqüências do gene *gltA* (Inokuma et al., 2001). Entretanto, Dumler et al. (2001) sugerem a eliminação da estrutura de tribos, através do estudo de seqüências de nucleotídeos do gene *groESL*, sugerindo que todos os membros das tribos Ehrlichieae e Wolbachieae sejam transferidos para a família Anaplasmataceae.

Segundo essa nova classificação, a família Anaplasmataceae

incluiria as espécies contidas atualmente nos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, além do gênero *Aegyptianella*, designado como *genus incertae sedis* por ter fortes semelhanças fenotípicas com as espécies de *Anaplasma*. Além disso, também é proposto que o gênero *Anaplasma* seja expandido, incluindo as novas espécies *Anaplasma (Ehrlichia) bovis comb. nov.*, *Anaplasma (Ehrlichia) platys comb. nov.* e *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila comb. nov.*, esta última sendo considerada como sinônimo da espécie atualmente conhecidas como *Ehrlichia equi* e do agente da erliquiose granulocítica humana (Dumler et al., 2001).

A infecção inicia-se com a inoculação das formas infectantes na corrente sangüínea, que pode ser feita por carrapatos (vetores biológicos), moscas hematófagas (vetores mecânicos) ou fômites contaminados (Leal et al., 2000). Em condições experimentais, cerca de 20 espécies de carrapatos são capazes de transmitir a anaplasmoze, mas são considerados de importância na transmissão natural da doença os gêneros *Dermacentor* e *Boophilus* (Searcy, 1995).

Após o contato inicial com a superfície eritrocitária, o *A. marginale* é internalizado por eritrofagocitose e se divide por fissão binária dentro de um vacúolo, produzindo de dois a oito corpúsculos iniciais, que são envoltos por uma membrana. As rickettsias infectantes são então liberadas pelo eritrócito sem dano aparente à célula, indo infectar eritrócitos vizinhos (Leal et al., 2000).

Após um período de incubação de 20 a 40 dias, ocorre um aumento na ricketsemia (Arulkanthan et al., 1999). A infecção, em sua fase aguda, é caracterizada por febre, depressão, anorexia e anemia aguda, coincidindo com o aparecimento de corpúsculos iniciais periféricos no interior dos eritrócitos (Leal et al., 2000), levando à morte em aproximadamente 36% dos casos clínicos (Palmer et al., 1999). Também ocorrem abortamentos ou nascimentos de bezerros infectados (Wanduragala & Ristic, 1993), além de perda de peso, com diminuição na produção de leite e carne (Barbet, 1995; Blouin et al., 2000; de la Fuente et al., 2001b).

A severidade da doença varia muito de acordo com a idade do animal. Bezerros sofrem infecções suaves, com pouca mortalidade, e novilhos

normalmente se recuperam, apesar da gravidade da doença. Porém, em bovinos adultos, a doença é mais grave, com mortalidade variando de 20 a 50% (Fraser, 1996). Os sinais são febre de curta duração e anemia, que é o principal efeito produzido pelo microrganismo. A anemia é caracterizada por debilidade, palidez das mucosas, respiração acelerada, icterícia, queda na contagem das hemácias e diminuição do nível de hemoglobina. Ocasionalmente, ocorrem tremores musculares, depressão, anorexia e salivação excessiva. Não se observa hemoglobinúria, já que a anemia não ocorre por hemólise intravascular, mas por um aumento na fagocitose de eritrócitos parasitados e não parasitados pelo sistema reticuloendotelial, indicando o envolvimento de mecanismos imunes na fisiopatologia da doença (Jones et al., 2000). Também ocorre a diminuição na produção de leite e abortamentos são comuns na fase final de gestação (Wanduragala & Ristic, 1993). A esplenectomia de animais portadores resulta em aumento da parasitemia e anemia aguda (Searcy, 1995).

Os animais que morrem de anaplasmosse aguda apresentam os sinais inespecíficos de anemia aguda, com baixa viscosidade do sangue, tecidos pálidos e ictericos, baço aumentado e fígado icterico com vesícula biliar distendida (Searcy, 1995).

O tratamento recomendado é a aplicação, por via intramuscular, de oxitetraciclinas de longa ação, na dose de 20mg/Kg. Recomenda-se que o tratamento seja repetido três vezes, com intervalo de 48 horas (Fraser, 1996).

Com corantes derivados do Romanowsky, como o Giemsa, estes microrganismos são visualizados como estruturas redondas, homogêneas, densas, de cor púrpura-azulada, situadas no interior dos eritrócitos e localizadas excentricamente. Com o microscópio eletrônico, pode-se ver que essas estruturas são separadas do citoplasma do eritrócito por uma membrana que envolve entre um e oito corpúsculos iniciais, que são as unidades infectantes. Os microrganismos têm, cada um, de 0,3 a 0,4µm de diâmetro (Jones et al., 2000). Em algumas amostras de *A. marginale*, incluindo uma isolada em Pará de Minas (MG), identificou-se um apêndice após análise em microscópio eletrônico, porém a função deste ainda não foi definida (Ribeiro et al., 1997).

A anaplasmosse bovina é uma doença importante na Austrália, nos Estados Unidos, na América do Sul e na Rússia (Searcy, 1995), sendo, portanto, amplamente distribuída e ocorrendo, inclusive, em muitas regiões com clima temperado (Uilenberg, 1995). As perdas atribuídas à anaplasmosse bovina nos Estados Unidos chegam a 100 milhões de dólares por ano, e calcula-se que meio bilhão de bovinos estão sob risco no mundo (Allred et al., 1990). Entretanto, na maioria das regiões em que a anaplasmosse é endêmica, torna-se difícil determinar as perdas econômicas, principalmente devido à inabilidade em quantificar aquelas decorrentes de queda na produção, ou às infecções concorrentes com outros hemoparasitas (Wanduragala & Ristic, 1993).

3.2 – Controle da anaplasmosse bovina

O controle da anaplasmosse tem sido feito por redução do vetor, por tratamento profilático com tetraciclina e por vacinação, realizada com vacinas vivas de *Anaplasma marginale* ou de *Anaplasma centrale*, ou com vacinas inativadas (Gale et al., 1996b). A vacinação é o melhor método de controle, mas requer o uso de bovinos para a produção de antígenos, o que aumenta o custo de produção da vacina. Além disso, antígenos produzidos a partir de eritrócitos bovinos estão frequentemente contaminados por membranas eritrocitárias ou por patógenos (Blouin et al., 2000). Por esse motivo, têm sido realizadas pesquisas que buscam o reconhecimento de epítomos para células T e B, relevantes na imunidade contra a anaplasmosse, para o desenvolvimento de uma vacina sintética eficaz (Palmer & McElwain, 1995).

Os bovinos que sobrevivem à parasitemia inicial normalmente permanecem como portadores, com infecção subclínica, servindo como reservatórios para a doença e sendo imunes por muitos anos a infecções subseqüentes (French et al., 1998; Rurangirwa et al., 2000). Essa imunidade permanece pelo menos por oito meses após a eliminação do agente através de quimioterapia. A imunidade protetora contra a anaplasmosse pode ser induzida por vacinação com parasitas inativados ou pela infecção com a espécie menos

patogênica, *A. centrale* (Gale et al., 1996a). Entretanto, o uso dessas formas de prevenção tem sido limitado pela falta de padronização das "vacinas", com grande variação na infectividade e morbidade, e pelo risco de contaminação com outros patógenos (Cox, 1997).

Desta forma, vacinas ideais contra a anaplasnose devem ter as seguintes propriedades: serem capazes de prevenir a doença clínica em condições de campo; serem efetivas contra amostras diferentes do patógeno; não conterem organismos ou antígenos contaminantes; induzirem proteção duradoura com uma ou duas doses; estarem disponíveis em grandes quantidades; terem baixo custo e não terem efeitos colaterais. Assim, imunógenos sintéticos com epítomos para células T e B reativos são uma possibilidade para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra a anaplasnose, já que vacinas de subunidade são problemáticas pela dificuldade na obtenção de grandes quantidades de antígeno (Montenegro-James et al., 1995). Esse problema poderia ser solucionado pelo sucesso no cultivo de *A. marginale*, mas atualmente só se consegue cultivá-lo por poucas passagens (Waghela et al., 2000).

3.2.1 – Infecção persistente: proteínas de superfície

Na membrana de *A. marginale* existem pelo menos seis proteínas de superfície (MSPs): MSP-1a, MSP-1b, MSP-2, MSP-3, MSP-4 e MSP-5 (Brown et al., 1998a). Destas proteínas, MSP-1b, MSP-2 e MSP-3 são codificadas por famílias multigênicas, resultando na expressão de cópias polimórficas; enquanto MSP-1a, MSP-4 e MSP-5 são codificadas por um único gene, sendo conservadas entre diferentes amostras do agente (Palmer et al., 1999).

A recuperação após a fase aguda de uma infecção com patógenos da ordem Rickettsiales frequentemente resulta em uma infecção persistente do hospedeiro (Kieser et al., 1990). A persistência que se observa após a fase aguda da anaplasnose, e que é fundamental para a contínua transmissão da infecção, ocorre durante uma resposta imune protetora. Bovinos persistentemente

infectados e desafiados com 10^{10} *A. marginale* de uma amostra homóloga foram totalmente protegidos contra a ricketsemia e a anemia quando comparados a bovinos nunca infectados com *A. marginale*. Esse paradoxo – no qual a resposta imune controla efetivamente o desafio, mas não é capaz de eliminar um nível baixo de infecção – sugere que a persistência envolve um mecanismo de escape imunológico (Palmer et al., 1999).

É interessante notar que os baixos níveis de parasitemia durante a infecção persistente não são estáticos, e sim aumentam e diminuem em ciclos, sugerindo que variantes antigênicas são responsáveis pelo aumento da parasitemia. Desta forma, a ricketsemia persistente é caracterizada pela emergência seqüencial e replicação de *A. marginale* expressando variantes antigênicas de MSP-2, seguida pelo desenvolvimento de uma resposta imune específica e controle da ricketsemia (Palmer et al., 1999).

Em contraste com a transmissão mecânica, na qual variantes antigênicas emergentes são transferidas diretamente para um novo hospedeiro, a complexidade do desenvolvimento do *A. marginale* no carrapato levanta a possibilidade de que o estágio infectante na glândula salivar pode ser antigenicamente distinto do organismo adquirido através de infecções persistentes em bovinos. Assim, na glândula salivar de *Dermacentor andersoni* (amostra South Idaho), apenas duas variantes de MSP-2, denominadas de SGV-1 (*Salivar Gland Variant 1*) e SGV-2, são expressas, apesar da enorme variedade presente no sangue durante a alimentação do carrapato (Palmer et al., 1999). Assim, a ricketsemia aguda que ocorre após a transmissão pelo carrapato é caracterizada pela expressão de duas variantes de MSP-2, denominadas ARV-1 (*Acute Rickettsemia Variant 1*) e ARV-2. Porém, após o controle dessas variantes pelo sistema imune, ocorre a persistência da infecção através do surgimento de novas variantes, chamadas de PRVs (*Persistent Rickettsemia Variants*), tipos 1 a 5, na amostra South Idaho (Palmer et al., 2000). A proteína MSP-2 também é expressa no intestino do carrapato, nas primeiras 48 horas após o início da alimentação (Löhr et al., 2002). A caracterização imunológica desses estágios nas glândulas salivares é necessária para assegurar que os epítomos relevantes sejam

incluídos nas vacinas (Palmer et al., 1999). A restrição das variantes de MSP-2 transmitidas pelo carrapato, em contraste com a grande diversidade presente nos animais persistentemente infectados, suporta o desenvolvimento de vacinas com a proteína MSP-2 para prevenir a ricketsemia aguda (Rurangirwa et al., 1999).

Em um outro estudo, Palmer et al. (2001) sugerem que a diversidade genotípica não é gerada rapidamente em um animal, já que um único genótipo foi identificado em um mesmo animal durante um período de dois anos após infecção experimental. Porém, ressaltam que, em um rebanho localizado em uma região endêmica, há grande variedade antigênica entre os animais.

As proteínas de superfície do *Anaplasma marginale* são candidatas para o desenvolvimento de vacinas (Brown et al., 1998b). A proteção contra o desafio homólogo em bovinos imunizados com membranas purificadas de *A. marginale* ocorre em cerca de 70% dos casos e está ligada a títulos de anticorpos contra epítomos das MSPs expostos na membrana. A proteção, nestes casos, também está ligada à indução de células T CD4⁺ que secretam IFN- γ e à polarização da resposta para a produção de IgG2 (Palmer et al., 1999). Além disso, a imunização com MSP-1 ou MSP-2 purificadas induz proteção contra o desafio experimental, e a imunização com MSP-3 induz proteção parcial contra o desafio (Brown et al., 1998a); a proteção dada pela imunização com MSP-1 purificada é mostrada pela significativa redução na ricketsemia e na anemia após desafio com amostra homóloga ou heteróloga (Brown et al., 2001a).

Imunizações com o gene que codifica a proteína de superfície MAP-1 em *Cowdria ruminantium* foram capazes de induzir imunidade protetora de células T auxiliares 1 (Th1) contra desafio letal em camundongos. Da mesma forma, homólogos de MAP-1 em organismos relacionados filogeneticamente e antigenicamente, como a proteína MSP-2 de *A. marginale*, também são alvos de respostas protetoras e, por causa da similaridade antigênica destes agentes, estratégias comuns para o desenvolvimento de vacinas poderiam ser aplicadas (Mahan et al., 1999).

Apesar disso, as proteínas de membrana de *A. marginale*, incluindo MSP-1, MSP-2 e MSP-3, variam tanto estruturalmente quanto antigenicamente

em amostras diferentes. Conseqüentemente, o reconhecimento de epítomos responsáveis pela resposta imune protetora e conservados entre amostras diferentes é a maior dificuldade para o desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras contra a anaplasiose (Brown et al., 1998a). Nesse sentido, clones de células T, obtidos de animais imunizados com proteínas de membrana purificadas, reconheceram diversos antígenos, incluindo MSP-2, MSP-3 e epítomos aparentemente divididos por essas duas proteínas, dando a base para a identificação de epítomos de células T nessas proteínas (Brown et al., 1998b).

Forte candidata ao desenvolvimento de vacinas, a MSP-2 possui um domínio hipervariável central ancorado por aminoácidos conservados e regiões carboxi-terminais. Essa estrutura é semelhante nas duas espécies de *Anaplasma* que afetam bovinos, o *Anaplasma marginale* e o *Anaplasma centrale*. A região central hipervariável contém epítomos de células B variantes no domínio extracelular, enquanto os domínios transmembrana são ricos em epítomos de células T (Shkap et al., 2002).

Os antígenos imunodominantes encontrados na amostra brasileira AUFV1 foram identificados pela técnica de Western blot, baseando-se na reatividade com anticorpos obtidos de origens diferentes. As análises revelaram algumas proteínas comuns e outras únicas entre amostras diferentes de *A. marginale*. Desta forma, as proteínas de superfície MSP-1, MSP-2 e MSP-3 estão presentes na amostra AUFV1 e na amostra do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte – MS, assim como na amostra Illinois (Estados Unidos). A partir destas análises, pode-se concluir que existe a possibilidade de proteção cruzada entre amostras diferentes, já que as principais proteínas de superfície da amostra AUFV1 são encontradas em populações distintas de *A. marginale* (Patarroyo et al., 1994).

3.3 – Imunidade contra o *A. marginale*

O *A. marginale* é capaz de sobreviver e replicar em um hospedeiro imunocompetente por pelo menos sete anos. Um bovino persistentemente

infectado é capaz de montar uma resposta imune adaptativa, o que é indicado por altos títulos de anticorpos, responsividade de células T e habilidade em prevenir altos níveis de ricketsemia e doença clínica frente a um desafio com espécie homóloga. Apesar disso, o hospedeiro é incapaz de eliminar a infecção (Palmer, 2002).

A imunidade contra as erlíquias inclui tanto a resposta inflamatória, através de macrófagos ativados e neutrófilos, quanto o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (Brown et al., 2001b). O desenvolvimento de respostas específicas de IgG2 a cada ciclo durante a infecção persistente com *Anaplasma marginale* indica a participação de linfócitos T auxiliares (Th), especificamente de linfócitos T secretando interferon- γ (IFN- γ). Assim, como em outras espécies, nos bovinos o IFN- γ é capaz de ativar macrófagos, ativando a produção por estes de moléculas tóxicas, como o óxido nítrico (NO) e seus derivados. Além disso, o IFN- γ aumenta a produção de IgG2, imunoglobulina opsonizante (Brown et al., 2001a).

O envolvimento de anticorpos na imunidade contra o *A. marginale* tem sido investigado, e já foi demonstrada uma correlação entre altos títulos de anticorpos contra as MSPs e proteção contra a doença (Wyatt et al., 1996). Entretanto, os problemas determinados pela variação antigênica e pela ausência de proteção contra o desafio após administração de soro imune enfatizam a importância de células T CD4⁺ na resposta imune contra o *A. marginale* (Brown et al., 1998b), sendo essas as células de ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

Em um estudo conduzido por Brown et al. (1998b), um ou mais clones de células T de bovinos imunizados com MSPs e protegidos contra desafio, responderam à reestimulação *in vitro* com MSP-2, confirmando a natureza imunodominante dessa proteína, que foi alvo da resposta de anticorpos predominante nesses bovinos.

Nesse mesmo estudo, clones específicos de células T contra *A. marginale* expressaram uma mistura de citocinas, a maioria co-expressando interleucina 4 (IL-4) e IFN- γ . Segundo Brown et al. (1998b), esses dados são

consistentes com respostas de citocinas não polarizadas observadas em clones de células Th isolados de bovinos imunes a espécies de *Babesia* e *Fasciola*. Dessa forma, a expressão conjunta de IL-4 e IFN- γ em células Th específicas contra *A. marginale* é compatível com seu papel potencial como células auxiliares no aumento de respostas específicas de IgG1 e IgG2, embora ensaios funcionais com essas células ainda não tenham sido feitos. Além disso, também foi observada a expressão conjunta de IFN- γ e fator de necrose tumoral α (TNF- α), o que é consistente com a provável função dessas células na ativação de macrófagos (Brown et al., 1998b).

Nesse sentido, foi demonstrado que a IL-12 aumenta significativamente a secreção de IFN- γ em bovinos por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas pelo vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e ovoalbumina (Collins et al., 1999), o que sugere que essa citocina também tenha papel importante na imunidade contra o *A. marginale*. Por esse motivo, um estudo utilizou a IL-12 como adjuvante em uma vacina de MSP-2 em alumínio, mostrando aumento significativo na produção de IFN- γ por células de linfonodos de bovinos imunizados após reestimulação com *A. marginale*. Também foi observado aumento nas respostas proliferativas de PBMCs, ainda evidente nove meses após a imunização, e aumento nos níveis de IgG sérica, predominantemente devido a um aumento nos níveis de IgG1 (Tuo et al., 2000).

3.4 – Linfonodos

O sistema imune é funcionalmente dividido em órgãos linfóides primários, responsáveis pelo desenvolvimento de linfócitos *naive*; e tecidos linfóides secundários, responsáveis pela captura de antígenos estranhos, e, por isso mesmo, localizados em pontos estratégicos. Esses tecidos linfóides incluem os linfonodos, o baço, as tonsilas e as placas de Peyer (Fu & Chaplin, 1999).

Os linfonodos são estruturas encapsuladas, localizadas ao longo de vasos do sistema vascular linfático (Freitas, 2001), responsáveis por filtrar a linfa e gerar resposta imunológica a antígenos estranhos provenientes dos tecidos

corporais. Para o desempenho dessa função, a estrutura dos linfonodos é organizada de tal forma que os linfócitos T e B são separados em compartimentos anatômicos diferentes (Roitt, 1997), otimizando as interações celulares (Fu & Chaplin, 1999).

Quanto à sua organização estrutural, o linfonodo pode ser dividido em córtex externo ou superficial, córtex profundo ou paracórtex e medula. A região cortical externa é constituída principalmente por células B, organizadas em folículos primários, e também por células dendríticas foliculares (FDCs), sendo essa estrutura responsável pela formação dos centros germinais (CGs) após contato com antígenos T-dependentes. Já a região paracortical é constituída principalmente por células T, e sua unidade funcional são os cordões paracorticais, local que possibilita o encontro das FDCs com linfócitos T antígeno-específicos, favorecendo sua ativação e subsequente maturação. Finalmente, a região medular, formada pelos cordões medulares, é ocupada principalmente por macrófagos e plasmócitos (Fu & Chaplin, 1999).

Os linfonodos são alimentados por dois sistemas vasculares distintos, a vasculatura linfática e a vasculatura sangüínea. A primeira é responsável pelo transporte de antígenos e células transportadoras de antígenos dos tecidos periféricos para o linfonodo, ao mesmo tempo em que devolve células e fluido para a circulação; enquanto a segunda transporta linfócitos circulantes para o nódulo linfático. Os vasos linfáticos aferentes chegam ao linfonodo atravessando sua cápsula, com os chamados seios marginais, e a drenagem é feita através dos seios medulares, no vaso linfático eferente (Fu & Chaplin, 1999).

3.4.1 – Centros germinais e resposta imunológica

O microambiente derivado da organização estrutural dos CGs promove a geração de respostas imunes de alta afinidade por antígenos específicos (Roitt, 1997).

Em linfonodos de bezerros, os CGs são observados a partir da primeira semana de vida; e em bovinos adultos saudáveis, cerca de 30 a 70% dos nódulos linfóides apresentam CGs, o que demonstra a alta atividade dos linfonodos também nesses animais (Morrison et al., 1986).

Os CGs podem ser divididos em duas regiões distintas: a zona clara, preenchida principalmente por células não linfocíticas, especialmente por FDCs; e a zona escura, ocupada por linfócitos B em rápida proliferação para geração de linfoblastos (Thorbecke et al., 1994).

Durante a resposta imune primária, as células B são ativadas fora do folículo, migrando posteriormente para a rede FDCs, quando se inicia a formação do CG. A principal função dos CGs é a geração de linfócitos B com alta afinidade pelo antígeno, levando à formação de plasmócitos e células B de memória (Tarlinton, 1998). As células B ativadas crescem exponencialmente na rede de FDCs. O ciclo celular dessas células se completa em um período de 6 a 7 horas; dessa forma, cada três células B blásticas originam entre 10^4 a $1,5 \times 10^4$ células nos CGs em um período de três dias (Liu et al., 1991).

Embora os linfócitos T sejam menos abundantes nos CGs, está claro que essas células têm um papel importante na sua formação (Gulbranson-Judge et al., 1997), estando localizadas, principalmente, na zona clara dos CGs (Hardie et al., 1993; Gulbranson-Judge et al., 1997). Estudos recentes em camundongos demonstraram atividade proliferativa de células T antígeno-específicas em regiões intrafoliculares dos CGs (Zheng et al., 1996) e diversos estudos mostraram que a ausência de células T acarreta a não formação dos CGs (Linton et al., 1992; Tsiagbe et al., 1992; Nossal et al., 1993). Os mecanismos de interação entre células T e B nos CGs ainda não estão totalmente esclarecidos, mas os linfócitos T parecem ser essenciais na troca de classe de imunoglobulinas (Igs), assim como na geração de linfócitos B de memória. Entretanto, sabe-se que o epítipo reconhecido por células T durante o processo de ativação não é, necessariamente, o mesmo que é reconhecido por linfócitos B (Fuller et al., 1993).

Dessa forma, há poucas células T nos folículos linfóides primários, que começam a proliferar cerca de quatro dias após o estímulo, atingindo o ápice aos sete dias pós-imunização. A partir daí, seu número começa a diminuir, chegando a níveis basais 10 dias após o estímulo. Entretanto, seu número volta a aumentar durante a resposta imune secundária, sendo seu crescimento de cerca de 10% do observado durante a resposta imune primária. Esse trabalho foi realizado por Gulbranson-Judge & MacLennan (1996) em um estudo com camundongos, e os autores acreditam que esse fato pode estar associado ao reconhecimento antigênico de células T de memória geradas durante a primeira exposição ao antígeno.

Acredita-se que grande parte das funções dos CGs esteja associada às FDCs. Essas células expressam vários receptores de superfície, incluindo receptores para o fator C3 do complemento e receptores para a porção Fc de imunoglobulinas da classe G (IgG). Assim, provavelmente, essas moléculas facilitam a captura do complexo antígeno-anticorpo, que pode ser mantido no CG durante vários meses (Kelsoe, 1995).

A proliferação e sobrevivência das células B nos CGs está associada à estimulação antigênica, à interação com as FDCs e a fatores solúveis produzidos por essas células, à interação com células T, particularmente à sinalização CD40-CD40L, e à produção e liberação de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10. Entretanto, a importância relativa e a interação desses fatores *in vivo* ainda não está esclarecida (Hollowood & Goodlad, 1998).

3.4.2 – Morte celular programada

Durante a formação dos CGs, as células B podem seguir vários caminhos. Inicialmente, após a ativação, essas células podem sofrer o processo de apoptose ou sobreviver. Isso é determinado após a hipermutação somática de genes que codificam a região IgV_H das imunoglobulinas, que proporcionam alterações na afinidade dos receptores antigênicos de linfócitos B. Dessa forma, após esse processo, ocorrem seleções positivas ou negativas, que garantem que

células B com alta afinidade pelo antígeno sobrevivam, ao mesmo tempo em que as de baixa afinidade e as auto-reativas sejam eliminadas. Nesse momento, as células sobreviventes ainda podem seguir dois caminhos distintos, tornando-se células produtoras de anticorpos específicos contra o antígeno indutor; ou tornando-se células de memória, capazes de produzir uma resposta secundária mais rápida, intensa e qualitativamente distinta da resposta imune primária (Liu et al., 1997).

Apesar de vários estudos e muitos avanços nessa área, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Assim, ainda não se sabe exatamente que sinais levam as células B ativadas a se diferenciarem em plasmócitos ou em células de memória, mas acredita-se que o ligante de CD40 seja um sinal negativo que previne as células B a entrar em sua diferenciação terminal, favorecendo sua sobrevivência (Liu et al., 1997).

A apoptose, ou morte celular programada, é atualmente considerada como um mecanismo essencial para a remoção de células supérfluas, velhas ou danificadas, tanto no sistema imune quanto em órgãos não relacionados a essa função. Dessa forma, a apoptose é fundamental durante a embriogênese e a organogênese, incluindo interações sinápticas entre os neurônios, assim como na seleção do repertório de linfócitos (Penninger & Kroemer, 1998).

A morte celular programada tem sido muito estudada por imunologistas, visto que os linfócitos estão sob constante risco de suicídio durante os processos de seleções positivas e negativas. Além disso, falhas adquiridas ou genéticas no processo de apoptose em linfócitos têm um grande impacto patológico, podendo levar ao desenvolvimento de linfócitos auto-reativos, tumores e imunodeficiências, reafirmando a importância da apoptose para o funcionamento normal do sistema imune (Penninger & Kroemer, 1998).

Assim, após a fase de expansão, aproximadamente 95% das células T e B antígeno-específicas sofrem o processo de morte celular programada, conhecido também como morte celular induzida por ativação (AICD), que pode ocorrer devido a uma grande variedade de sinais (Ahmed & Gray, 1996), entre eles a interação Fas/FasL e a apoptose induzida pelo Receptor de Célula B (BCR)

ou pelo Receptor de Célula T (TCR) . É importante lembrar que a apoptose é essencial para a homeostase do sistema imune, assim como para a eliminação de linfócitos auto-reativos (Scaffidi et al., 1999).

A expansão de células T CD4⁺ em camundongos está relacionada, segundo Vella et al. (1997) à ligação do TCR ao antígeno, por meio de APCs, vinculada, portanto, a um aumento de afinidade; e à sinalização através do receptor de superfície CD28. A união desses dois fatores teria, segundo os autores, a função de estimular a proliferação e promover a sobrevivência dessas células. Entretanto, apenas esses dois fatores não são necessários para manter a sobrevivência dos linfócitos, sendo necessários fatores pró-inflamatórios não definidos para sustentar essa sobrevivência, evitando a apoptose. As células B, paralelamente, são selecionadas de acordo com sua capacidade de se ligar ao antígeno, sendo selecionadas negativamente quando a ligação é de baixa afinidade ou quando, após o processo de mutação somática, perdem sua afinidade pelo antígeno (Liu et al., 1989).

A prevenção da apoptose pode estar ligada à geração da memória imunológica. Nesse sentido, existem algumas evidências mostrando que as citocinas que agem via cadeia- γ do receptor para IL-2 (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) induzem genes anti-apoptóticos (*bcl-2* e o *bcl-X_L*) a expressar determinadas proteínas que podem contribuir para a sobrevivência celular (Scaffidi et al., 1999). Outra questão que continua sem uma resposta definitiva, gerando muita controvérsia, é a necessidade ou não de permanente contato com o antígeno, talvez proporcionado pelas FDCs, para a sobrevivência das células de memória, já que ainda são desconhecidos os estímulos que promovem essa sobrevivência. Apesar disso, provavelmente fatores solúveis também estão envolvidos (Sprent & Tough, 1994).

O esclarecimento dos mecanismos que levam os linfócitos T e B para o caminho da morte celular programada ou para a geração de células de memória será de grande importância para a compreensão das repostas imunes celular e humoral, assim como para a compreensão dos mecanismos de ação dos imunógenos.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1– Animais utilizados no experimento

Foram utilizados quatro bezerros *Bos taurus taurus*, machos, da raça Holandesa, sorológica e parasitologicamente negativos para *Anaplasma marginale*. Estes animais, originais do estábulo da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram mantidos em isolamento a prova de artrópodes desde a primeira semana de idade, pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária/Departamento de Veterinária (LBCH/BIOAGRO/DVT) da UFV.

Os bovinos receberam leite *in natura* até os dois meses de idade, duas vezes ao dia. Após o desmame, passaram a receber ração balanceada, com 20% de proteína e quantidade definida de volumoso, oferecida às sete e às 15 horas, e água *ad libitum*.

4.2 – Esquema de inoculação

Dos quatro animais selecionados, três (B1, B2 e B3) foram utilizados para inoculação experimental com a amostra de *A. marginale* AUFV-1

2ª passagem (grupo inoculado) e o quarto animal (B4) foi utilizado como controle negativo.

Cada animal do grupo inoculado foi inoculado, por via intravenosa, com $1,0 \times 10^6$ parasitas. A inoculação foi feita no dia zero, e os animais foram tratados no dia 38 após a inoculação, com 20mg/Kg de oxitetraciclina (Oxirat[®]).

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

Exames clínicos dos animais para observar possíveis sinais de manifestação da anaplasmose eram realizados diariamente, durante os 52 dias do experimento. Também eram realizados esfregaços sangüíneos para detecção do parasita e hematócrito para detecção de anemia.

4.3 – Coletas dos linfonodos

Coletas de linfonodos superficiais (pré-escapulares direitos e esquerdos) foram realizadas com o objetivo de avaliar a resposta imune *ex vivo* ao *A. marginale*.

As coletas foram realizadas semanalmente, aos 6, 13, 20, 27 e 34 dias pós-inoculação e no dia 14 após o tratamento (52 dias pós inoculação). Também foi coletado um linfonodo do animal controle. Para a realização das cirurgias, os animais foram previamente tricotomizados e mantidos em jejum durante 12 horas. Foi feita anestesia local com 10ml de lidocaína e, após a retirada total do linfonodo e sutura da pele foi aplicada solução de pentabiótico (Penfort[®]), por via intramuscular.

4.4 – Histopatologia dos linfonodos bovinos

Os linfonodos foram fixados, durante 24 horas, em formol 10% tamponado pH 7,2 (100ml de aldeído fórmico, 4g de fosfato monobásico de sódio, 4,5g de fosfato dibásico de sódio e água destilada q.s.p. 1000ml). Então, os linfonodos foram cortados em cinco fragmentos, os quais foram fixados por

mais 24 horas em uma solução nova de formol tamponado pH 7,2. Após fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções alcólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 24 horas em cada solução alcoólica. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast (SIGMA[®]; Prophet et al., 1992).

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

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

4.5 – Pesquisa de antígenos de *A. marginale* em linfonodos bovinos através da técnica de Imunoperoxidase Indireta

Os cortes histológicos foram inicialmente deixados em estufa a 56°C *overnight*, sendo posteriormente desparafinados em xilol através de duas passagens de 30 minutos cada e hidratados em soluções alcólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) e PBS pH 7,4 (1,48g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,494g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 7,2g de cloreto de sódio e água bidestilada q.s.p. 1000ml), trocando-se de solução a cada 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram lavados durante 5 minutos com PBS pH 7,4. Em seguida, os cortes foram cobertos com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro e, sem deixar secar os cortes, colocou-se anticorpo primário específico (IgG de coelho anti-*Anaplasma marginale*), produzido pelo Laboratório de Biologia e Controle de

¹ Microscópio Óptico – Eclipse E600 – Nikon – Japan

Hematozoários (LBCH), diluído 1:20 em PBS pH 7,4; então, os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada, e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase; SIGMA[®]), diluído 1:300 em PBS 7,4. Após incubação em câmara úmida, durante 50 minutos a 37°C, os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4.

Os cortes foram então colocados em solução reveladora recém preparada [25mg de diaminobenzidina (DAB) e 200µl de H₂O₂ 30 volumes em 100ml de PBS pH 7,4] durante 15 minutos. Finalmente, os cortes foram lavados durante 5 minutos em PBS pH 7,4 e foi feita a contracoloração com Hematoxilina de Harris 1:9 em água bidestilada durante 4 minutos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan entre lâmina e lamínula.

4.6 – Pesquisa de antígenos CD4, CD8 e WC1 em linfonodos bovinos através da técnica de Imunoperoxidase Indireta

Para a pesquisa de antígenos CD4, CD8 e WC1, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no item 4.5. Porém, os anticorpos primários utilizados foram obtidos de sobrenadantes íntegros do cultivo dos hibridomas IL-A11 (anti-CD4), IL-A51 (anti-CD8) e IL-A29 (anti-WC1), todos provenientes da ATCC. Para os três antígenos, e com o intuito de bloquear os possíveis sítios de ligação inespecífica, foi utilizado soro normal de coelho após o bloqueio da peroxidase endógena; e o anticorpo secundário utilizado foi IgG de coelho anti-IgG de camundongo (SIGMA[®]).

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

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

Após desparafinização e hidratação dos cortes, de acordo com protocolo descrito no item 4.5, os cortes foram incubados durante 20 minutos a 37°C com proteinase K (20µg/ml em Tris/HCl 10mM, pH 7,4), sendo posteriormente lavados duas vezes com PBS pH 7,4 durante 5 minutos cada. Foi feito, então, o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio metanólico 0,3% durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Os cortes foram novamente lavados com PBS pH 7,4 durante 5 minutos. As células foram, então, colocadas sobre gelo, e as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% durante dois minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 7,4 durante cinco minutos cada.

Os cortes foram enxugados levemente, cobertos com 50µl da mistura TUNEL (5µl da enzima terminal desoxirribonucleotidil transferase e 45µl de nucleotídeos marcados com fluoresceína) e cobertos com lamínula, para propiciar uma reação homogênea e evitar evaporação. Após incubação durante 60 minutos em câmara úmida a 37°C, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4, durante 5 minutos cada, e foram adicionados 50µl de *Converter-POD* (anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase) sobre cada corte, que foram imediatamente cobertos com lamínula. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram novamente lavadas com PBS pH 7,4, por três vezes, durante 5 minutos cada.

A revelação foi feita com solução de DAB (20mg de DAB em 20ml de Tris 0,1M pH 7,4 e 20µl de H₂O₂ 30 volumes), durante 10 minutos em temperatura ambiente, repetindo-se, em seguida, as lavagens com PBS pH 7,4.

Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris 1:9 durante 4 minutos, sendo, então, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan[®] entre lâmina e lamínula.

4.8 – Contagem de células TUNEL positivas em linfonodos bovinos

As células TUNEL positivas foram contadas com auxílio de microscópio Olympus BH-2 – RFCA e do *software* Image SXM, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram contadas as células dos linfonodos coletados aos 6, 13, 20, 34 e 55 dias após a inoculação, sendo esses linfonodos denominados L1, L2, L3, L5 e L6, respectivamente. Dessa forma, foram contados cinco campos nos centros germinais (CG), cinco na região paracortical (PC) e cinco nos cordões medulares (CM) de cada linfonodo. O mesmo procedimento foi adotado para a contagem das células do linfonodo coletado do animal controle, denominado L7. Cada um dos campos contados correspondia a $3967\mu\text{m}^2$, e as células foram contadas com aumento de 1000x.

4.9 – Coleta de sangue para obtenção de soro

Coletou-se sangue dos animais para obtenção de soro um dia antes da inoculação (dia -1) e semanalmente durante todo o experimento.

O sangue foi coletado através da punção jugular em frascos coletores de 5ml (BD VacutainerTM), sem anticoagulante. O sangue foi mantido em repouso a 4°C durante toda a noite e, na manhã seguinte, realizou-se a retirada do coágulo e a centrifugação das amostras, a 300g, durante 5 minutos. O soro obtido de cada amostra foi, então, recolhido com micropipeta e colocado em tubos tipo *Eppendorf*, armazenados a -20°C.

4.10 – Teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*A. marginale*

Para confirmar a infecção dos animais, foi realizada pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* no soro através do teste imunoenzimático-ELISA, seguindo protocolo de rotina do LBCH. Foi utilizado, para tanto, o soro coletado no dia -1 e 13 dias pós-inoculação. Os testes foram feitos em triplicatas.

As placas de ELISA Hemobag^{®2} foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas com antígeno de *A. marginale* (5µg/well) produzido pelo LBCH e diluído em Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159g de Na₂CO₃, 0,293g de NaHCO₃ e água destilada q.s.p. 100ml). Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0g de cloreto de sódio; 500µl de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1000ml), e o bloqueio foi feito com solução de caseína 2% em PBS pH 7,6 (8,5g de NaCl, 1,28g de Na₂ HPO₄, 0,16g de NaH₂PO₄.2H₂O e água destilada q.s.p. 1000ml) durante 60 minutos em temperatura ambiente. Foram feitas mais duas lavagens e os soros dos animais foram adicionados, diluídos 1:100 em Tampão de Incubação (100ml de PBS pH 7,6, caseína 0,25% e Tween 20 0,05%). Após incubação de 2 horas em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com Tampão de Lavagem e, em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgG bovina, conjugada com peroxidase; SIGMA[®]), diluído 1:20000 em Tampão de Incubação. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas e, após esse período, foram feitas mais seis lavagens com Tampão de Lavagem

Em seguida, foi feita a revelação do teste, através da adição do substrato, composto por 4mg de OPD (θ - fenildiaminobenzeno), 2,5µl de H₂O₂ e 20ml de Tampão de Substrato pH 5,0 (7,19g de Na₂HPO₄, 5,19g de ácido cítrico e água destilada q.s.p. 1000ml). As placas foram, então, incubadas durante 20 minutos na ausência de luz e a reação foi interrompida com 30µl de ácido sulfúrico 1:20. Finalmente, as placas foram lidas em leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492nm (Titertek Multiskan[®] PLUS).

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

4.11 – Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Foi feito o isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com o objetivo de reestimar as células *ex vivo* com os peptídeos sintéticos 13.590 e 13.591. O sangue dos animais foi coletado assepticamente em frascos coletores de 5ml com vácuo e solução de anticoagulante (heparina; BD VacutainerTM) através de punção jugular. As coletas de sangue foram realizadas de acordo com o seguinte cronograma: dia – 1e aos 6, 13, 20, 27, 34 e 55 dias pós-inoculação, sendo esta última coleta realizada aos 14 dias após o tratamento dos animais.

Adotou-se o método de separação por gradiente de densidade celular utilizando-se Ficoll-Paque (Bittar, 2002). O material foi, inicialmente, mantido em temperatura ambiente. Verteram-se cuidadosamente e em condições de esterilidade 15ml de sangue sobre 15ml de Ficoll-Paque em tubos de centrífuga de 50ml estéreis. O material foi centrifugado a 300g por um período de 40 minutos a 18°C.

Após a centrifugação, todo o material foi mantido em gelo até o final do procedimento. A interface esbranquiçada contendo células mononucleares periféricas foi retirada cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e foi então transferida para novos tubos de centrífuga de 50ml contendo Solução Balanceada de Sais de Hank – HBSS pH 7,2 (0,4g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 8,0g de NaCl, 0,35g de NaHCO₃, 0,048g de Na₂HPO₄, 1,0g de D-glucose, 0,01g de vermelho de fenol e água bidestilada q.s.p. 1000ml) suficiente para um volume final de 40ml. As células foram lavadas por centrifugação com HBSS pH 7,2 a 300g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado após a lavagem. Ressuspendeu-se o *pellet* celular em 4ml de Solução de Lise (0,829g de NH₄Cl, 0,1g de KHCO₃, 0,0037g de EDTA e água bidestilada q.s.p. 100ml), com a finalidade de hemolisar as hemácias restantes. As células foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por 8 minutos, sendo, em seguida, centrifugadas a 300g durante 10 minutos a 4°C.

Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes por um período de 10 minutos cada com HBSS e o pellet celular foi ressuspensionado em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - SIGMA[®]), suplementado com D-glucose (4,0g/l), ácido fólico (6mg/l), L-arginina (116mg/l), L-asparagina (36mg/l), NaHCO₃ (2,0g/l), solução antibiótica e antimicótica 100X SIGMA[®] (10ml/l). Antes do uso, foram adicionados ao meio de cultivo 10% de Soro Fetal Bovino, L-glutamina 2mM e 2-mercaptoetanol (50μM).

4.12 – Isolamento de corpúsculos iniciais de *A. marginale* a partir de sangue congelado

Para utilização como controle positivo no estímulo das células mononucleares de sangue periférico, foi feito o isolamento de corpúsculos iniciais de *A. marginale*. A amostra de sangue, contendo $4,98 \times 10^8$ parasitas/ml, que se encontrava congelada em nitrogênio líquido, foi aquecida a 37°C. Após o descongelamento, o sangue foi lavado com meio RPMI incompleto, por centrifugação, a 500g por 5 minutos, para retirada do DMSO. Não houve a formação de pellet, indicando hemólise, e o material foi então lavado com tampão de lavagem (0,6055g de Tris, 8,1816 g de NaCl, 0,3722g de EDTA, 0,0174g de PMSF, 0,2g de Timerosal e água destilada q.s.p. 1000ml; mantido sob agitação a 4°C durante 12 horas) por 3 vezes, a 500g e 4°C.

A lise das hemácias foi finalizada através de sonicação, em banho de gelo, com uma potência de 30 watts durante 30 segundos, por 4 vezes. O material foi então centrifugado a 48400g durante 20 minutos a 4°C, removendo-se o sobrenadante. Em seguida, foram feitas 4 lavagens, observando-se a proporção aproximada de uma parte de lisado para cinco partes de tampão de lavagem, e centrifugando-se a 48400g durante 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi, então, ressuspensionado em solução de NaCl 0,85% com antibióticos, na proporção de 1:5.

O material foi novamente sonicado, em banho de gelo, a 30 watts por 20 segundos e, depois, centrifugado a 48400g durante 20 minutos a 4°C. Após essa etapa, foi retirado o sobrenadante e, cuidadosamente, a "gelatina" formada acima do *pellet*, que foi ressuspenso, em uma proporção de 4%, em solução salina-antibiótico. Foi feita nova sonicação, em banho de gelo, a 30 watts por 10 segundos. O material foi então centrifugado a 27200g durante 30 minutos a 4°C e ressuspenso em solução salina-antibiótico, conforme descrito anteriormente. Finalmente, os corpúsculos iniciais foram sonicados, em banho de gelo, a 30 watts por 20 segundos, para uma melhor homogeneização.

O material foi aliqotado e estocado a -70°C e, posteriormente, foi feita a dosagem de proteína utilizando-se a técnica do ácido bicinonínico. Para a caracterização da amostra, foi feito um gel de poliacrilamida, comparando os resultados da amostra com corpúsculos iniciais produzidos pelo LBCH.

4.13 – Desenho dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos utilizados no experimento, baseados na estrutura da proteína MSP-2, foram sintetizados de acordo com técnica descrita por Merrifield em 1963. Foram utilizados dois peptídeos sintéticos, o 13590 e o 13591, híbridos de peptídeos oriundos dos clones 11.2 e DF.5 da proteína MSP-2.

A construção dos peptídeos sintéticos foi baseada em estudos computacionais de sítios imunogênicos da proteína MSP-2, de acordo com suas propriedades antigênicas (HOOP e WOODS, 1981); potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU e FASMAN, 1978); hidrofobicidade e hidrofiliidade (KYTE e DOOLITTLE, 1982). As duas seqüências aminoacídicas foram desenhadas no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa e sintetizadas no “Instituto de Inmunologia del Hospital San Juan de Dios” em Bogotá, Colômbia. A metodologia adotada foi a *Good Manufacture Proceeding* (GMP).

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

As células sangüíneas mononucleares periféricas foram estimuladas *ex vivo* com os peptídeos sintéticos 13590 e 13591 para avaliação da capacidade imunogênica dos mesmos através da produção de citocinas.

Após o isolamento, as células foram contadas e semeadas em placas de cultivo celular de 24 *wells* NUNCLON™ em 2ml de meio de cultivo DMEM completo em cada *well*, com uma densidade de $2,0 \times 10^6$ células.

Anteriormente ao estímulo, as células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por um período de 4 horas com o objetivo de promover a adaptação às condições de cultivo *ex vivo*. As células provenientes de cada coleta sangüínea foram estimuladas com os peptídeos 13590 e 13591, sendo os estímulos feitos em duplicatas. Além disso, foram feitos dois controles positivos, um com corpúsculos iniciais de *Anaplasma marginale* e outro com Concanavalina A (SIGMA®); e um controle negativo, que não recebeu nenhum estímulo. Todos os estímulos foram realizados com concentração de 2,5µg/ml.

A contagem celular e a verificação da viabilidade foram realizadas no 3º e no 5º dia após o estímulo.

4.15 – Análise estatística

Os dados de número de células em apoptose foram submetidos à análise de variância utilizando-se o teste F e os efeitos da interação Região X Dias foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados de proliferação celular foram submetidos à análise de variância utilizando-se o teste F e os efeitos da interação Estímulo X Dias pós-inoculação também foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Exame clínico dos animais e teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*A. marginale*

Ao exame clínico, apenas um dos animais inoculados demonstrou sinais da doença, apresentando febre e anorexia. Os demais animais permaneceram clinicamente normais, embora aos 25 dias pós-inoculação todos apresentassem corpúsculos iniciais detectáveis nos esfregaços sangüíneos. Nenhum dos animais desenvolveu anemia, detectada através de hematócrito. Esses achados confirmam as observações de Gale et al. (1996), que afirmam que o período de incubação da doença pode variar entre 20 e 40 dias, dependendo da dose de inoculação. Wyatt et al. (1996) observaram um pico de parasitemia aos 32 dias pós-inoculação, quando, segundo Palmer et al. (2000), esta pode atingir mais de 10^9 eritrócitos parasitados/ml, detectáveis microscopicamente.

O teste ELISA, realizado com soro coletado um dia antes da inoculação e 13 dias pós-inoculação, revelou que os animais eram negativos inicialmente, tornando-se positivos após a inoculação. Não foram detectados anticorpos no soro do animal controle negativo. Em um estudo realizado por Brown et al. (1998a), anticorpos anti-*A. marginale* foram detectados apenas após a segunda inoculação, provavelmente porque a pesquisa era dirigida

especificamente contra IgG1 e IgG2, imunoglobulinas típicas da resposta imune secundária, e que aparecem tardiamente na resposta primária (Tizard, 2000). No presente trabalho, o teste ELISA foi realizado para a detecção de anticorpos totais, o que pode explicar o aparecimento de reatividade positiva já aos 13 dias pós-inoculação. Além disso, como afirmam Kosco-Vilbois et al. (1997), imunoglobulinas de baixa afinidade são produzidas já na primeira semana após o estímulo, com o objetivo de formar complexos com o antígeno, complexos estes que serão posteriormente capturados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs).

5.2 – Identificação dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* isolados

A dosagem protéica dos corpúsculos iniciais isolados revelou um total de 3,54mg/ml de proteína. Foram identificadas as seis principais proteínas de superfície do *A. marginale*, de acordo com o padrão de peso molecular, caracterizando o sucesso do isolamento. Outro fato que comprova o isolamento dos corpúsculos iniciais é o teste ELISA realizado, já que a placa foi sensibilizada com essa amostra, obtendo-se alta absorvância óptica quando foi utilizado um soro comprovadamente positivo para *A. marginale*.

5.3 – Avaliação histopatológica de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV-1

Nos cortes de linfonodos corados com Hematoxilina/Eosina, aos seis dias pós-inoculação já é possível observar a formação de alguns centros germinais, mas a principal característica nas lâminas é a proliferação celular na área paracortical (Figuras 1A e 1B).

Esses resultados indicam que uma resposta imune adaptativa foi dirigida contra o inóculo, caracterizando-se por hiperplasia de áreas paracorticais e aparecimento de CGs, o que sugere uma resposta do tipo T-dependente, já que a formação de CGs ocorre em todos os órgãos linfóides periféricos quando

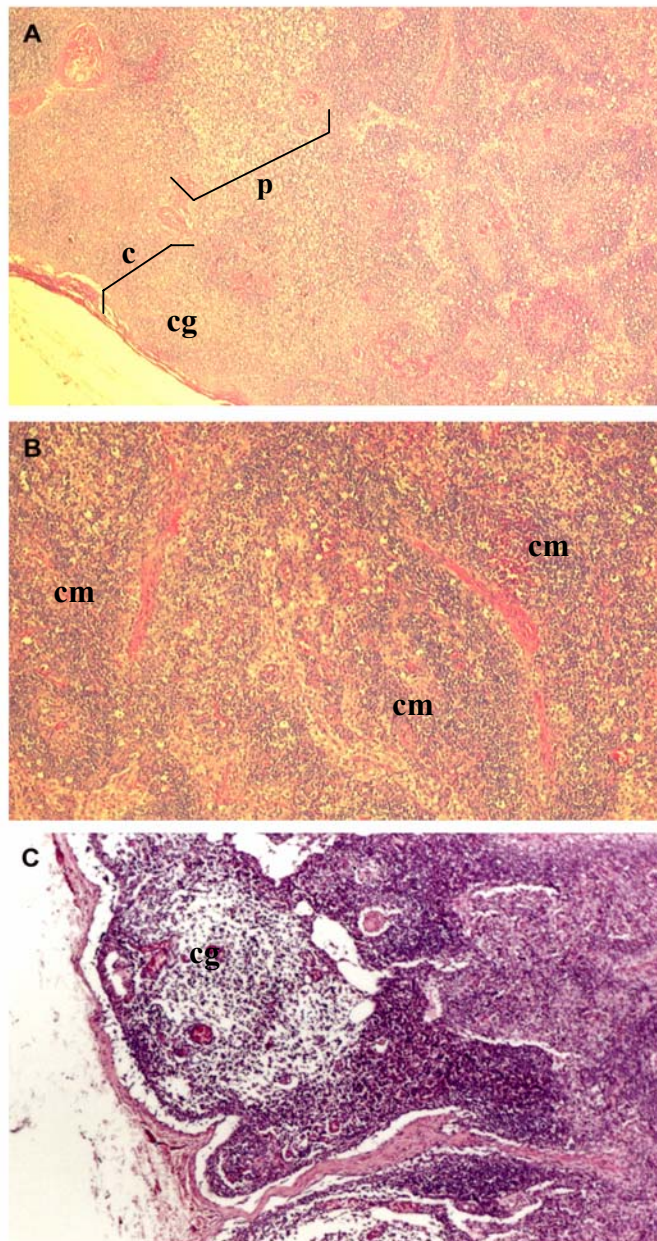


Figura 1 – Alterações histopatológicas em cortes de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *Anaplasma marginale* AUFV1, coloração H&E. **A.** Seis dias pós-inoculação, mostrando reatividade positiva, com formação de centros germinais (cg) na região cortical externa (c) e hiperplasia da região paracortical (p), 40X. **B.** Proliferação celular nos cordões medulares (cm) seis dias pós-inoculação, 100X. **C.** Regressão dos centros germinais (cg) 55 dias pós-inoculação, 100X.

antígenos não solúveis são utilizados como imunógenos; embora alguns tipos de antígenos T-independentes possam gerar reações semelhantes a CGs, como lipopolissacarídeos ligados a haptenos e alguns surfactantes (Kelsoe, 1995). Dessa forma, pode-se reafirmar que o antígeno utilizado induziu uma resposta imune T-dependente, já que nenhuma dessas substâncias estava presente no inóculo ou no veículo utilizado.

Aos 13 dias pós-inoculação, já podem ser observados plasmócitos, corados em vermelho pelo Verde Metil Pironina nos cordões medulares (Figura 2); predomina a hiperplasia de áreas paracorticais e cordões medulares, sendo que a grande formação de CGs é observada apenas a partir dos 20 dias. Aos 34 dias há uma diminuição na reatividade dos CGs, mas essas estruturas ainda podem ser observadas nas lâminas. Finalmente, aos 55 dias observa-se o esvaziamento dos CGs, podendo-se visualizar a regressão dessas estruturas (Figura 1C).

De acordo com vários autores, ao utilizarem antígenos T-dependentes, na resposta imune primária os CGs aparecem ao redor do quarto dia pós-imunização, chegando ao seu máximo número ao redor de 10 dias e declinando a partir da terceira semana (Gulbranson-Judge et al., 1997; Han et al., 1997; Smith et al., 1997; Camacho et al., 1998; Freitas, 2002). A cinética de formação dos CGs observada neste trabalho concorda parcialmente com o que foi descrito por esses autores, já que no sexto dia pós-inoculação já é observada a formação de CGs. Entretanto, o número máximo dessas estruturas foi observado aos 20 dias, e o início de seu declínio só foi observado aos 34 dias. Talvez isso possa ser explicado pelo período de incubação da doença, que pode variar entre 20 e 40 dias, quando ocorre o pico de parasitemia (Arulkanthan et al., 1999), o que continuaria estimulando o sistema imunológico e a formação de CGs. Após esse período, iniciou-se o declínio, que se confirmou após o tratamento quimioterápico dos animais. Resultados semelhantes foram observados por Reardon & Pierce (1981) em linfonodos de cães inoculados com *Ehrlichia canis*, com CGs típicos sendo observados até os 42 dias pós-inoculação.

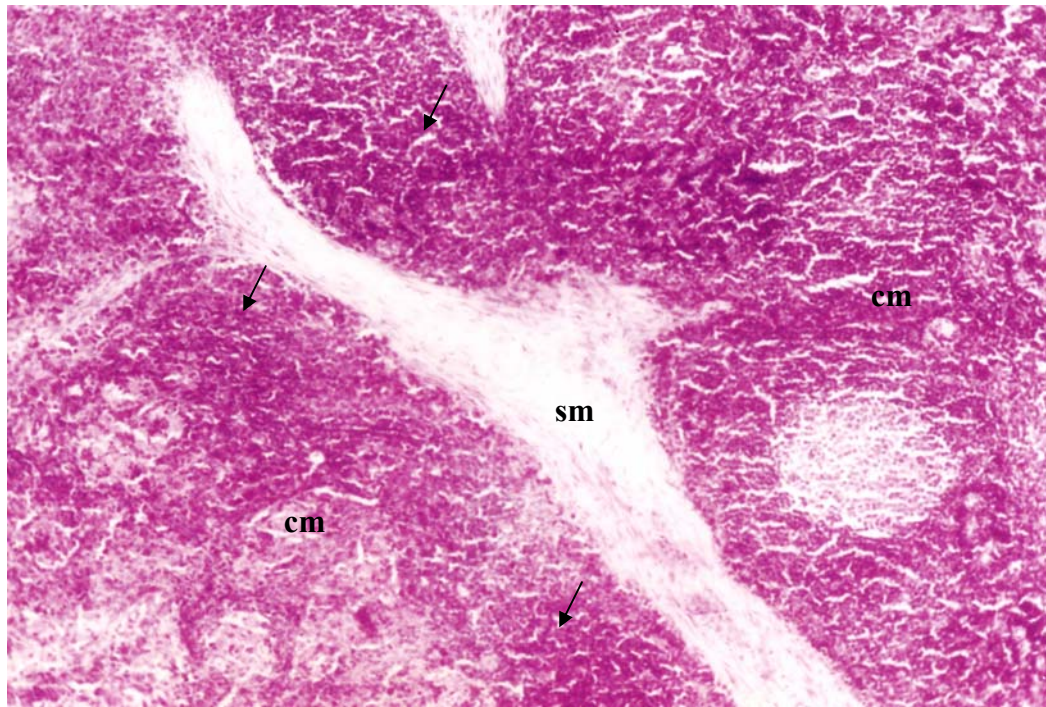


Figura 2 – Hiperplasia da região medular em bovinos 13 dias depois da inoculação com a amostra de *Anaplasma marginale* AUFV1. A coloração avermelhada indica a alta atividade de síntese proteica nos cordões medulares (cm), interpostos aos seios medulares (sm). Plasmócitos (setas) com grande quantidade de rRNA no citoplasma. Coloração Verde Metil Pironina, 100X.

Os CGs observados ao longo de todo o experimento eram CGs típicos, contendo uma zona escura, constituída por célula basais eosinofílicas, e uma zona clara, sobreposta a essa, constituída por células menores e homogêneas, além de células dendríticas e macrófagos, de acordo com o descrito por vários autores (MacLennan et al., 1994; Gulbranson-Judge et al., 1997; Han et al., 1997; Camacho et al., 1998; Freitas, 2001). As características histológicas observadas também têm sido descritas em diversos tecidos linfóides secundários de humanos, tais como placas de Payer, tonsilas, baço e linfonodos. Segundo Gulbranson-Judge et al. (1997), os CGs se desenvolvem em resposta a estímulo com antígenos T-dependentes em folículos primários, localizados em todos os órgãos linfóides periféricos. Igualmente, Reardon & Pierce (1981), em trabalho experimental com *Ehrlichia canis*, descreveram alterações histológicas dos CGs e das áreas paracorticais semelhantes no baço e nos linfonodos.

Dessa forma, baseado no anteriormente exposto, pode-se considerar que as alterações observadas nos linfonodos dos animais inoculados são eventos celulares típicos de uma resposta imune primária que podem ser observados em todos os órgãos linfóides periféricos em resposta a antígenos T-dependentes.

Segundo Smith et al. (1997), durante a primeira semana as células formadoras de anticorpos localizadas nas áreas extrafoliculares produzem anticorpos de baixa afinidade, codificados por segmentos do gene V que ainda não sofreram hipermutação somática. Isso poderia explicar a hiperplasia de cordões medulares, observada já no sexto dia pós-inoculação e, em maior número, a partir do dia 13. Essas áreas são compostas por numerosas células, facilmente caracterizadas como plasmócitos quando coradas pelo Verde Metil Pironina devido à afinidade da Pironina pelo RNA ribossômico. Assim, essas células corresponderiam a linfócitos B, que migraram para os cordões medulares e se transformaram em plasmócitos, o que segundo Zheng et al. (1996) e Tarlinton (1998) ocorre durante a resposta imune humoral.

No linfonodo do animal não inoculado observam-se alguns folículos secundários, entretanto não é observada hiperplasia de áreas paracorticais e cordões medulares, indicando, possivelmente, uma resposta não

específica. Essa afirmação é baseada nas observações de Morrison et al. (1986), que constataram, em linfonodos de animais saudáveis, 30 a 70% de folículos linfóides contendo CGs, o que demonstra que, mesmo em animais saudáveis, os linfonodos são extremamente ativos. Em trabalho experimental com *Babesia bovis*, Freitas (2001) também observou reatividade de CGs no linfonodo do animal não inoculado, que foi atribuída, como no presente trabalho, a respostas inespecíficas.

Esses resultados também indicam que, embora o inóculo utilizado não tenha produzido um quadro clínico de doença, exceto em um dos animais, foi capaz de produzir uma resposta imune com geração de células de memória, já que, segundo Morrison et al. (1986), as duas principais funções dos CGs formados durante um desafio com antígenos estranhos são a produção de células de memória e a regulação da resposta de anticorpos.

5.4 – Avaliação imunohistoquímica de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV-1

O exame dos cortes histológicos corados pelo método da Imunoperoxidase Indireta para detecção de antígenos de *A. marginale* nos linfonodos revela que aos seis dias pós-inoculação já há reatividade fortemente positiva nas células dendríticas dos CGs (Figura 3A), observada ao longo de todo o experimento, até os 34 dias pós-inoculação (Figura 3B). Já no linfonodo do animal controle negativo, não há reação positiva (Figura 3C).

Esses resultados vêm confirmar que houve geração de resposta imune, com o antígeno sendo processado por células dendríticas já no sexto dia pós-inoculação.

De acordo com Kosco-Vilbois et al. (1997), a função das imunoglobulinas de baixa afinidade, que antecedem a produção de imunoglobulinas de alta afinidade e que já estão presentes na primeira semana após o estímulo, é formar complexos com antígenos circulantes, que serão capturados pelas células dendríticas foliculares para serem apresentados às

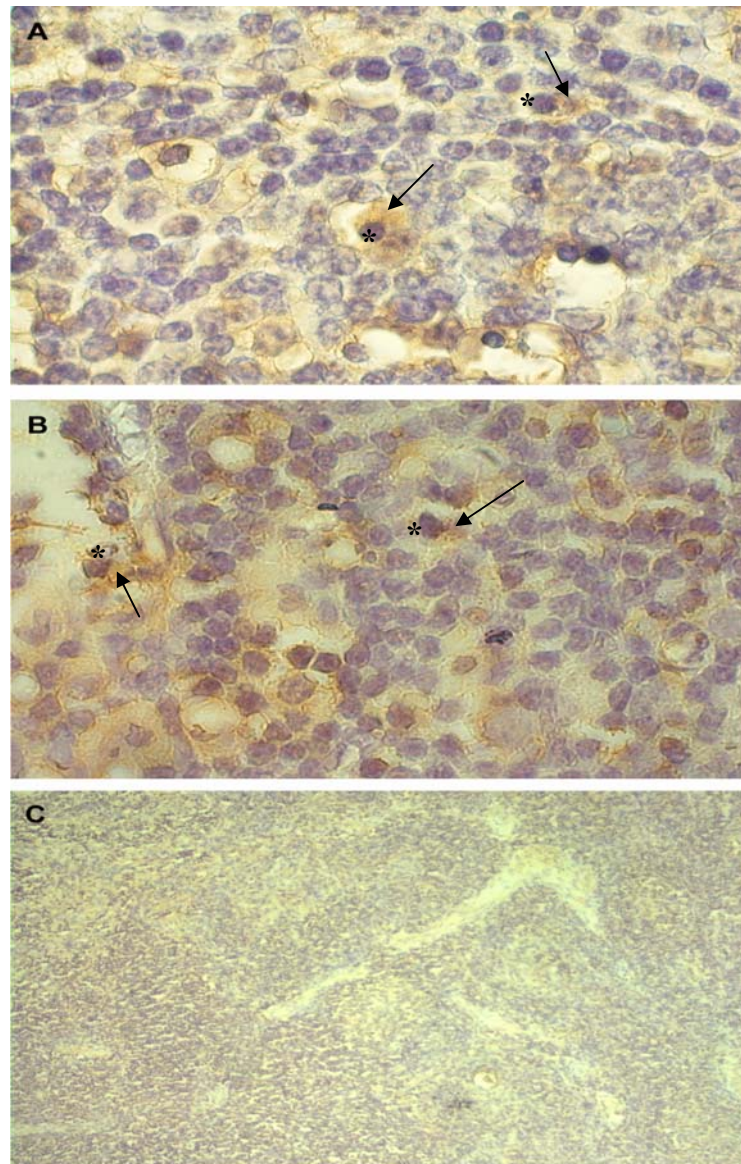


Figura 3 – Resultados do teste de Imunoperoxidase Indireta (Ipx) para detecção de antígenos de *Anaplasma marginale* em linfonodos de bovinos, Ipx. **A.** Forte reatividade positiva em células dendríticas foliculares (setas) aos seis dias após a inoculação com a amostra AUFV1; antígenos de *A. marginale* (setas) sendo apresentados a linfócitos (*), 1000X. **B.** Antígenos de *A. marginale* sendo apresentados a linfócitos (*) aos 34 dias pós-inoculação, 1000X. **C.** Ausência de reatividade positiva no linfonodo do bovino negativo, 100X.

células Th durante a formação dos CGs. A formação desses complexos na primeira semana pós-inoculação poderia explicar a reatividade positiva já aos seis dias no presente estudo, aumentando progressivamente devido ao processo de maturação das células dendríticas. Por outro lado, os achados de Freitas (2001) concordam apenas parcialmente com os deste trabalho, já que só foi encontrada reatividade positiva contra antígenos de *B. bovis* aos 12 dias pós-inoculação, talvez por se tratar de uma amostra atenuada ou por ser este um protozoário, com metabolismo diferente de uma rickettsia.

Os resultados encontrados em nosso estudo com relação à reatividade de CGs, aos eventos proliferativos e à presença de antígenos de *A. marginale* nos cortes de linfonodos dos animais inoculados confirmam que, de fato, houve o desenvolvimento de uma resposta imune típica nesses animais, confirmando assim, com uma amostra brasileira, o que foi sugerido por Palmer et al. (2000), quando defenderam que a persistência da infecção em animais imunocompetentes era devida, provavelmente, à variação antigênica da proteína de superfície MSP-2, e não à ausência de uma resposta imune eficaz.

Por outro lado, a constante presença do antígeno processado nas células dendríticas poderia levar a uma pressão sobre a rickettsia, obrigando esta a expressar variantes já codificadas em seu genoma.

Os testes de Imunoperoxidase Indireta realizados para detectar a fenotipagem celular revelam um pequeno aumento no número de linfócitos T CD4⁺ nos cortes histológicos dos animais inoculados (Figuras 4A e 4B) com relação ao observado no animal controle negativo. Entretanto, nos testes para detectar linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T $\gamma\delta$, não foi observada nenhuma diferença importante entre os animais inoculados e o animal controle negativo (Figuras 4C e 4D).

Embora o aumento de células CD4⁺ por nós observado seja pequeno, é importante lembrar que as células Th são indispensáveis para a formação de um CG típico (Thorbecke et al., 1994; Kelsoe, 1995; Gulbranson-Judge et al., 1997; Fu & Chaplin, 1999), como os vistos nos cortes de linfonodos dos animais inoculados. Sendo as células T CD4⁺ uma via importante na

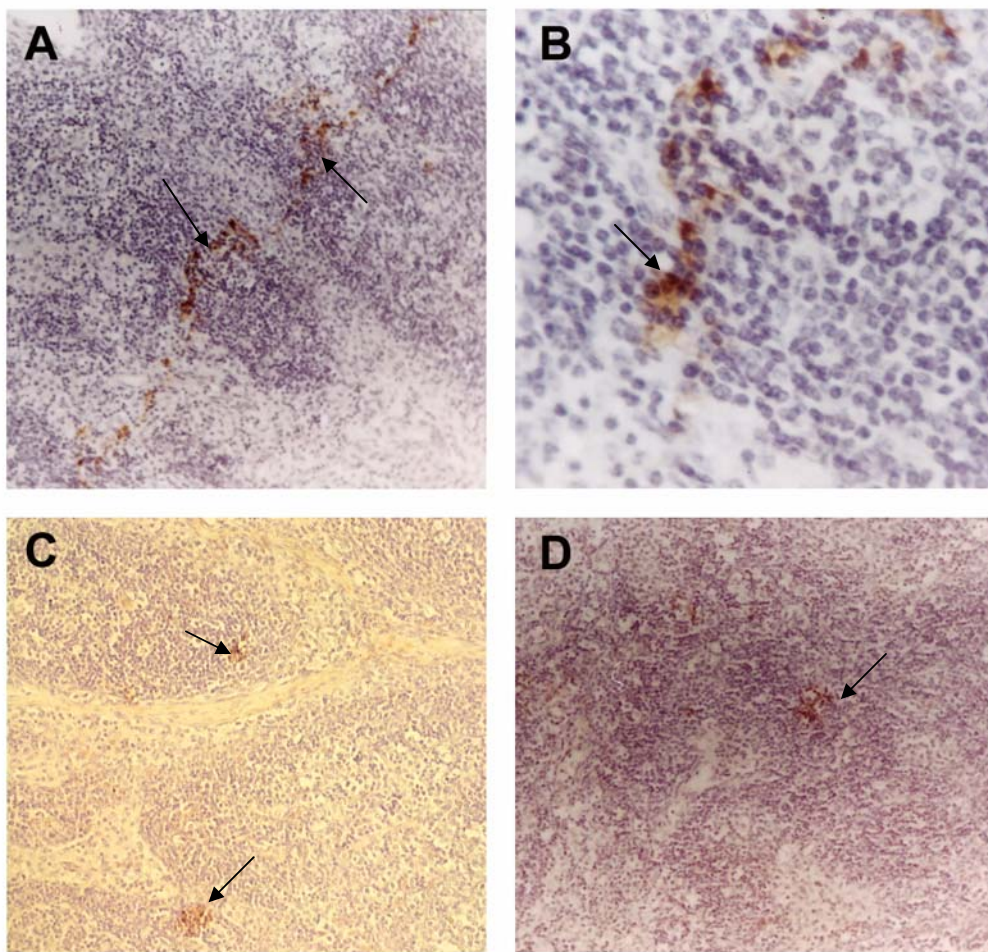


Figura 4 – Resultados do Teste de Imunoperoxidase Indireta (Ipx) para detecção da fenotipagem celular em cortes de linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *Anaplasma marginale* AUFV1, seis dias após a inoculação. **A.** Detecção de grupos de linfócitos CD4+ (setas), Ipx, 100X. **B.** Linfócitos CD4+ (seta), Ipx, 400X. **C.** Detecção de poucos linfócitos CD8+ (setas), Ipx, 200X. **D.** Detecção de poucos linfócitos WC1+ (seta), Ipx, 100X.

imunidade contra o *A. marginale*, explicaria-se esse aumento. Dessa forma, pelo exposto anteriormente, o presente estudo vem confirmar a participação dos linfócitos T CD4+ na resposta imune contra o *A. marginale*, como já foi sugerido por outros autores (Brown et al., 1998b; Tuo et al., 2000). É provável que o aumento de células CD4+ detectado nos linfonodos dos animais inoculados seja devido a uma colaboração entre células T e B na formação de CGs, e que essas células sejam responsáveis pela secreção de IFN- γ para a ativação de macrófagos e para a produção de IgG2, imunoglobulina opsonizante. Além disso, sabe-se que o *A. marginale* não pode ser atingido por células CD8+ citotóxicas por se tratar de um patógeno intraeritrocitário obrigatório, já que estas células não possuem o MHC de classe I, essencial para esse tipo de resposta (Tizard, 2000).

No entanto, Valdez et al. (2002), em um trabalho com infecção experimental de bovinos com *A. marginale* timentomizados e tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4, não observaram diferenças significativas no desenvolvimento da doença entre os animais tratados e o animal controle, sendo que todos os animais foram capazes de controlar a fase aguda da doença. Tendo em vista a contradição, os mesmos autores argumentam que, talvez, o nível de depleção de linfócitos T CD4+ não tenha sido suficiente para bloquear a resposta imune contra o *A. marginale* e a subsequente produção de anticorpos das classes IgG1 e IgG2, como era esperado.

Embora o papel dos linfócitos T $\gamma\delta$ ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que essas células estão presentes em grande número no sangue periférico de bovinos, especialmente em animais jovens (Howard et al., 1999). Segundo Hermosilla et al. (1999), o número dessas células pode chegar a 75% do total de células T em neonatos e, mesmo em animais adultos, a proporção chega a 15-18%, enquanto em camundongos e no homem esse total não passa de 5%. Ainda de acordo com os autores, os linfócitos T $\gamma\delta$ são capazes de secretar tanto citocinas atribuídas às células Th1 quanto às células Th2, possuem capacidade citolítica e têm efeito regulador do sistema imune; além de terem capacidade de ligar antígenos independentemente de moléculas MHC e funcionar, provavelmente, como "sentinelas", acumuladas em tecidos epiteliais.

Dessa forma, essas células parecem desempenhar papel importante em infecções com *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, mas não em infecções com *Eimeria vermiformis*.

No presente estudo, não foram detectadas diferenças no número de linfócitos T $\gamma\delta$ entre os linfonodos dos animais inoculados com relação ao linfonodo do animal controle. Os resultados poderiam indicar que essas células não têm um papel significativo na resposta imune contra o *A. marginale*; entretanto, não se pode afirmar que essas células não tenham importância na imunidade contra esse patógeno, sendo necessários mais estudos para esclarecer essa questão, como estudos de proliferação com células de sangue periférico e estudos de depleção dessas células durante uma infecção experimental de *A. marginale*.

5.5 – Apoptose em linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV-1

Os resultados da análise de variância mostraram a existência de diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). Entretanto, não houve diferença significativa entre as regiões analisadas, mas sim entre os dias de coleta dos linfonodos. Como não foi possível adaptar um modelo de regressão, as médias da interação Região X Dias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%, e os resultados estão expostos no Quadro 1.

Ao se analisarem as amostras de linfonodos dos animais inoculados coradas pela técnica de TUNEL (TdT), são observadas diversas células TUNEL+ aos seis (L1) e 13 (L2) dias pós-inoculação, localizadas tanto nos centros germinais (CGs) quanto na região paracortical (PC) e nos cordões medulares (CM), formando, muitas vezes, grupos de células TUNEL+ (Figuras 5A e 5B). Apenas nos CGs o número de células em apoptose foi estatisticamente diferente aos seis dias; nas outras regiões, o número de células TUNEL+ foi estatisticamente igual aos seis e 13 dias.

Quadro 1 – Médias do número de células em apoptose encontradas em cada região dos linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV1. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si por Tukey a 5%.

DIAS	REGIÃO		
	CG	PC	CM
	-----n° de células-----		
0	1,40 cA	0,80 cA	2,00 bA
6	12,20 aA	12,00 aA	8,80 aB
13	5,00 bB	8,60 aA	8,20 aA
27	5,00 bA	4,60 bA	3,60 bA
34	2,80 bcA	4,00 bA	3,60 bA
55	2,80 bcA	2,40 bA	2,40 bA

DMS linha= 2,82; DMS coluna= 3,43

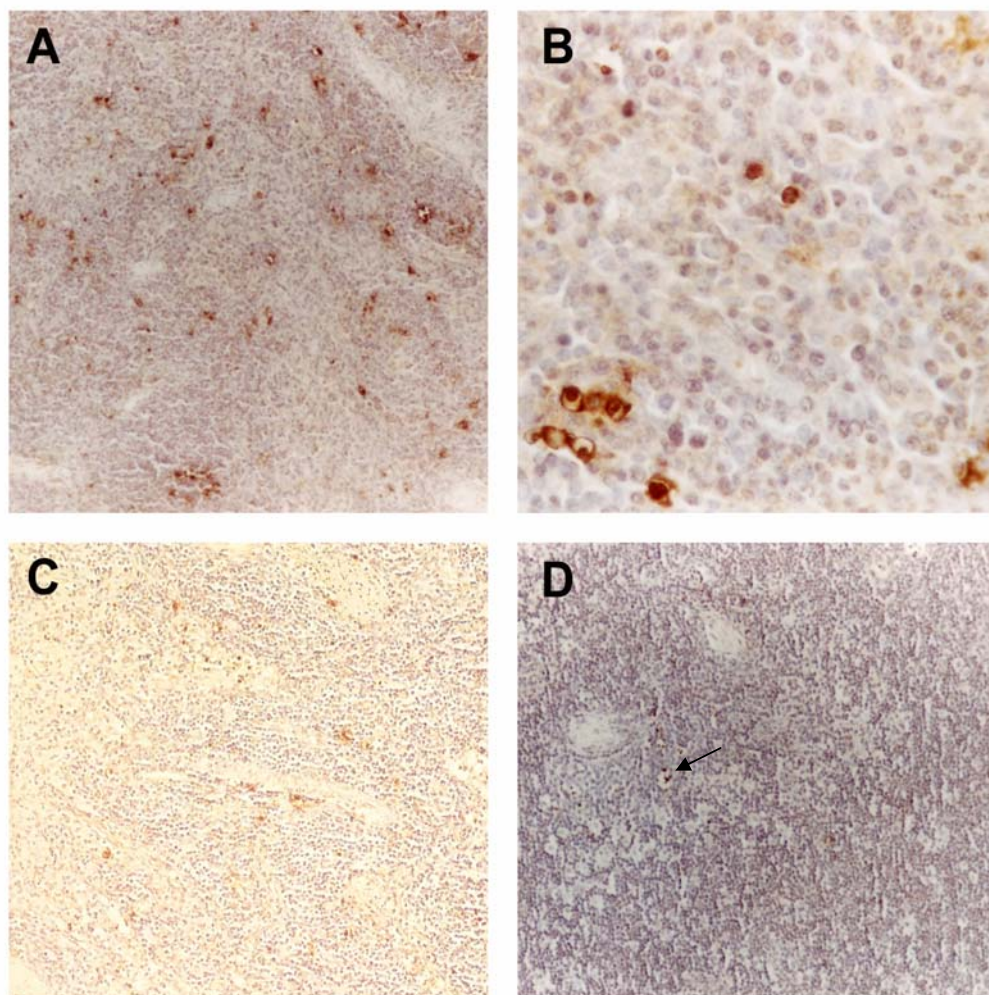


Figura 5 – Resultados do Teste de Hibridização *In Situ* pela técnica de TUNEL em linfonodos de bovinos para detecção de apoptose. **A.** Numerosas células TUNEL+ (setas) 13 dias após a inoculação da amostra de *Anaplasma marginale* AUFV1, TUNEL, 100X. **B.** Em aumento maior, reação positiva (seta) 13 dias pós-inoculação, TUNEL, 400X. **C.** Menor número de células TUNEL+ (setas) aos 55 dias pós-inoculação, porém ainda um número maior com relação ao animal negativo, TUNEL, 200X. **D.** Linfonodo do animal negativo, mostrando células TUNEL+ difusas, TUNEL, 100X.

Aos 20 (L3), 34 (L5) e 55 (L6) dias pós-inoculação, as células TUNEL+ se apresentam em menor quantidade quando comparadas aos dias anteriores, mas ainda se apresentam agrupadas (Figura 5C).

Ao contrário, no animal não inoculado (L7), as células TUNEL+ observadas são isoladas, localizadas difusamente no linfonodo (Figura 5D).

A apoptose observada nos dias 6 e 13 pós-inoculação, estatisticamente significativa com relação aos outros dias de coleta, demonstra a cinética da apoptose em respostas contra o *A. marginale*, que é semelhante à que ocorre com outros antígenos T-dependentes. Após a ativação e expansão clonal, células T e B entram em processo de morte celular programada, visando à manutenção da homeostasia. Esses resultados mostram, portanto, que houve reconhecimento do *A. marginale* pelas células do sistema imune, com geração de uma resposta imune típica, demonstrando claramente tratar-se de um antígeno T-dependente. O aparecimento de células apoptóticas nos tecidos linfóides secundários após imunização com antígenos T-dependentes já foi descrito por vários autores (Liu et al., 1989; Thorbecke et al., 1994; Kelsoe, 1995; Ahmed & Gray, 1996; Liu et al., 1996; Liu et al., 1997; Hollowood & Goodlad, 1998).

As células TUNEL+ observadas nos CGs são consequência da rápida proliferação de células B que ocorre durante a formação dessas estruturas, e de sua interação com as FDCs e com as células T auxiliares. Ao serem selecionadas negativamente, essas células sofreriam o processo de apoptose, eliminando clones auto-reativos e mutantes que foram incapazes de interagir satisfatoriamente com o antígeno que gerou a resposta. Essa afirmação é confirmada por Liu et al. (1997), que dizem que a hipermutação somática nos CGs é um perigo potencial, através da geração de mutantes auto-reativos, e que um mecanismo de seleção negativa é essencial nesse caso. Esse mecanismo seria mediado, segundo os autores, por sinalizações de células T e de FDCs. Da mesma forma, Thorbecke et al. (1994) afirmam que a alta taxa de apoptose observada em tecidos linfóides secundários é devida à alta taxa de proliferação das células B, e que essa apoptose ocorre em função do reconhecimento do antígeno apresentado pelas FDCs e do reconhecimento, pelas células T

auxiliares, do antígeno processado pelos linfócitos B. Os autores acrescentam que, à semelhança do que ocorre no timo e na medula óssea, haveria dois processos de seleção: a primeira seria a seleção negativa dos centroblastos na zona escura, na ausência de sinais de sobrevivência; e a segunda, a seleção positiva dos centrócitos na zona clara, quando a interação com as FDCs e os linfócitos T auxiliares protegeriam as células B da morte celular programada.

Liu et al. (1997) consideram que os mecanismos de seleção se iniciam antes mesmo que ocorra a mutação somática, o que levaria a três conseqüências funcionais, assegurando um processo eficiente de maturação de afinidade: primeiro, apenas as células B com alta afinidade pelo antígeno são selecionadas para sofrer a hipermutação somática; segundo, ao entrarem no CG, essas células devem aumentar sua afinidade pelo antígeno para sobreviver; finalmente, a mutação somática deve ser imediatamente seguida por seleção. Hollowood & Goodlad (1998) afirmam que a morte das células B não selecionadas anteriormente à mutação somática produz um aumento massivo de apoptose no sétimo dia da resposta imune primária, e que esse alto nível de apoptose é mantido por pelo menos mais uma semana, o que é confirmado por nosso estudo, já que as maiores taxas de apoptose encontradas foram aos 6 e treze dias após a inoculação.

Ahmed & Gray (1996) afirmam que a resposta de células T CD4+ e CD8+ após exposição a um antígeno estranho também possui três fases, a ativação e expansão, a morte e a geração de células de memória. Segundo os autores, a primeira fase, durante a qual se observa grande proliferação das células T, tem duração de uma semana. Essa fase é seguida pela morte por apoptose de cerca de 95% das células produzidas, entre sete e 30 dias após o contato com o antígeno, servindo como um mecanismo de regulação do número de células e para a manutenção da homeostase. Finalmente, a terceira fase é caracterizada pela geração de células de memória, que pode persistir por muitos anos. Essas afirmações são confirmadas pela grande quantidade de apoptose observada nas regiões paracorticais dos linfonodos, especialmente aos seis e 13 dias pós-

inoculação, mas que continuou ocorrendo, nos dias subseqüentes, em menor intensidade, reafirmando que o *A. marginale* é um antígeno T-dependente.

Kelsoe (1995) afirma que, aos dois dias após o primeiro contato com o antígeno, células B são ativadas em áreas extrafoliculares, podendo continuar nesse local ou migrar, para a formação dos CGs. As células que permanecem, segundo o autor, são responsáveis pela produção de anticorpos nos primeiros 12 dias da resposta. Nesse sentido, Smith et al. (1997) observaram que, durante a segunda semana da resposta imune, os focos extrafoliculares de produção de anticorpos involuem, com altas taxas de apoptose ocorrendo nessas áreas. Dessa forma, a grande quantidade de células TUNEL+ encontradas neste estudo nos cordões medulares dos linfonodos dos animais inoculados seriam conseqüência da involução dessas regiões. Porém, em nosso estudo, as células apoptóticas apareceram mais precocemente, aos seis dias pós-inoculação. Freitas (2001), após inoculação de bovinos com amostra atenuada de *Babesia bovis* e utilizando o mesmo *kit* de morte celular *in situ* utilizado neste trabalho, observou numerosas células TUNEL+ aos três e seis dias pós-inoculação nos cordões medulares dos linfonodos, embora essas células fossem mais numerosas a partir do nono dia pós-inoculação.

5.6 – Proliferação de PBMCs isoladas de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV-1 após estímulo com os peptídeos sintéticos 13590 e 13591

Os resultados da análise de variância para os testes proliferativos mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos e na interação Estímulo X Dias Pós-inoculação. Como não foi possível a aplicação de modelos de regressão, essa interação foi avaliada pelo teste Tukey a 5%, e os resultados encontram-se expostos no Quadro 2.

De acordo com esses resultados, a Concanavalina A mostrou-se, na diluição utilizada no presente trabalho, um bom controle positivo para proliferação celular. Entretanto, os corpúsculos iniciais de *A. marginale*

Quadro 2 – Médias do número de células em apoptose encontradas nos centros germinais (CG), região paracortical (PC) e cordões medulares (CM) dos linfonodos de bovinos inoculados com a amostra de *A. marginale* AUFV1. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si por Tukey a 5%.

DIAS	REGIÃO		
	CG	PC	CM
	-----n° de células-----		
0	1,40 cA	0,80 cA	2,00 bA
6	12,20 aA	12,00 aA	8,80 aB
13	5,00 bB	8,60 aA	8,20 aA
27	5,00 bA	4,60 bA	3,60 bA
34	2,80 bcA	4,00 bA	3,60 bA
55	2,80 bcA	2,40 bA	2,40 bA

DMS linha= 2,82; DMS coluna= 3,43

utilizados mostraram-se superiores ao controle negativo 20 dias pós-inoculação, sendo igual nos demais dias. Quanto ao desempenho dos peptídeos sintéticos testados, ambos se mostraram superiores ao controle negativo somente no sexto dia pós-inoculação, quando o peptídeo sintético 13590 apresentou melhor desempenho. Em ensaios proliferativos, após imunização de bovinos com a proteína de superfície MSP-1, Brown et al. (2001a) observaram forte resposta proliferativa de PBMCs, quando estimuladas com corpúsculos iniciais, já na primeira semana após a última imunização, permanecendo por um período de até seis meses após o estímulo. Esses achados estão parcialmente de acordo com os observados neste trabalho, em que foi observada uma resposta proliferativa nas três primeiras semanas pós-inoculação. Entretanto, se esses resultados forem comparados com o nível de proliferação nas áreas paracorticais e medulares dos linfonodos dos animais inoculados, percebe-se que, nos mesmos dias em que houve maior proliferação celular nos linfonodos, houve também maior proliferação *ex vivo*, indicando que houve reconhecimento dos peptídeos por células de memória.

6 – CONCLUSÕES

- A amostra de *A. marginale* AUFV1 foi capaz de elicitar uma resposta imune do tipo adaptativa, observando-se nos linfonodos dos animais inoculados proliferação celular, seguida de apoptose em grande número, necessária à manutenção da homeostase, eliminando clones auto-reativos e clones que não foram capazes de aumentar sua afinidade pelo antígeno.

- A amostra de *A. marginale* AUFV-1 é capaz de estimular o sistema imune de bovinos, através do reconhecimento por células do tipo Th, e gerar resposta imune, o que é evidenciado através da formação de CGs típicos e pelo aparecimento de antígenos de *A. marginale* em células dendríticas nos linfonodos dos bovinos inoculados.

- Com a confirmação de uma resposta imune dos tipos celular e humoral dirigida contra a amostra de *A. marginale* AUFV1, pode-se afirmar que os ciclos de ricketsemia observados durante a anaplasnose bovina ocorrem diante de uma resposta imunológica incapaz de eliminar o patógeno, provavelmente devido a variações antigênicas na proteína de superfície MSP-2.

- O desenvolvimento de ricketsemia persistente ocorre diante de uma resposta imune típica, atestada pela proliferação de células e formação de CGs nos linfonodos dos animais inoculados, além da proliferação de células T CD4+ e da

grande quantidade de apoptose detectada nesses linfonodos. Porém, essa resposta imune é incapaz de eliminar o patógeno, provavelmente devido a um mecanismo de escape imunológico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, R.; GRAY, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, v.272, p.54-59, 1996.

ALLRED, D.R.; McGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; LEIB, S.R.; HARKINS, T.M.; McELWAIN, T.F.; BARBET, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, n.8, p.3220-3224, 1990.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W.C.; McGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *mspla* of *Anaplasma marginale*. **Infect. Immun.**, v.67, n.7, p.3481-3487, 1999.

BARBET, A.F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.43-49, 1995.

BARBET, A.F.; LUNDGREN, A.; YI, J.; RURANGIRWA, F.R.; PALMER, G.H. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. **Infect. Immun.**, v.68, n.11, p.6133-6138, 2000.

BITTAR, J.F.F. **Vacinação experimental de bovinos com peptídeo sintético de RAP-1 de *Babesia bovis*: avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos com ênfase na imunidade celular e humoral**. Belo Horizonte: UFMG, 2002. 88p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F.; YI, J.; KOCAN, K.M.; SALIKI, J.T. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. **Vet. Parasitol.**, v.87, p.301-313,

2000.

BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; McGUIRE, T.C.; TUO, W; McELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infect. Immun.**, v.66, n.11, p.5406-5413, 1998a.

BROWN, W.C.; ZHU, D.; SHKAP, V.; McGUIRE, T.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; PALMER, G.H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. **Infect. Immun.**, v.66, n.11, p.5414-5422, 1998b.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A.; McGUIRE, T.C. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infect. Immun.**, v.69, n.11, p.6853-6862, 2001a.

BROWN, W.C.; McGUIRE, T.C.; ZHU, D.; LEWIN, H.A.; SOSNOW, J.; PALMER, G.H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **J. Immunol.**, v.166, p.1114-1124, 2001b.

CAMACHO, S.A.; KOSCO-VILBOIS, M.H.; BEREK, C. The dynamic structure of the germinal center. **Immunol. Today**, v. 19, n. 11, p. 511-514, 1998.

CHOU, P.Y.; FASMAN, G.D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 47, p. 45-148, 1978.

COLLINS, R.A.; HOWARD, C.J.; DUGGAN, S.E.; WERLING, D. Bovine interleukin-12 and modulation of IFN- γ production. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 68, p. 193-207, 1999.

COX, F.E.G. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, v.27, n.10, p.1147-1157, 1997.

de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.145-153, 2001a.

de la FUENTE, J.; BUSSCHE, R.A.V.D.; KOCAN, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, v.97, p.65-76, 2001b

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, n.6, p.2145-2165, 2001.

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

FRENCH, D.M.; McELWAIN, T.F.; McGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infect. Immun.**, v.66, n.3, p.1200-1207, 1998.

FU, Y-X; CHAPLIN, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 399-433, 1999.

FULLER, K.A.; KANAWA, O.; NAHM, M.H. T cells within germinal centers are specific for the immunizing antigen. **J. Immunol.**, v. 151, n.9 p. 4505-4512, 1993.

GALE, K.R.; GARTSIDE, M.G.; DIMMOCK, C.M.; ZAKRZEWSKI, H.; LEATCH, G. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. **Parasitol. Res.**, v.82, p.551-562, 1996.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.109-119, 1995.

GULBRANSON-JUDGE, A.; MacLENNAN, I.C.M. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1830-1837, 1996.

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

HAN, S.; ZHENG, B.; TAKAHASHI, Y.; KELSOE, G. Distinctive

characteristics of germinal center B cells. **Semin. Immunol.**, v.9, p.255-260, 1997.

HARDIE, D.L.; JOHNSON, G.D.; MacLENNAN, I.C.M. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments in germinal centers. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 997-1004, 1993.

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

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

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

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, 1999.

INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.9, p.3031-3039, 2001.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Moléstias causadas por micoplasmas, riquetsias e clamídias. In: _____. **Patologia veterinária**. São Paulo, Manole, 2000. p.381-422.

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

KESSLER, R. H. Patogenia, imunologia e controle de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* e seus vetores. Programa de Produção Animal. Embrapa, 1999.

KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infect. Immun.**, v.58, n.11, p.1117- 1119, 1990.

KOSCO-VILBOIS, M.H.; ZENTGRAF, H.; GERDES, J.; BONNEFOY, J-Y. To 'B' or not to 'B' a germinal center? **Immunol. Today**, v.18, n.5, p.225-229, 1997.

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

LEAL, M.; NODA, A.; REYNA-BELLO, A.; CASAS, B.; PRÉCIGOUT, E.; ASO, P.M.; GORENFLOT, A.; GONZATTI, M.I. Identification and characterization of corpuscular, soluble and secreted antigens of a Venezuelan isolate of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, v.94, p.1-15, 2000.

LINTON, P-J.; LAI, L.; LO, D.; THORBECKE, G.J.; KLINMAN, N.R. Among naive precursor cell subpopulations only progenitors of memory B cells originate germinal centers. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 1293-1297, 1992.

LIU, Y.J.; JOSHUA, D.E.; WILLIAMS, G.T.; SMITH, T.A.; GORDON, J.; MacLENNAN, I.C.M. Mechanisms of antigen-driven selection in germinal centers. **Nature**, v. 342, p. 929-931, 1989.

LIU, Y-J; ZHANG, J.; LANE, P.L.J.; CHAN, E. Y-T.; MacLENNAN, I.C.M. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p. 2951-2962, 1991.

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

LÖHR, C.V.; RURANGIRWA, F.R.; McELWAIN, T.F.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. **Infect. Immun.**, v.70, n.1, p.114-120, 2002.

MacLENNAN, I.C.M. Germinal centers. **Ann. Rev. Immunol.**, v.12, p.117-139, 1994.

MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149, 1963.

MOLLOY, J.B.; BOCK, R.E.; TEMPLETON, J.M.; BRUYERES, A.G.; BOWLES, P.M.; BLIGHT, G.W.; JORGENSEN, W.K. Identification of antigenic differences that discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma centrale* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.179-186, 2001.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JOHNSON, W.C.; GOFF, W.L. Development of conventional subunit vaccines for anaplasmosis and babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.255-266, 1995.

MORRISON, W.I.; LALOR, P.A.; CHRISTENSEN, A.K.; WEBSTER, P. Cellular constituents and structural organization of bovine thymus and lymph node. In: The ruminant immune system in health and disease (Morrison, W.I.), Cambridge University, 1986.

NOSSAL, G.J.V.; KARVELAS, M.; PULENDRAN, B. Soluble antigen profoundly

reduces memory B-cell number even when given after challenge immunization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n.7 p. 3088-3092, 1993.

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

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W.C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitol. Today**, v.15, n.7, p.281-286, 1999.

PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; RURANGIRWA, F.R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes Infect.**, v.2, p.167-176, 2000.

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; McELWAIN, T.F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.2, p.631-635, 2001.

PALMER, G.H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.85, n.1-2, p.1-8, 2002.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, J.L.; FARIA, J.E. *Anaplasma marginale*: ultraestrutura de uma amostra de origem brasileira. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.39, p.839-847, 1987.

PATARROYO, J.H.; HENCKEL, D.J.; PRATES, A.A.; MAFRA, C.L. Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. **Vet. Parasitol.**, v.52, p.129-137, 1994.

PENNINGER, J.M.; KROEMER, G. Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. **Adv. Immunol.**, v.68, p.51-144, 1998.

REARDON, M.J.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Pathol.**, v.18, p.48-61, 1981.

RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F.; GUIMARÃES, A.M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.70, p.271-277, 1997.

RUIZ, P.M.G.; PASSOS, L.M.F.; MARTINS, M.S.; PATARROYO, J.H.; RIBEIRO, M.F.B. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. **Vet. Parasitol.**, v.107, p.169-177, 2002.

RURANGIRWA, F.R.; STILLER, D.; FRENCH, D.M.; PALMER, G.H. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbiol.**, v.96, p.3171-3176, 1999.

RURANGIRWA, F.R.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Strain diversity in major surface protein 2 expression during tick transmission of *Anaplasma marginale*. **Infect. Immun.**, v.68, n.5, p.3023-3027, 2000.

SEARCY, G.P. Sistema hemopoético. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed., Porto Alegre, Artmed, 1995. p.305-352.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K.A.; BROWN, W.C., PALMER, G.H. Expression of major surface protein 2 variants with conserve T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. **Inf. Immun.**, v.70, n.2, p.642-648, 2002.

SMITH, K.G.C.; LIGHT, A.; NOSSAL, G.J.V.; TARLINTON, D.M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, v. 16, n. 11, p. 2996-3006, 1997.

SOUZA, J.C.P. **Prevenção e estabilidade enzoótica da tristeza parasitária bovina em duas mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica, Instituto de Biologia da UFRRJ, 2000. 134p. Dissertação (Pós-Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária).

SPRENT, J.; TOUGH, D.F. Lymphocyte life-span and memory. **Science**, v.265, p.1395-1400, 1994.

TARLINTON, D. Germinal centers: form and function. **Curr. Opinion Immunol.**, v.10, p.245-251, 1998.

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

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology**. 2.ed. Londres: Saunders WBCo, 2000. 482p.

TSIAGBE, V.K.; LINTON, P-J.; THORBECKE, G.J. The path of memory B cell development. **Immunol. Rev.**, v. 126, p. 113-141, 1992.

TUO, W.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D.; BROWN, W.C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Infect. Immun.**, v.68, n.1, p.270-280, 2000.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.19-41, 1995.

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.

VELLA, A.T.; MITCHELL, T.; GROTH, B.; LINSLEY, P.S.; GREEN, J.M.; THOMPSON, C.B.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P. CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival *in vivo*. **J. Immunol.**, v.158, p.4714-4720, 1997.

VISESHAKUL, N.; KAMPER, S.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. **Gene**, v.253, p.45-53, 2000.

WAGHELA, S.D.; MELENDY, D.; CRUZ, D.; WAGNER, G.G. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultured with bovine endothelial cells. **Vet. Parasit.**, v.94, p.133-139, 2000.

WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. (eds). **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993. p.65-88.

WYATT, C.R.; DAVIS, W.C.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L.; PALMER, G.H.; McGUIRE, T.C. Effect on intraerythrocytic *Anaplasma marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. **Inf. Immun.**, v.64, n.11, p.4846-4849, 1996.

ZHENG, B.; HAN, S.; ZHU, Q.; GOLDSBY, R.; KELSOE, G. Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. **Nature**, v. 384, p. 263-266, 1996.