

**ANNA PAULA BAPTISTA RIBEIRO FERREIRA**

**BOVINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE VACINAL COM IMUNÓGENOS  
SINTÉTICOS E DESAFIADOS COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E  
*Babesia bovis*: EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE  
CHOQUE TÉRMICO (HSP70 E HSP90) E BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

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

T

F383b  
2007

Ferreira, Anna Paula Baptista Ribeiro, 1967-  
Bovinos submetidos a estresse vacinal com imunógenos  
sintéticos e desafiados com *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* e *Babesia bovis* : expressão imunoistoquímica  
de proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90) e  
bioquímica sanguínea / Anna Paula Baptista Ribeiro  
Ferreira. – Viçosa, MG , 2007.  
xii, 82f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-76.

1. Bovino - Efeito do stress. 2. Proteínas de choque  
térmico. 3. Imunoistoquímica. 4. Vacinação de animais.  
5. Bioquímica clínica. 6. Imunidade natural - Efeito do  
stress. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0892447

ANNA PAULA BAPTISTA RIBEIRO FERREIRA

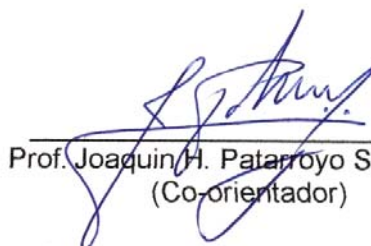
**BOVINOS SUBMETIDOS A ESTRESSE VACINAL COM IMUNÓGENOS  
SINTÉTICOS E DESAFIADOS COM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
E *Babesia bovis*: EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE  
CHOQUE TÉRMICO (HSP70 E HSP90) E BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA**

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

APROVADA: 20 de março de 2007.



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin  
(Co-orientador)



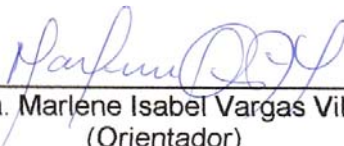
Prof. Joaquín H. Patarroyo Salcedo  
(Co-orientador)



Profa. Rogéria Serakides



Prof. José Dantas Ribeiro Filho



Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(Orientador)

*Aos meus pais Vera e Roberto pelo abnegado e incondicional amor.  
Aos meus amados filhos Tiago, Tomaz e Lucas. Vocês são a razão da minha vida.  
Ao meu marido-amigo Adilson, pela sua imensa coragem e confiança.  
Você me faz acreditar que tudo é possível.  
À madrinha Maria Helena, Voinha querida, mãe de todos nós.  
Exemplo de força e fé que continua iluminando nossos caminhos, sempre...*

***Dedico mais esta etapa vivida...***

## AGRADECIMENTOS

**Maria!**

Agradeço a Deus –Pai Nosso – por conceder-me nesta vida a graça de ter tão pouco a pedir e tanto a agradecer...

Agradeço a fé que guia meu caminho: São Francisco de Assis, protetor dos animais, Santa Rita de Cássia, das causas impossíveis.

Meus pais, fonte de toda a minha vida. Vocês são o meu exemplo de renúncia, carinho, amor. Vocês são a prova de que viver vale a pena.

Meus filhos. Por entenderem meus momentos de ausência, as privações, as impaciências, retribuídas sempre com incentivo. Quantas vezes os papéis se inverteram e vocês é que me carregaram no colo.

Adilson. Sua firmeza se mistura com amor. Você me completa.

Madrinha. Por tudo que vivemos, somos cúmplices nesta vitória...

Toda a minha família, Tia Nize, Tia Lea, Tio Gustavo, Juliana, Gabriel, que acreditaram em mim.

Professora Marlene, grande pesquisadora, mas acima de tudo pela capacidade de acolher-nos, como grande mãe que é. Nesses anos de convivência, não tive somente uma orientadora - ganhei uma amiga.

Professor Patarroyo, pelos ensinamentos de pesquisa e de vida.

À linda família dos professores Marlene e Patarroyo, que acolheu tão carinhosamente a minha família.

Universidade Federal de Viçosa, casa que aprendi a respeitar e hoje me encho de orgulho por fazer parte. Professores Laércio dos Anjos Benjamin, conselheiro, amigo de todas as horas; José Antônio Viana, pela ponderação e gentileza ímpares; José Dantas, pelas conversas firmes e objetivas. Também aos professores Luiz Gonzaga Pompermayer, Sérgio da Mata, Maria Aparecida e todos aqueles com quem tive a oportunidade de aprender.

Universidade Federal de Minas Gerais, da qual sou “filha orgulhosa”, nas figuras dos professores José Monteiro Filho, Maristela Palhares, Lúcio Carlos Gonçalves, Antônio Último de Carvalho e tantos outros que me formaram médica veterinária.

Ao professor Anilton Vasconcelos, do Laboratório de Apoptose (ICB – UFMG), pela atenção, disponibilidade e palavras de incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária: José Carlos –Cauzinho - alegre companhia, Rose, um anjo da guarda, Cláudio, Adão, Marcio Mendes, Lucinda e todos que, com um sorriso sincero, faziam o meu bom dia melhor.

Meus amigos-irmãos Javier, Gabriel, Paulo Ricardo, Ana Paula. Quantas alegrias, angústias, vitórias dividimos durante este tempo!

Muito especialmente ao Fabrício, meu mais novo “velho amigo”, com quem reaprendi o valor de uma amizade. Vou levar você sempre comigo!

Aos colegas Carlos, Diogo, Juliana, Marília, Vinícius, Hugo e todos que carinhosamente me acolheram.

Ao Carlos Cardoso, pelo inegável apoio na realização das análises bioquímicas.

Minha Clínica Veterinária Companhia dos Bichos que possibilitou este desafio.

Aos animais do experimento, que retribuíram o nosso respeito.

Minha fiel companheira Frederica... ainda sinto a sua presença!

Enfim, a todos que direta ou indiretamente cruzaram minha jornada. Mesmo aqueles que duvidaram de mim, pois me impulsionaram a superar limites.

Eu sigo com “a mente aberta, a espinha ereta e o coração tranquilo...”

Deus lhes pague!

## **BIOGRAFIA**

ANNA PAULA BAPTISTA RIBEIRO FERREIRA, filha de Roberto Joaquim Ribeiro e Vera Lúcia Baptista Ribeiro, nascida em 11 de setembro de 1967, na cidade de Timóteo, Minas Gerais, Brasil.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, em fevereiro de 1986, concluindo a graduação em abril de 1992.

Atuou no mercado de trabalho como médica veterinária autônoma, na área de assistência técnica a haras e fazendas criadoras.

Ingressou no serviço público em setembro de 1994, quando assumiu o serviço de Vigilância Sanitária do município de Timóteo, Minas Gerais, onde trabalhou por 10 anos. Durante o período envolvida no serviço público, coordenou a Vigilância em Saúde entre 1997 e 2001.

Formou-se especialista em Saúde Pública pela Universidade de Ribeirão Preto em 1998.

Em 1999 constituiu a Clínica Veterinária Companhia dos Bichos, microempresa prestadora de serviços em clínica e cirurgia até 2005.

Em 2006, assumiu a cadeira de Clínica Médica de Grandes Animais na Faculdade de Estudos Superiores - FEAD, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, em 2005, tendo defendido sua dissertação em março de 2007.

## SUMÁRIO

|                                          |             |
|------------------------------------------|-------------|
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES            | <i>viii</i> |
| LISTA DE FIGURAS                         | <i>ix</i>   |
| LISTA DE QUADROS                         | <i>x</i>    |
| RESUMO                                   | <i>xi</i>   |
| ABSTRACT                                 | <i>xii</i>  |
| <br>                                     |             |
| 1 - Introdução Geral                     | 1           |
| 2 – Objetivos                            | 4           |
| 2.1 – Objetivo geral                     | 4           |
| 2.2 – Objetivos específicos              | 4           |
| 3 – Revisão de Literatura                | 5           |
| 3.2 - Estresse e inflamação              | 5           |
| 3.2 - Proteínas de choque térmico (HSPs) | 11          |
| 3.3 – Peptídeos sintéticos               | 20          |
| 3.3.1 - Peptídeo SBbo23290               | 20          |
| 3.3.2 - Peptídeo SBm 7462                | 21          |
| 3.4 – Linfonodos                         | 21          |
| 3.5 – Variáveis bioquímicas              | 22          |
| 3.5.1 – Glicose                          | 23          |
| 3.5.2 – Lactato                          | 24          |
| 3.5.3 - Proteínas de fase aguda (APPs)   | 24          |
| 3.5.3.1 – Haptoglobina                   | 26          |
| 3.5.3.2 - Proteína C-reativa             | 26          |
| 3.6 – Babesiose bovina                   | 27          |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4 – MATERIAL E MÉTODOS                                              | 29 |
| 4.1 – Animais                                                       | 29 |
| 4.2 - Esquema de inoculação dos peptídeos sintéticos e desafio      | 30 |
| 4.3 - Acompanhamento clínico dos animais                            | 33 |
| 4.4 - Coleta de material                                            | 33 |
| 4.4.1 - Coleta de linfonodos                                        | 33 |
| 4.4.2 - Coleta de sangue                                            | 34 |
| 4.5 - Histopatologia dos linfonodos bovinos                         | 34 |
| 4.6 - Imunohistoquímica para pesquisa da expressão de HSP70 e HSP90 | 35 |
| 4.7 - Pesquisa da expressão dos peptídeos SBm7462 e SBbo23290       | 36 |
| 4.8 - Análises bioquímicas do soro                                  | 37 |
| 4.9 - Modelo analítico das variáveis bioquímicas                    | 37 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO                                           | 39 |
| 5.1 - Avaliação dos parâmetros clínicos dos animais                 | 39 |
| 5.2 - Avaliações macroscópica e histopatológica dos linfonodos      | 41 |
| 5.3 - Expressão de proteínas do choque térmico                      | 47 |
| 5.4 - Imunohistoquímica dos peptídeos sintéticos                    | 50 |
| 5.5 - Parâmetros bioquímicos                                        | 53 |
| 5.5.1 – Glicose                                                     | 53 |
| 5.5.2 – Lactato                                                     | 55 |
| 5.5.3 - Proteínas de fase aguda (APPs)                              | 58 |
| 5.5.3.1- Haptoglobina (Hp)                                          | 59 |
| 5.5.3.2 - Proteína C reativa (PCR)                                  | 60 |
| 6. CONCLUSÕES                                                       | 62 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS                                             | 63 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                       | 64 |
| 9. ANEXOS                                                           | 77 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|               |                                                |
|---------------|------------------------------------------------|
| APC           | Célula apresentadora de antígeno               |
| APP           | Proteína de fase aguda                         |
| APR           | Resposta de fase aguda                         |
| CG            | Centro germinativo                             |
| DC            | Célula dendrítica                              |
| FDC           | Células dendríticas foliculares                |
| Hp            | Haptoglobina                                   |
| HPA           | Hipotálamo-pituitária-adrenal                  |
| HSBP1         | Fator de ligação da proteína de choque térmico |
| HSF           | Fator de choque térmico                        |
| HSP           | Proteína de choque térmico                     |
| HSR           | Resposta ao choque térmico                     |
| IL-1, 6, 12   | Interleucina-1, 6, 12                          |
| INF- $\gamma$ | Interferon- $\gamma$                           |
| LBP           | Proteína ligada a lipopolissacáride            |
| LPS           | Lipopolissacáride                              |
| MHC           | Complexo de histocompatibilidade principal     |
| PAP           | Peroxidase anti-peroxidase                     |
| PCR           | Proteína C-reativa                             |
| PMN           | Polimorfonucleares                             |
| SI            | Sistema imunológico                            |
| SNC           | Sistema nervoso central                        |
| SNS           | Sistema nervoso simpático                      |
| Th1           | Resposta imune de células auxiliares do tipo 1 |
| Th2           | Resposta imune de células auxiliares do tipo 2 |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral- $\alpha$             |

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Delineamento experimental                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 31 |
| Figura 2  | Médias de temperatura retal após primeira inoculação.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 40 |
| Figura 3  | Médias de temperatura retal após segunda inoculação.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 41 |
| Figura 4  | Médias de temperatura retal após terceira inoculação.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 41 |
| Figura 5  | Linfonodos bovinos do grupo Controle inoculados com água. A: Aos sete dias após a primeira inoculação. B: Aos sete dias após desafio com <i>B.bovis</i> . Coloração H&E, 100X.....                                                                                                                                                                  | 44 |
| Figura 6  | Linfonodos bovinos imunizados com peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462. A: Grupo Duas Vacinas, aos 7 dias após primeira imunização. B: Grupo Polivalente, aos 15 dias após segunda imunização. C: Grupo Polivalente, aos 12 dias após terceira imunização. Coloração H&E, 100X.....                                                             | 46 |
| Figura 7  | Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica imunoperoxidase para expressão de HSP70 e HSP90. A: HSP70 em animal do grupo Polivalente, 7 dias após primeira imunização com peptídeos sintéticos. B: HSP90 no mesmo animal. C: HSP70 em animal do grupo Polivalente 7 dias após segunda imunização. D: HSP90 no mesmo animal. 100X..... | 48 |
| Figura 8  | Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica imunoperoxidase para expressão de HSP70 e HSP90. A: HSP90 apresentando imunomarcagem na região medular. B: HSP70 com imunomarcagem na paracortical. 100X.....                                                                                                                             | 49 |
| Figura 9  | Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica 7 dias após a primeira imunização. A: Expressão de HSP90 na região medular. B: Expressão de SBBo 23290. C: Expressão de SBm762. 400X.....                                                                                                                                                 | 51 |
| Figura 10 | Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica 15 dias após a segunda imunização. A: Expressão de HSP90 na região medular. B: Expressão de SBBo 23290. C: Expressão de SBm762. 100X.....                                                                                                                                                 | 52 |
| Figura 11 | Dosagens de parâmetros bioquímicos médios nos grupos avaliados, no tempo.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 57 |
| Figura 12 | Porcentagem (%) de redução do VG após desafio. A seta indica o desafio com <i>Babesia bovis</i> .....                                                                                                                                                                                                                                               | 59 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|          |                                                                                                                    |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 | Divisão dos grupos de animais .....                                                                                | 30 |
| Quadro 2 | Grupos de animais e imunógenos utilizados no experimento.....                                                      | 32 |
| Quadro 3 | Macroscopia dos linfonodos dos grupos Controle, Adjuvante,<br>Duas Vacinas e Polivalente, ao longo do período..... | 43 |
| Tabela 1 | Análise de variância dos parâmetros bioquímicos dos bezerros.                                                      | 54 |
| Tabela 2 | Análise dos parâmetros bioquímicos entre os grupos, pelo teste<br>comparativo de Tukey.....                        | 54 |
| Tabela 3 | Análises dos parâmetros bioquímicos ao longo do tempo, pelo<br>teste comparativo de Scott Knott.....               | 56 |

## RESUMO

FERREIRA, Anna Paula Baptista Ribeiro M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Bovinos submetidos a estresse vacinal com imunógenos sintéticos e desafiados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Babesia bovis*: expressão imunoistoquímica de proteínas do choque térmico (HSP70 e HSP90) e bioquímica sangüínea.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-orientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Laércio dos Anjos Benjamin.

A expressão de HSP70 e HSP90 foi avaliada por meio de estudos imunoistoquímicos, em bovinos inoculados com peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462, aplicados simultaneamente, em associação ou em apresentação individual. Os animais receberam 3 aplicações em intervalos de 30 dias entre si e posteriormente desafiados com cepa de *Babesia bovis* (UFV1- 9ª passagem). Os estudos histopatológicos mostraram reatividade do órgão linfóide sete dias após a primeira imunização, com centros germinativos aumentados. Após a segunda imunização, ficou evidente a hiperplasia da região paracortical e medular, com subsequente diminuição da reatividade dos centros germinativos após este período, sugerindo formação de uma resposta de memória aos imunógenos. As proteínas de choque térmico apresentaram expressão basal. A HSP70 expressou, preferencialmente, na região paracortical, enquanto que a HSP90 mostrou imunomarcacão mais visível nas regiões paracortical e medular. Estudos imunoistoquímicos mostraram uma coincidência na expressão de HSP90 com os peptídeos SBbo23290 e SBm7462, quando se consideraram os mesmos períodos de imunização, sugerindo a formação de um complexo HSP-peptídeo. Os níveis de glicose, lactato, haptoglobina e proteína C-reativa mantiveram-se dentro dos valores considerados fisiológicos para a espécie bovina. A imunomarcacão celular basal de HSP70 e HSP90, bem como a manutenção dos níveis normais das variáveis bioquímicas durante todo o período do experimento, sugerem que o estresse provocado pelos peptídeos sintéticos foi insuficiente para causar dano ao organismo. Em contrapartida, a manutenção do estado de saúde dos animais influenciou a resposta imunológica, e os níveis basais das proteínas de choque térmico podem ter sido suficientes para promover citoproteção após o desafio.

## ABSTRACT

FERREIRA, Anna Paula Baptista Ribeiro M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007. **Cattle submitted with vaccine stress with synthetic immunogenis challenged with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Babesia bovis*: immunoistochemistry expression of heat shock proteins and blood biochemical.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisers: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo and Laércio dos Anjos Benjamim.

The expression of HSP70 and HSP90 was evaluated through immunoistochemistry studies in bovine inoculated with synthetic peptides SBbo23290 and SBm7462 applied simultaneously, in association or in individual presentation. The animals received three applications with 30 days of interval among them and after challenged with the *Babesia bovis* strain UFV1 - 9<sup>th</sup> passage. The histopathological studies showed reactivity of the lymphoid organ seven days after the first immunization with germinative centers increased. After the second immunization, it was evident the hyperplasia of the paracortical and medular areas, with subsequent decrease of the reactivity of the germinative centers after this period, suggesting formation of a memory response to the immunogens. The heat shock proteins presented basal expression. HSP70 expressed preferentially in the paracortical area, while HSP90 showed more visible immunomarker in the paracortical and medular areas. Immunoistochemical studies showed a coincidence in the expression of HSP90 and of the peptides SBbo23290 and SBm7462, when were considered the same periods of immunization, suggesting the formation of a complex HSP-peptide. The glucose, lactate, haptoglobin and C-reactive protein levels stayed inside of the values considered physiologic for the bovine species. The basal cellular immunoreaction of HSP70 and HSP90, as well as the maintenance of the normal levels of the biochemical parameters during the whole period of the experiment, suggest that the stress provoked by the synthetic peptides was insufficient to cause damage to the organism. In other hand, the maintainance of the health condition of the animals influenced the immunological response, and the basal levels of the heat shock proteins might have been enough to promote cytoprotection after the challenge.

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

O estresse, atualmente, tem sido definido como um estado de ameaça à homeostase provocado por um agente estressante fisiológico, psicológico ou ambiental. Compreendê-lo foi, durante muitos anos, uma atitude abstrata. Considerado como uma manifestação de caráter emocional, sem parâmetros fisiopatológicos concretos, manteve-se na “periferia” da ciência. Hoje, já se compreende a sua importância, principalmente como fator desencadeador de diversas patologias, provocando alterações no equilíbrio ambiental dos organismos vivos.

Conhecido desde a Antigüidade, mas só recentemente associado aos animais, o estresse vem sendo estudado com maior afinco na tentativa de obtenção de respostas para uma série de alterações fisiológicas e ou psicofisiológicas, que evoluem para variadas patologias.

Segundo Black (2002), estímulos estressantes atuam sobre o sistema nervoso central (SNC), ativando o eixo hipotálamo-pituitária-hipófise (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS), resultando em alterações fisiológicas ou adaptação do organismo. Fatores como *status* nutricional e condições ambientais interferem na resposta ao estresse, afetando o sistema imunológico (SI) e aumentando a susceptibilidade a processos patológicos.

O comportamento de um animal é determinado por particularidades do seu organismo e está intimamente relacionado aos sistemas nervoso central, periférico, aparelho locomotor e digestivo. O bovino tem a particularidade de ser um animal social, vivendo em rebanhos, sendo, na maioria das vezes, pacífico. Em condições naturais, passa de quatro a cinco períodos do dia, o equivalente entre quatro a nove horas de ingestão alimentar, sendo o restante utilizado para descanso e ruminação (KOLB *et al.*, 1987).

O equilíbrio orgânico é quebrado toda vez que ocorrem alterações no ambiente e no organismo do animal, levando a um desequilíbrio da homeostase, ou seja, da capacidade adaptativa a alterações. É prática rotineira, em bovinos, o reagrupamento social entre animais, objetivando formar lotes com o mesmo peso,

estado fisiológico e idade, para vacinações, vermifugações ou outro parâmetro de manejo qualquer. Isto faz com que ocorram brigas para restabelecimento de hierarquia social. Este tipo de manejo leva à ativação do eixo HPA e liberação de altos níveis de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), adrenalina, noradrenalina e cortisol (RUIS *et al.*, 2001).

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo e é, atualmente, o maior exportador de carne e sétimo maior produtor de leite (MAPA, 2005). A babesiose bovina é endêmica e responsável por significativos prejuízos econômicos nos rebanhos (MONTENEGRO-JAMES, 1992; COOKE *et al.*, 2005). Tem sido incessante a busca pelo controle desta doença que reduz a produção do rebanho e causa desequilíbrios de ordem ambiental, pelo uso indevido de inseticidas químicos na tentativa de combater o carrapato vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Estudos em busca de vacinas eficazes contra estes parasitas têm sido almejados e, atualmente, têm sido direcionados para os peptídeos sintéticos, como o SBm 7462 e SBbo 23290, desenvolvidos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e na Fundação Instituto de Imunologia de Colômbia (FIDIC) (PATARROYO *et al.*, 1999).

Animais submetidos ao estresse do manejo vacinal podem apresentar uma resposta imunologicamente contraprodutiva (GRUYS *et al.*, 2005a). Células estressadas, podem alterar a apresentação de peptídeos aos efetores imunes pelas MHC classe I. Ao mesmo tempo, células estressadas também liberam proteínas do choque térmico (HSP) (HICKMAN-MILLER & HILDEBRAND, 2004).

Segundo Meyer & Silva (1999), células expostas ao estresse não mortal desencadeiam uma resposta ao mesmo, denominada resposta ao choque térmico (HSR), com subsequente síntese de HSP. O sistema imune dos mamíferos usa essas proteínas do estresse como sinal de perigo. As células que sintetizaram as HSPs ficam protegidas contra novas exposições estressantes, refletindo em menores lesões no organismo como um todo ou em parte dele.

Diversos estudos comprovam a existência de alterações nos sistemas neuroendócrino e imune, provocadas por agressões físicas, químicas ou parasitárias, com liberação de substâncias endógenas que contribuem para a manutenção do equilíbrio ou que desestabilizam a homeostase corporal (WESBTER *et al.*, 2002).

Dentre estas substâncias, as HSPs, ou “proteínas do estresse”, têm sido largamente estudadas em função de sua liberação durante situações patológicas, podendo agir como marcadores de um estado de doença e sendo utilizadas como fator diagnóstico, prognóstico e terapêutico (POCKLEY, 2003).

Neste sentido, cresce a importância de se conhecer e, principalmente, modular os fatores relacionados à resposta ao estresse, prevenindo danos celulares e teciduais e modulando a resposta imune, de forma a prever e evitar injúrias, visando o bem-estar animal.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

Verificar a expressão das HSP70 e HSP90 nos linfonodos dos bovinos (*Bos taurus*) vacinados com imunógenos sintéticos SBm7462 e SBbo23290 e com um imunógeno polivalente (SBm7462 + SBbo23290), e submetidos a estresse por *Babesia bovis* e carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, bem como comparar com o perfil bioquímico dos mesmos.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a dinâmica das alterações histopatológicas nos linfonodos periféricos dos animais submetidos ao estresse por imunização e subsequente desafio com carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e inoculação de cepa patogênica de *Babesia bovis*;
- Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 nos linfonodos dos animais em diferentes fases de estresse;
- Verificar a expressão dos imunógenos sintéticos SBm7462 e SBbo23290 separadamente e em associação, nos linfonodos pré-escapulares dos animais;
- Acompanhar e comparar o perfil bioquímico dos animais, com relação aos níveis séricos de glicose, lactato, haptoglobina e proteína C-reativa, com a expressão de HSP70 e HSP90.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

Um estímulo estressante resulta em uma resposta ao estresse e todo mecanismo que a envolve inicia-se como uma resposta imunológica inespecífica, de forma a promover a defesa do organismo. Esta resposta inata evolui para um processo inflamatório, desencadeando a liberação de substâncias sinalizadoras tais como citocinas, hormônios, inclusive alterações bioquímicas, prontas para manter a homeostase do organismo. Previamente a todos estes fenômenos, o estímulo externo levará à expressão de proteínas primitivas, visando minimizar o dano provocado pelo desequilíbrio no ambiente interno. As proteínas do choque térmico ou “proteínas do estresse”, assim como as demais substâncias, são essenciais para a compreensão do mecanismo do estresse.

#### 3.1 - Estresse e inflamação

O estresse tem sido definido como um estado de ameaça à homeostase provocado por um estressante fisiológico, psicológico ou ambiental. Pode ser também definido como um estímulo, tanto interno quanto externo, que ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS), resultando em uma mudança fisiológica ou em adaptação do organismo, decorrente de uma ameaça (BLACK, 2002; WEBSTER *et al.*, 2002).

Segundo Selye (1937), citado por Santos (2005), classicamente o mecanismo do estresse é dividido em três etapas denominadas reação de alarme, fase de resistência e fase de esgotamento que correspondem ao mecanismo adaptativo do organismo, visando a manutenção da vida diante das constantes transformações.

Na reação de alarme existem ainda as fases de choque e contra-choque. Na primeira há o desencadeamento provocado pelo agente estressante, ativando o eixo HPA, com subsequente participação do sistema nervoso autônomo (SANTOS, 2005).

Na segunda etapa, ou fase de resistência, a adrenal tem uma atuação predominante com máxima liberação de glicocorticóides e catecolaminas, que atuam

ativando a glicogenólise no líquido extracelular e a glicogênese e gliconeogênese no fígado, inibindo a insulina e estimulando o glucagon. Isto permite um maior aporte de glicose para todo o organismo, principalmente para as células cerebrais e musculares. Os glicocorticóides atuam também controlando as catecolaminas, que necessitam de glicose para sua síntese (SANTOS, 2005).

Caso o agente estressante permaneça, o organismo passa para a fase de esgotamento. Nesta última fase os mecanismos adaptativos começam a falhar e inicia-se um déficit energético, pois as reservas corporais estão esgotadas. As modificações biológicas que ocorrem nesta fase são semelhantes às da primeira fase, mas neste caso, o organismo não tem capacidade de prover substratos energéticos para o corpo (SANTOS, 2005).

O equilíbrio orgânico é quebrado toda vez que ocorrem alterações no ambiente e no organismo do animal, levando a um desequilíbrio da homeostase, ou seja, da capacidade adaptativa sobre estas alterações. Esta “quebra” da homeostase é o que se pode considerar como metabolismo do estresse. Então, o estresse pode ser explicado como uma resposta fisiológica do organismo, buscando fornecer subsídios ao corpo para responder e ou adaptar-se às alterações provocadas pelo desequilíbrio da homeostasia (HEMSWORTH *et al.*, 1995; RUIS *et al.*, 2001).

Marsland *et al.* (2002), observaram que nem todos os indivíduos estressados respondem de maneira similar ao desenvolvimento de doenças. Algumas variáveis devem ser consideradas, principalmente aquelas relacionadas ao comportamento ou vulnerabilidade biológica. Logo, o estresse psicológico pode afetar a função imune e aumentar a susceptibilidade a processos patológicos. Por outro lado, Van Reenen *et al.* (2005), afirmam que indivíduos apresentam diferenças qualitativas em suas respostas a um desafio como inibição, medo, fuga ou comportamento de ataque.

Fatores como *status* nutricional, condições ambientais e idade podem interferir na resposta ao estresse. Black (2002) relaciona a idade a uma diminuição da capacidade de adaptação ao estresse, uma vez que repetidos episódios de estresse levam a repetidas secreções de corticosteróides que resultam em dano no hipocampo.

Masek *et al.* (2003) associam a idade com a perda de inervação simpática nos órgãos linfóides e alterações no sistema endócrino, refletindo em mudanças funcionais e morfológicas no sistema nervoso central, entre estas uma diminuição da

resposta imune celular com aumento da incidência de tumores malignos. Animais submetidos ao estresse psicossocial, sob a forma de separação maternal ou privação social logo após o nascimento, demonstram alterações profundas e irreversíveis de caráter neuroendócrino, comportamental e na capacidade de adaptação (KANITZ *et al.*, 2004).

Os sistemas imune e nervoso interagem bidirecionalmente, isto é, o sistema nervoso central (SNC), por meio de neuropeptídeos, neurohormônios e neurotransmissores, interagem com o sistema imune e, em um mecanismo de “feed back”, com o cérebro que induz mudanças tanto comportamentais quanto imunológicas (BLACK, 2002). Recentes técnicas descritas por MASEK *et al.* (2003), demonstram terminações de fibras nervosas periféricas dentro de órgãos linfóides e sua distribuição em compartimentos celulares específicos, particularmente em zonas de células T e macrófagos, comprovando ser esta uma base anatômica para a interação entre ambos os sistemas. O eixo HPA está sujeito a ser programado de acordo com eventos ocorridos no início da vida, logo alterações no ambiente pós-natal podem modificar a reatividade imune de um indivíduo em função de conexões cérebro-endócrino-imune afetadas (KANITZ *et al.*, 2004).

Segundo Fleshner *et al.* (2004), em resposta a uma situação estressante, principalmente o medo de um predador, muitas substâncias são liberadas e elevados níveis de hormônios relacionados ao estresse são secretados. Estes níveis elevados de hormônios promovem a supressão da memória e plasticidade sináptica no hipocampo, demonstrando, mais uma vez, esta interação neuroendócrina mediada pelo estresse.

Variáveis bioquímicas e fisiológicas são freqüentemente usadas como indicadores de estresse, incluindo taxa cardíaca, pressão sangüínea, concentrações plasmáticas e sangüíneas de catecolaminas, cortisol, lactato, glicose e ácidos graxos livres (SEPPONEN & PÖSÖ, 2005).

Existem evidências de que o estresse sozinho pode causar uma resposta inflamatória e que episódios repetidos ou crônicos de estresse podem evoluir para uma doença inflamatória. As mudanças hormonais características do estresse podem induzir um processo inflamatório e o estímulo inflamatório também pode ativar o

eixo HPA, ou seja, a resposta ao estresse está intimamente ligada à resposta inflamatória e também é originada da mesma (BLACK, 2002).

No entanto, o controle da resposta inflamatória é essencial para o sistema imune estabelecer um balanço entre a destruição do organismo patológico e a manutenção da integridade do tecido hospedeiro (DEVRIES *et al.*, 1999).

Os principais hormônios do estresse induzem uma resposta inflamatória de fase aguda (APR), similar àquelas elucidadas quando o organismo reage à invasão de microorganismos, trauma ou injúria tecidual. Dentre estes hormônios do estresse, os glicocorticóides sempre foram reconhecidos por seus efeitos farmacológicos antiinflamatórios e imunossupressores. Sua participação na resposta inicial ao estresse já é conhecida, induzindo uma reação inflamatória. Há uma interação deste hormônio com os sistemas neuroendócrino e imune, através de uma rede de reações reguladoras que agem sistemicamente pela rota hormonal e, localmente, através dos órgãos linfóides, atuando diretamente sobre os sítios inflamatórios (WEBSTER *et al.*, 2002).

Os corticosteróides podem ter um efeito sob condições normais e um efeito oposto em condições patológicas, ou seja, efeitos diferentes de acordo com a sua concentração fisiológica ou patológica. É possível que os glicocorticóides possam aumentar as funções imunes, de uma forma geral, e inflamatórias em uma concentração e inibir estas mesmas funções em outra concentração (BLACK, 2002; WEBSTER *et al.*, 2002)..

Os efeitos imunodepressores dos corticosteróides são percebidos no rebanho pela contagem diferencial de células sanguíneas da linhagem branca, tais como diminuição de eosinófilos e aumento de neutrófilos. Ocorre, também, aumento na concentração de glicose plasmática após uso destes hormônios, indicando seu efeito catabólico e, conseqüentemente, uma menor habilidade dos bovinos em responder a agentes estressantes (HEMSWORTH *et al.*, 1995).

A adrenal tem um papel chave nas reações hormonais ao estresse e está envolvida, tanto no eixo HPA, quanto no sistema simpático-adreno-medular. Os glicocorticóides, porém, respondem a um ritmo circadiano, que, sob situações repetidas de estresse, pode ser abolido, dificultando a amostragem deste hormônio. Alternativamente, têm-se investigado procedimentos não-invasivos para coleta de amostras de corticóides na urina, leite ou saliva, mas, ainda assim, o manejo dos

animais pode ser um fator influenciador nos níveis do hormônio (MÖSTL & PALME, 2002).

Juntamente com as catecolaminas, os corticosteróides induzem à síntese de uma proteína ligada à lipopolissacáride (LBP) no fígado, um reagente de fase aguda que se liga ao lipopolissacáride (LPS) limitando sua toxicidade. Complementando este efeito dúbio dos corticosteróides, pode ocorrer tanto um aumento da resposta inflamatória do hospedeiro ao LPS, quanto uma maior facilidade de produção de uma proteína neutralizadora, ajudando o hospedeiro a combater a toxicidade dos LPS (BLACK, 2002).

As citocinas agem como mediadores de comunicação intra e intercelular, sendo uma ponte entre os sistemas neuroendócrino e imune. A interleucina 1 (IL-1) e o hormônio glicocorticóide são mediadores-chave envolvidos na modulação da resposta neuro-imune-endócrina ao estresse (HADDAD *et al.*, 2002).

O estresse age como o LPS e as moléculas mediadoras são as citocinas, principalmente IL-1 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). BLACK (2002) sugere uma hipótese de que o LPS pode mediar e/ou aumentar alguns efeitos do estresse na indução da resposta inflamatória. Acredita-se que os LPS estimulem o eixo HPA através do aumento dos níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), estimulado pela liberação de IL-1 (HADDAD *et al.*, 2002).

O fígado é a origem das citocinas subseqüentes à indução por LPS gastrointestinal, absorvidos durante o estresse. A resposta ao estresse culmina em uma resposta de fase aguda (APR), com um incremento da formação da reação inflamatória do organismo. A resposta de citocinas resultante do estímulo hepático é responsável pelo comportamento de doença, manifestados pelos sinais de febre, redução de movimentos, prostração, inapetência, redução da atividade sexual e aumento do sono. Algumas citocinas, além de contribuírem para estes comportamentos, ainda podem levar a uma APR (BLACK, 2002).

Os animais necessitam suprir suas necessidades fisiológicas, comportamentais e psíquicas para sobreviver num ambiente em constante transformação. A capacidade para interagir e responder a essas alterações é o que possibilita a adaptação e a sobrevivência dos indivíduos (HEMSWORTH, *et al.*, 1995).

O comportamento nos animais é determinado por particularidades do seu organismo e está intimamente relacionado aos sistemas nervoso central e periférico, aparelho locomotor e digestório. Em ruminantes, os desenvolvimentos neurológico e neuroendócrino ocorrem, principalmente, durante a vida fetal. Ao nascimento, o eixo HPA é praticamente maduro, apesar da diferente estrutura placentária desta espécie em relação às demais, caracterizada como epiteliocorial com carúnculas separadas por largas áreas de endométrio. Isto confere aos ruminantes uma significativa barreira à influência dos hormônios maternos. Em consequência desta estrutura, o estresse pré-natal pode diferir entre ruminantes e outras espécies (ROUSSEL *et al.*, 2005).

O bovino tem a particularidade de ser um animal social, vivendo em rebanhos, sendo, na maioria das vezes, pacífico. A introdução de práticas zootécnicas visando aumento de produção e produtividade tem exposto estes animais a um processo constante de mudanças ambientais.

O reagrupamento social entre animais, objetivando formar lotes com o mesmo peso, mesmo estado fisiológico, idade ou outro parâmetro qualquer, faz com que ocorram brigas para restabelecimento de hierarquia social, dificuldade de acesso à alimentação e agressões. Este tipo de manejo leva à ativação do eixo HPA e liberação de altos níveis de ACTH, adrenalina, noradrenalina e cortisol que interferem na produção (RUIS *et al.*, 2001).

Em vacas leiteiras, o estresse calórico leva a uma queda na produção de leite devido ao menor consumo de matéria seca, ocorrendo um balanço energético negativo prolongado pós-parto, que aumenta o intervalo entre partos. Além disso, há queda na fertilidade, evidenciada por ausência de manifestação de estro e diminuição da eleição de um folículo dominante (RENSIS & SCARAMUZZI, 2003).

É conhecida a maior resistência ao calor em raças zebuínas (*Bos indicus*), porém tem sido observado que o excesso de cortisol poderia suprimir a ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, sendo compensado por outros sistemas fisiológicos na resistência à desidratação (PARKER *et al.*, 2004), ou seja, a liberação de corticosteroídes em situações estressantes influencia diretamente no equilíbrio hidroeletrólítico do indivíduo.

### 3.2 - Proteínas do Choque Térmico (HSPs)

As proteínas do choque térmico (HSPs) constituem um amplo conjunto protéico que se localiza em praticamente todas as células vivas, desde seres primitivos como os procariotas, até os eucariotas mais evoluídos como o homem. Ao mesmo tempo, suas seqüências de aminoácidos foram, praticamente, conservadas ao longo da evolução, existindo uma estreita similaridade entre HSPs de bactérias e humanos (MEYER & SILVA, 1999; SANDOVAL, 2002; POCKLEY, 2003; MEHTA *et al.*, 2005).

A presença de genes homólogos de HSP em archebactérias, eubactérias e eucariotas sugere que elas existem há mais de 25 bilhões de anos e vêm persistindo durante toda a evolução. Posteriormente surgiram mecanismos protetores alternativos contra o estresse, incluindo a habilidade dos animais mais evoluídos de se esquivarem de ambientes estressantes (HASDAY & SINGH, 2000).

Ritossa (1962) citado por Mehta *et al.* (2005), observou que a exposição das glândulas salivares de *Drosophila* ao calor induzia a expressão de genes específicos no cromossomo gigante destas células. O novo padrão de espessamento provocado pelo calor nos cromossomos, representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas, que, hoje, sabe-se pertencer a uma família de proteínas chamadas proteínas do choque térmico (MEYER & SILVA, 1999; MEHTA *et al.*, 2005).

As HSPs são capazes de mediar a recuperação celular e proteger contra uma injúria potencialmente letal. O processo pelo qual as células respondem ao estresse é conhecido como *Heat Shock Response* (HSR) ou resposta ao choque térmico. O estresse metabólico resulta em alterações na expressão de genes, que levam ao acúmulo de HSPs, podendo afetar, de modo adverso, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas. O acúmulo de proteínas incorretamente dobradas e acumuladas nas células ocasiona uma resposta ao estresse ou HSR (MEYER & SILVA, 1999).

Células expostas ao estresse não mortal, desencadeiam uma HSR com subsequente síntese de HSPs. As células que sintetizam HSPs ficam protegidas contra novas exposições estressantes, refletindo em menores lesões no organismo como um todo ou em parte dele (MEYER & SILVA, 1999).

Esta proteção celular confere às HSPs a denominação de “chaperonas”, que em uma tentativa de explicação, seriam como acompanhantes moleculares, ou seja, substâncias que mesmo sem fazer parte da estrutura final de proteínas, previnem sua agregação inapropriada, medeiam seu transporte para degradação e ajudam a manter sua conformação, promovendo seu reparo e removendo rapidamente as proteínas desnaturadas de dentro das células (MEYER & SILVA, 1999; SANDOVAL, 2002; POCKLEY, 2003; ROBERT, 2003; SEPPONEN & PÖSÖ, 2005).

Segundo Meyer & Silva (1999), chaperonas são substâncias que, sem fazer parte da estrutura final de proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam na montagem final das mesmas, bem como em sua síntese, dobramento e degradação. O dobramento de proteínas é um processo muito importante em biologia, pois converte cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais que possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais.

Sob condições de estresse celular, as proteínas intracelulares podem sofrer desnaturação e inativação. Neste momento, as HSPs aumentam sua expressão e síntese, reconhecendo tais proteínas desnaturadas e unindo-se a elas de forma a dar origem a uma nova estrutura terciária. Esta nova estrutura promove oligomerização, translocação de compartimentos celulares distintos, degradação lisossômica e excreção dos produtos protéicos afetados (SANDOVAL, 2002), ou seja, a maquinaria transcricional e translacional das células é reprogramada para expressar preferencialmente um grupo de proteínas de choque térmico estresse-induzidas (HASDAY & SINGH, 2000).

Os níveis aumentados de HSP conferem à célula meios para identificar e, talvez, facilitar o redobramento das proteínas que foram afetadas de modo adverso pelo estresse metabólico; identificar e fazer ligação com proteínas anormalmente dobradas, de modo que estas sejam marcadas e enviadas a um sistema proteolítico adequado, facilitando, assim, a eliminação das proteínas defeituosas; e facilitar a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas destruídas no estresse metabólico (MEYER & SILVA, 1999).

A regulação da transcrição dos genes das HSPs é mediada pela interação do Fator de choque térmico (HSF) com os elementos do choque térmico, na região promotora do gene hsp. Em vertebrados existem quatro fatores de choque térmico;

porém, os mais freqüentes são HSF1 e HSF2, sendo HSF3 e HSF4 menos importantes (POCKLEY, 2003).

Esta categoria de proteínas normalmente é agrupada em famílias, de acordo com o peso molecular, tais como as de alto peso molecular como as HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e aquelas de baixo peso molecular, entre 10 a 30 kDa (LYDYARD & VAN EDEN, 1990; MEYER & SILVA, 1999; ROBERT, 2003; GULL & TEOH, 2004).

Apesar do alto grau de homologia entre membros de famílias de HSP derivadas de procariotas e eucariotas, que apresentam um alto grau de conservação funcional, estudos têm apontado que HSPs de mesma família, mas de espécies diferentes, podem também ter funções diferentes (POCKLEY, 2003).

O sistema imune dos mamíferos usa as proteínas do estresse como sinal de perigo pelas células estressadas. As HSPs sinalizadoras têm demonstrado a indução da produção de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e fator estimulador de colônia de macrófagos (GM-CSF) entre outras quimiocinas e óxido nítrico, além de estimular a ativação e maturação de células dendríticas (STEWART & YOUNG, 2004).

Similarmente, as HSPs produzidas pelos agentes patogênicos, durante a infecção, induzem a produção de uma variedade de citocinas e quimiocinas e influenciam a maturação de células imunes. As respostas inflamatórias podem ser, porém, diferentes entre as HSPs do hospedeiro e do parasito (POCKLEY, 2003; STEWART & YOUNG, 2004).

HSPs são moléculas imunodominantes e uma resposta imune a microorganismos patogênicos está diretamente relacionada aos peptídeos destas proteínas. Em função de uma crossreatividade entre espécies, as HSPs podem agir como auto-antígenos, atuando como uma ligação entre a infecção e a autoimunidade, ou seja, HSP de família homóloga procarita pode provocar uma diferença qualitativa no perfil de células T de organismos eucariotas. Como exemplo, células T isoladas do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide respondem à HSP60 “self”, com a produção de um perfil de citocinas reguladoras Th2, composto de IL-4 e de IL-10. No entanto, células estimuladas com HSP60 bacteriano elevam a concentração de INF- $\gamma$ , situação consistente com uma resposta pró-inflamatória tipo

Th1. Estes resultados sugerem que HSP próprio pode ter um mecanismo fisiológico regulador nos processos de doenças inflamatórias (POCKLEY, 2003).

Uma mesma proteína de estresse pode alterar a indução do perfil de citocinas, dependendo da sua localização intra ou extracelular. Por exemplo, HSP72 intracelular diminui a produção de citocinas, enquanto HSP72 extracelular potencialmente estimula a produção de citocinas extracelular. Isto pode beneficiar ou prejudicar a resposta do organismo, dependendo do fator estressante que originou esta liberação. Um perfil pró-inflamatório pode exacerbar doenças de origem inflamatória como arteriosclerose ou coronarianas, porém, pode facilitar a recuperação de uma infecção bacteriana (FLESHNER *et al.*, 2004).

Famílias de HSP70 e HSP90 incluem membros localizados em diferentes compartimentos celulares. Nos vertebrados, dois diferentes membros de HSP70 são expressos no citosol. A HSC-70 (cognato) é constitutivamente expressa em níveis muito baixos e fracamente induzível, enquanto a HSP70 não é expressa em muitos tecidos e é altamente induzida pelo estresse. A HSP70 pode ser usada para denominar as formas citoplasmáticas induzíveis e constitutivas (ROBERT, 2003).

Os mecanismos que regulam a expressão de HSP70 são: a) a ligação HSP70 ao domínio de transativação do HSF1, levando à repressão da transcrição de gene do choque térmico. A interação entre HSP70 e HSF1 não tem efeito na ligação ao DNA ou no estado de fosforilação induzido pelo estresse do HSF1; e b) a interação entre HSBP1 (fator de ligação da proteína do choque térmico), uma forma trimérica ativa do HSF1, e HSP70, resultando na inibição da capacidade da HSF1 em ligar ao DNA. O HSBP1 está localizado principalmente no núcleo e o RNAm de HSBP1 está presente em altas concentrações em várias linhagens de células e tecidos animais que não são afetados pelo choque térmico (POCKLEY, 2003; TAYLOR & BENJAMIN, 2005).

Existem, também, dois membros citosólicos da HSP90 nos vertebrados que são a HSP90 $\alpha$  e a HSP90 $\beta$ , resultantes de uma duplicação genética. Meyer & Silva (1999), porém, as denominou “casamenteiras” devido à sua função de aproximar moléculas, auxiliando sua união, dissociando-se em seguida à formação dos complexos.

Outro membro da família das HSPs é a gp96 (GPR 94) que tem sido identificada como antígeno anti-tumor e, mais recentemente, como reguladora da ativação de células apresentadoras de antígeno (APC), apresentando-se como potencial candidata à imunoterapia contra o câncer. Isto porque a gp96 é capaz de ligar uma rede diversa de peptídeos por associar ao MHC classe I. As interações peptídeo-gp96 são estáveis a purificações bioquímicas, sendo reversíveis, com peptídeo sendo liberado e processado por APC; após a internalização pelas APCs, a ligação peptídeo-gp96 é levada para o retículo endoplasmático através de um sistema baseado na proteína do estresse e age como “mensageira” necessária para ativação de linfócitos T CD8 (+) contra tumores (NICCHITTA *et al.*, 2004).

Vários genes hsp70 estão localizados na região do MHC classe II de humanos, ratos e sapos. A HSP70 no citosol interage com vários fatores, incluindo outras HSPs e componentes reguladores que podem agir como adaptadores entre HSP70 e HSP90 (ROBERT, 2003).

Parasitas, como *Plasmodium* e *Theileria*, produzem as formas de HSP70 e HSP90. Estas representam o alvo principal da resposta imune do hospedeiro (MEYER & SILVA, 1999).

A morte celular programada ou apoptose é um importante mecanismo regulador do hospedeiro durante a resposta à infecção por uma variedade de protozoários parasitas intracelulares. No entanto, alguns microorganismos têm desenvolvido várias estratégias para modular a apoptose das células do hospedeiro, contribuindo para sua disseminação, inibindo ou modulando a resposta imune e, desta forma, facilitando a sobrevivência intracelular do patógeno (LÜDER *et al.*, 2001).

O estresse celular é um dos estímulos que desencadeiam a apoptose celular. No entanto, alguns parasitas que residem e replicam intracelularmente, podem utilizar mecanismos que modulam a resposta imune do hospedeiro inibindo, seu reconhecimento e, conseqüentemente, impedindo a apoptose.

A *Theileria parva* induz a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que exerce um papel crucial na proteção das células infectadas contra apoptose, funcionando como mecanismo de sobrevivência do parasito no hospedeiro (LÜDER *et al.*, 2001). No entanto, alguns parasitos, como por exemplo o *Toxoplasma gondii*, podem fazer

uso de suas HSP70 para inibir a produção de óxido nítrico nas células do hospedeiro e, conseqüentemente, diminuir a resposta do hospedeiro ao estresse. Assim, ocorre a diminuição da atividade NF- $\kappa$ B, evitando desta forma, que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B induza a resposta imune, diminuindo a resistência do hospedeiro (DOBBIN *et al.*, 2002).

Acredita-se que após a morte ou injúria celular, ocorre a liberação de HSP70 no meio extracelular; porém, estudos recentes sugerem que esta liberação extracelular pode ser de origem hepatoesplênica, através de uma via de exocitose específica, favorecendo uma rápida liberação destas proteínas através da estimulação neuroendócrina, não requerendo, necessariamente, a morte celular (FLESHNER *et al.*, 2004).

As HSPs antigênicas dos microorganismos podem, porém, produzir uma resposta imune protetora, surgindo como uma possibilidade para produção de vacinas (MEYER & SILVA, 1999). A vantagem do desenvolvimento de vacinas baseadas em HSP é que não há necessidade de identificar e purificar antígenos para terapia (ROBERT, 2003).

A resposta imune dos bovinos, principalmente os jovens, tem as células T $\gamma\delta$  como “linha de frente” nos mecanismos de defesa (UNGAR-WARON *et al.*, 1996). Este subgrupo de linfócitos pode reconhecer HSPs autólogas e heterólogas requerendo menos moléculas apresentadoras de antígeno para as proteínas do estresse reativas. Esta reatividade com HSPs, de acordo com BORN *et al.* (1990), pode ser a base para definir várias funções das células T $\gamma\delta$ , inclusive imunovigilância do epitélio, regulação do crescimento e desenvolvimento de linfócitos, bem como ativação de macrófagos. Acredita-se que as células T $\gamma\delta$ , como sugerido por estudos em humanos e camundongos, reconheceriam as HSPs liberadas durante um processo infeccioso (UNGAR-WARON *et al.*, 1996). O aumento destas células em um processo infeccioso é paralelo e proporcional ao aumento das proteínas do estresse. A forma induzível de HSP70, expressa na superfície celular de alguns tumores, pode interagir diretamente com as células T $\gamma\delta$  e/ou NK (ROBERT, 2003).

Novas questões com relação à apresentação e processamento de antígenos têm surgido a partir do reconhecimento de que as HSPs também podem apresentar antígenos por facilitarem a aglomeração de peptídeos para ocorrência deste processo

(POCKLEY, 2003; BASU & MATSUTAKE, 2004; GULL & TEOH, 2004). Segundo Lydyart *et al.* (1990), membros constitutivos da família das HSP70 estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos, comprovando a participação destas proteínas na resposta imune.

Como processo biológico altamente conservado, a resposta ao choque térmico é essencial para a sobrevivência ao estresse ambiental, incluindo extremos de temperatura, exposição a substâncias químicas tóxicas, radiação, entre outras condições que provocam desnaturação de proteínas celulares essenciais (MEYER & SILVA, 1999; HASDAY & SINGH, 2000; SEPPONEN & PÖSÖ, 2005).

Em experimentos sobre a participação das HSPs no fenômeno de termotolerância, células incapazes de sintetizar HSP sofreram danos irreversíveis, com elevação da temperatura, assim como células previamente tratadas com anti-HSP demonstraram aumento de choque térmico. Em contrapartida, as células que apresentam uma alta expressão de HSP, foram mais resistentes à hipertermia letal. As HSPs também protegem as células de agentes citotóxicos não-térmicos como radiações ultravioleta, isquemia e estresse oxidativo, através de um fenômeno denominado “tolerância cruzada” (SANDOVAL, 2002).

A expressão de HSP70 protege as células do miocárdio de ratos (em cultura) contra a isquemia e elevação de temperatura que, de outra forma, seriam letais (MEHTA *et al.*, 2005). A indução de HSP70 pode representar uma alternativa terapêutica para a isquemia do miocárdio.

As respostas ao estresse estão, sob vários aspectos, sobrepostas, uma vez que existem relativamente poucos fatores de transcrição ativados pelo estresse. Um determinado tipo de estresse pode gerar mais de uma modalidade de resposta. A HSR possui programa genético distinto da APR (resposta de fase aguda), sendo que a primeira- mais primitiva- reduz ou extingue a APR pelo fato das HSPs inibirem a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 em determinados tipos celulares.

A APR é dependente de comunicação intercelular, mediada por citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) e no fígado há produção de reagentes de fase aguda como a proteína C-reativa, fibrinogênio, ceruloplasmina entre outros. Uma forte APR pode levar a efeitos nocivos exagerados, como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, que, caso perdure, evolui para a síndrome de disfunção orgânica múltipla. Daí, a

importância da ação das HSPs protegendo e prevenindo danos celulares e teciduais dos efeitos deletérios da inflamação (MEYER & SILVA, 1999).

Posteriormente, verificou-se que a HSR é um fenômeno que se manifesta em praticamente todos os seres vivos. As células, porém, levam algum tempo para desenvolver plenamente a produção das HSPs, algo em torno de 6 a 18 horas. Do ponto de vista clínico, o desenvolvimento do fenômeno termotolerante, de um modo relevante, requereria ao menos este intervalo de tempo. Embora este intervalo de tempo ainda não exista, mesmo que se consiga um método farmacológico confiável e aplicável clinicamente, capaz de suscitar a HSR, a aplicabilidade fugiria, embora medida, do terreno das urgências (MEYER & SILVA, 1999). Por outro lado, encontraria aplicação provável nos estresses programados, tais como em intervenções cirúrgicas e em tratamentos prolongados de doenças degenerativas e autoimunes.

Células apresentadoras de antígeno (APCs) têm maior dificuldade na tarefa de apresentação imune, já que processam e apresentam peptídeos não somente de origem intracelular, mas também extracelular, incluindo células doentes. Existe uma proposta de que o mecanismo usado pelas APCs é o uso de HSPs como transportadoras de peptídeos, já que em torno de 25 peptídeos derivados de HSP foram identificados, confirmando a hipótese do transporte e apresentação de peptídeos pelas HSPs. (HICKMAN-MILLER & HILDEBRAND, 2004).

Muitas viroses aumentam a expressão de HSP e, subseqüentemente, a apresentação de peptídeos derivados das mesmas, que são reconhecidos tanto pelo sistema imune inato, quanto pelo adaptativo. Este pode ser, então, o mecanismo de vacinas que poderão ser eficazes contra uma série de doenças (HICKMAN-MILLER & HILDEBRAND, 2004).

As proteínas do choque térmico têm emergido como um componente imunoestimulante para o desenvolvimento de vacinas, principalmente em função da habilidade das HSPs em acompanharem peptídeos exógenos e introduzi-los em vias endógenas, o que gera uma potente resposta CD8+. Juntamente com a habilidade dos complexos peptídeos-HSP em elucidar uma resposta MHC classe II antígeno-específica, restrita a CD4+, fazem destas moléculas fortes adjuvantes em vacinas (QAZI *et al.*, 2005).

Indícios sugerem que algumas HSPs podem ser especializadas em determinadas modalidades de estresse associadas com infecção e câncer. Níveis de expressão de HSP70 e HSP90 podem servir como biomarcadores da saúde de um tecido ou população celular (ROBERT, 2003).

Classicamente, a febre é definida como uma elevação no centro regulador de temperatura, provocada por alterações na taxa calórica dos neurônios termorreguladores mediados por pirógenos endógenos. Alterações nestes neurônios é que regulam a integração dos processos de comportamento, fisiológicos e bioquímicos, que determinam o balanço entre a geração e eliminação de calor (HASDAY & SINGH, 2000; BICEGO *et al.*, 2006).

A prevalência da febre em indivíduos representantes da era moderna como os Deuterostomas (vertebrados) e Protostomas (artrópodes e anelídeos), sugere sua origem há mais de 600 milhões de anos (HASDAY & SINGH, 2000). Esta existência pré-histórica fornece evidência de sua importância protetora no hospedeiro infectado. Esta proteção pode ser esclarecida pelo efeito citotóxico ou citostático dos microorganismos, que sob exposição a temperaturas febris, aceleram a liberação de patógenos e “encurtam” a duração da doença.

Um segundo caminho para explicar o efeito protetor da febre durante uma infecção seria pela indução da expressão de HSP nas células do hospedeiro, de modo a aumentar sua resistência ao estresse químico gerado no microambiente infectado. Esta citoproteção conferida pela exposição a temperaturas acima das fisiológicas é mediada, em parte, por quatro famílias de HSPs. Estas proteínas, induzidas por estresse térmico ou bioquímico, preservam componentes celulares essenciais. Juntamente com HSPs, o choque térmico ativa dois outros genes citoprotetores, o superóxido dismutase Cu/Zn (SOD) e o hemioxigenase-1 (HASDAY & SINGH, 2000).

### 3.3 – Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos podem ser descritos como seqüências de aminoácidos construídas e derivadas de uma ou várias proteínas, com características imunogênicas. A seqüência aminoacídica do peptídeo permite a simulação dos sítios antigênicos ou receptores protéicos, que os torna de grande interesse para a produção de vacinas.

Segundo Neurath & Kent (1986), citado por Freitas (2001), imunógenos desenhados podem estimular uma resposta imune apropriada, ou seja, específica e efetiva, com as vantagens da maior segurança, pureza, estabilidade, além de ser mais competitiva em relação aos custos. Patarroyo *et al.* (1999), destacam a melhor padronização e a ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes.

Adjuvante pode ser definido como uma substância que aumenta a imunidade a um antígeno quando adicionado ao mesmo. O conceito de adjuvantes de vacina tem sido restrito àqueles que estimulam títulos de anticorpos. Respostas de anticorpos a antígenos de patógenos são, inicialmente, mensuradas e correlacionadas com proteção em doenças infecciosas (SEGAL *et al.*, 2006).

Recentemente, o conceito de adjuvantes foi expandido e inclui mediadores solúveis e carreadores de antígenos que interagem com moléculas presentes na superfície de células dendríticas e vetores de APCs. As HSPs possuem habilidade de aumentar uma função efetora inata e antígeno-específica, fazendo destas moléculas fortes candidatas a adjuvantes em vacinas (QAZI *et al.*, 2005, SEGAL *et al.*, 2006).

### 3.3.1 – Peptídeo SBbo 23290

O peptídeo sintético de *B. bovis*, denominado SBbo23290, foi desenhado a partir da roptria de *B. bovis*. Foi baseado na estrutura íntegra da proteína (RAP – 1 de *B. bovis*) localizada no complexo apical das babesias (BENAVIDES, 2006). Segundo descrição de Freitas *et al.* (2001), o peptídeo foi obtido da união dos peptídeos 5084 e 5081, que apresentaram maiores estímulos de células T e B após a mensuração da produção de IFN  $\gamma$ , IL – 12, TNF –  $\alpha$ .

Segundo Patarroyo *et al.* (1999), o peptídeo SBbo23290 possui uma conformação distinta daqueles que o originaram, além de possuir, em sua estrutura, um maior número de aminoácidos. Acredita-se que em sua estrutura, encontram-se novos epítomos que conferem maior antigenicidade.

Utilizando saponina como adjuvante, Castro (2005) constatou que o peptídeo sintético SBbo 23290, estimulou a resposta imune dos animais. Os animais vacinados com o peptídeo SBbo 23290 desenvolveram uma resposta imune celular satisfatória nas sub-populações de linfócitos B CD 21+ e T $\gamma\delta$  WC1+. Além disto, foi demonstrado que houve formação de estruturas que conferiram especificidade e memória nos tecidos linfóides após as vacinações.

### 3.3.2 – Peptídeo SBm 7462

O peptídeo SBm7462 é um antígeno vacinal sintético, desenvolvido a partir da proteína Bm86, por predição computacional de sítios imunogênicos, capaz de proteger os animais contra a infestação de carrapatos.

Em bovinos, testes avaliativos do peptídeo mostraram eficácia de 81,05%, contra *R. (B.) microplus*. Houve aumento no número de teleóginas desprendidas, redução do peso das mesmas, bem como redução da ovoposição e da fertilidade (PATARROYO *et al.*, 2002; PATARROYO *et al.*, 2004).

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

### 3.4 - Linfonodos

Morfologicamente, os linfonodos são estruturas encapsuladas perfuradas por numerosos vasos linfáticos aferentes e eferentes responsáveis pela circulação da linfa. Histologicamente são dividido em duas regiões denominadas córtex, mais externa e altamente celular, e uma região mais central conhecida como medular. Nestes órgãos linfóides secundários são iniciadas as respostas imunes adquiridas aos antígenos protéicos originados da linfa (ABBAS *et al.*, 2003).

O córtex subdivide-se em córtex externo ou superficial e paracórtex. No córtex externo estão localizadas as células B “naive”, que se aglomeram, formando os folículos primários, podendo possuir áreas centrais denominadas centros germinativos (CGs), onde ocorre alta proliferação e diferenciação de células B. Os folículos de células B são os principais sítios das respostas humorais. O paracórtex é o local onde os linfócitos circulantes entram nos linfonodos e onde as células T interagem com as células dendríticas. Já na região medular, encontram-se os seios drenantes separados por cordões medulares, contendo células plasmáticas, macrófagos e células T de memória (VON ANDRIAN & MEMPEL, 2003).

Estes órgãos linfóides secundários são tecidos que eficientemente capturam e concentram antígenos estrangeiros para iniciar uma resposta imune adaptativa. Eles

formam um sistema altamente complexo e diverso que mantém a interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos antígenos específicos, resultando na estimulação de longo prazo e na imunidade protetora (DRAYTON, *et al.*, 2006).

Von Andrian & Mempel (2004) definiram como principais funções dos linfonodos o recrutamento de linfócitos virgens do sangue, a coleta de antígenos e células dendríticas dos tecidos periféricos, a promoção de respostas efetoras, a modulação das células T de memória como orientadoras levando-as aos tecidos que contêm antígenos cognatos, bem como a ida para células centrais de memória.

A característica estrutural de um linfonodo é composta pela interação entre células apresentadoras de antígenos e alguns poucos linfócitos específicos para determinados antígenos, o que os torna um ótimo local para indução de respostas imunes adaptativas. Duas células altamente especializadas apresentam os antígenos nos linfonodos: as células dendríticas (DC), que apresentam peptídeos através do MHC classe I e II às células T, e as células dendríticas foliculares (FDC) que formam complexos imunes antígeno-anticorpo, auxiliando na formação da resposta de células B (DRAYTON *et al.*, 2006).

Os centros germinativos conferem especificidade necessária para uma bem sucedida resposta imune, já que as interações entre as células T e B promovem hipermutação somática, seleção antígeno-específica preservando células B de memória (LIU *et al.*, 1997).

### 3.5 - Variáveis bioquímicas

Muitas das mudanças endócrinas e bioquímicas que acontecem no organismo durante um processo de resposta a uma infecção, têm sido mensuradas para avaliação do estado de saúde do indivíduo (OLFERT & GODSON, 2000).

#### 3.5.1 - Glicose

Segundo Kaneko *et al.* (1997), a concentração sangüínea de glicose depende de uma variedade de fatores e é resultante do equilíbrio entre as taxas de entrada e saída de glicose na circulação. O organismo utiliza vias elaboradas para garantir a manutenção da glicemia e, como resultado, a manutenção da glicemia pode vir de

uma ou de várias fontes, dependendo do estado atual do metabolismo de carboidratos.

Nos ruminantes, a degradação da glicose ocorre no rúmen, formando ácidos graxos voláteis. Logo, não é observada hiperglicemia após ingestão de grandes quantidades de açúcar. A glicose do sangue nos bovinos é fornecida por neoformação de ligações glicoplasmáticas, principalmente propionato e aminoácidos glicoplasmáticos, no fígado (KOLB *et al.*, 1987).

No animal em jejum, as concentrações plasmáticas de glicose são mantidas pela mobilização de carboidratos em qualquer local onde possam ser encontrados. Geralmente, há predomínio de glicogenólise hepática associada à lipólise e gliconeogênese, mas se o quadro de inanição prolongar-se, a lipólise e a proteinólise passam a ter importância (KANEKO *et al.*, 1997).

Existe uma retroalimentação complexa e específica, bem como um controle hormonal sobre estas vias, para assegurar uma concentração plasmática de glicose regular e constante, tanto em jejum quanto em superalimentação. Nas situações normais do dia-a-dia o glucagon e o hormônio de crescimento (GH) são os responsáveis pela manutenção dos níveis adequados de glicose. Enquanto que nos estados anormais de jejum ou estresse, os glicocorticóides e a adrenalina passam a ter importância. Contrastando com os múltiplos agentes que atuam aumentando os níveis plasmáticos de glicose, apenas a insulina é responsável pela diminuição de sua concentração (KERR, 2003).

A presença de insulina aumenta a taxa de utilização da glicose por aumentar o seu transporte celular e sua fosforilação, porém, esta ação é prejudicada pelos fatores diabetogênicos como hormônio de crescimento, cortisol, glucagon e adrenalina (KANEKO *et al.*, 1997). De acordo com Kerr (2003), a hipoglicemia é menos freqüente nos bovinos que a hiperglicemia, sendo esta última potencialmente menos danosa a curto prazo.

A combinação do aumento da produção de glicose hepática, diminuindo a utilização de glicose, associada aos níveis anormais de insulina resulta em estresse hiperglicêmico. Uma correlação positiva entre hiperglicemia e severidade de doenças tem sido descrita em associação com cirurgias, traumas, choque e infarto do miocárdio (NYLÉN & ALARIFI, 2001).

Os valores normais de glicose no bovino estão entre 45 e 75 mg/dL , com valores médios em torno de 57,4 mg/dL (KANEKO *et al.*, 1997).

### 3.5.2 - Lactato

Evidências consideráveis suportam uma relação inversa entre hiperlactatemia e sobrevivência. Vários estudos clínicos têm correlacionado níveis de lactato sangüíneo com taxa de mortalidade nos casos de choque séptico e em outras formas de choque circulatório. Outros estudos relacionam níveis de lactato no sangue com o desenvolvimento de falência de órgãos e mortalidade, o que faz com que a duração da acidose láctica assuma importância como fator relacionado à falência de órgãos ou mortalidade em pacientes em choque (NYLÉN & ALARIFI, 2001).

Segundo Allison *et al.* (2006), nos ruminantes, as concentrações de lactato no sangue são dependentes de fatores como dieta, funcionamento do rúmen, estado fisiológico, estresse e atividade física do animal. Existe uma grande variação nos valores de referência que podem oscilar entre 0,56 a 2,22 mmol/L.

### 3.5.3 - Proteínas de fase aguda (APPs)

Em estados patológicos, a taxa de sedimentação de neutrófilos é aumentada no sangue de pacientes com doenças infecciosas. Esta sedimentação é caracterizada por elevadas concentrações de várias proteínas no plasma, conhecidas como proteínas de fase aguda (APP), gerando uma resposta de fase aguda. Esta resposta é, agora, considerada um processo dinâmico, envolvendo mudanças metabólicas e promovendo um mecanismo de defesa precoce e não específico contra injúrias, antes mesmo que a imunidade específica seja ativada (PETERSEN *et al.*, 2004).

Citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e células inflamatórias são ativados. Estas citocinas ativam receptores em diferentes alvos celulares levando a uma reação sistêmica que resulta em ativação do eixo HPA, redução da secreção de hormônio do crescimento, além de inúmeras mudanças físicas clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, balanço negativo de nitrogênio e catabolismo de células musculares. Atualmente, uma série de alterações tem sido mensurada em laboratório, tais como diminuição do plasma sangüíneo e aumento da densidade de colesterol ligado à lipoproteína; aumento de ACTH e

glicocorticóides; ativação do sistema complemento e sistema de coagulação sangüínea; diminuição sérica dos níveis de Ca, Zn, Fe, vitamina A e  $\alpha$ -tocoferol; e aumento da concentração das APPs no plasma (GRUYS *et al.*, 2005b).

Dentro de poucas horas após uma infecção, o padrão de síntese de proteínas hepáticas é drasticamente alterado, resultando em um aumento das APPs positivas. As principais APPs positivas são a proteína C-reativa, a haptoglobina (hp) e amilóide A (SAA), liberadas pelos hepatócitos após estimulação pelas citocinas. Segundo Gruys *et al.* (2005b) existem também as APPs negativas, associadas a um decréscimo na síntese de proteínas normais no sangue, representadas pela pré-albumina, proteína ligada ao retinol, globulina ligada ao cortisol, transferrina e albumina.

O mecanismo para estimulação da produção hepática das APPs pelas citocinas pró-inflamatórias inicia-se com IL-6 através da ligação ao seu receptor, via fosforilação do fator de transcrição NF-IL6, que é translocado para o núcleo e inicia a transcrição dos genes de fase aguda. A IL-1 e TNF $\alpha$ , após ligarem-se aos respectivos receptores, promovem a fosforilação e degradação do I $\kappa$ B, inibidor do fator de transcrição NF $\kappa$ B, levando à liberação do mesmo, e subsequente ativação dos genes de fase aguda no núcleo (ECKERSALL, 2000).

A despeito da natureza uniforme das APPs, existem numerosas diferenças nas características de fase aguda entre diferentes espécies. A causa da ocorrência deste fenômeno é pouco compreendida (KENT, 1992).

As principais mudanças metabólicas durante uma APR são o aumento do catabolismo protéico e a gliconeogênese. As proteínas musculares são catabolizadas em aminoácidos que são requeridos para a síntese de novas proteínas durante o período em que a ingestão de alimentos é reduzida.

Aminoácidos são requeridos para a síntese hepática de APPs, imunoglobulinas e fibroblastos. São também usados para gliconeogênese e fornecimento de energia. Apesar do processo anabólico, o catabolismo das proteínas musculares resulta em um balanço negativo de nitrogênio e perda de peso no animal doente.

Alguns órgãos centrais são preferencialmente preservados para este catabolismo como o rim, pulmão e fígado. A razão para isto não está muito esclarecida, mas estes tecidos são os principais componentes do sistema retículo

endotelial, com atividade aumentada durante a APR. Infelizmente os dados destes eventos nos animais domésticos ainda são limitados, mas sabe-se que a mais importante mudança metabólica é o grande aumento da síntese de APPs no fígado (PYÖRÄLÄ, 2000).

#### 3.5.3.1 - Haptoglobina

A haptoglobina (hp) tem mostrado ser um parâmetro de alto valor para análises de importantes doenças em bovinos, tornando-se um ótimo candidato a medidor de estresse em rebanhos em função de sua meia vida de 2 a 4 dias, com pico de latência em torno de 24 a 48 horas. Estas características permitem uma coleta de amostras de sangue, viabilizando a pesquisa da expressão desta APP em resposta a agentes estressantes (SLOCOMBE & COLDITZ, 2005).

A hp liga-se fortemente à hemoglobina, adquirindo habilidades antiinflamatórias (GRUYS *et al.*, 2005). Considerada como uma APP de segunda linha, é induzida, primariamente, por IL-6 e se caracteriza por um aumento dos níveis séricos tardio e manutenção desta alta concentração por até duas semanas (PETERSEN *et al.*, 2004).

#### 3.5.3.2 - Proteína C-reativa

A proteína C-reativa (PCR) foi descoberta no sangue de pacientes humanos durante a fase aguda de pneumonia pneumocócica. Possui peso molecular de aproximadamente 115 kDa e recebeu este nome em função de sua habilidade em se ligar à polissacáride-C pneumocócico. Na literatura, suas funções biológicas são descritas como ativação de complemento e opsonização e, normalmente, durante os estágios iniciais de um processo infeccioso, a concentração sérica de PCR tende a aumentar (PETERSEN *et al.*, 2004). Trata-se de uma proteína não glicosilada composta de 5 subunidades que firmemente ligam-se aos polissacárides dos *Pneumococcus* (LEE *et al.*, 2003).

Uma interação da proteína C-reativa com a proteína S por fatores inativadores Va e VIIIa, deprime a formação de trombina. Isto também aparenta ter uma propriedade anti-citocina. O estado de hipercoagulação que reduz a PCR precede

sintomas clínicos de sepse em pacientes neutropênicos. Estudos sugerem que uma reposição de PCR pode ser benéfica em casos de sepse (NYLÉN & ALARIFI, 2001).

Em humanos, a PCR é uma das principais APPs, porém, em bovinos, sua expressão é baixa (PYÖRÄLÄ, 2000), não sendo considerada uma APP (PETERSEN *et al.*, 2004).

### 3.6 - Babesiose bovina

A babesiose é uma infecção provocada por um parasito intraeritrocítico do gênero *Babesia*, que requer um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado para manutenção do ciclo (HOMER *et al.*, 2000). Os bovinos representam os hospedeiros vertebrados de maior importância pelos prejuízos econômicos provocados na produção de carne, leite e couro. Mundialmente, estima-se que meio bilhão de animais são acometidos pela doença anualmente, similar ao número de humanos infectados com malária (GELETA, 2001; COOKE *et al.*, 2005). No Brasil, as perdas econômicas são estimadas em torno de US\$11,76/bovino/ano (PATARROYO *et al.*, 2004).

Parasitas do gênero *Babesia* são hematozoários transmitidos pelo carrapato *Boophilus microplus*. O ciclo de vida da *B. bovis* começa com a inoculação das formas infectantes na corrente sanguínea. Os esporozoítos, após penetrarem nas hemácias, diferenciam-se em trofozoítos, multiplicando-se assexuadamente e dando origem a dois merozoítos que infectam outras hemácias. Seu ciclo está completo em torno de 17 h (HOMER *et al.*, 2000; COOKE *et al.*, 2005).

A *B. bovis* é um parasito específico de hemácias, não invadindo outro tipo celular e, após a penetração do merozoíto no eritrócito, ocorre sua fixação, a membrana do vacúolo é destruída e o mesmo fica em contato com o citoplasma (HERNANDEZ, 2002).

Assim como na malária humana, a babesiose se manifesta com febre aguda e anemia hemolítica que, se não tratada, evolui para a forma mais grave e até mesmo fatal. Uma das principais lesões patológicas causada pela *Babesia bovis* é de ordem circulatória, com adesão de eritrócitos nas células endoteliais dos capilares, mediada por proteínas de superfície. Há um intenso seqüestro de eritrócitos infectados na

microvasculatura de diversos órgãos, inclusive no cérebro onde ocasiona uma síndrome cerebral (COOKE *et al.*, 2005).

A despeito da semelhança entre as alterações patológicas na malária produzida pelo *Plasmodium falciparum*, tanto na babesiose como na malária, o seqüestro de eritrócitos nas vênulas e capilares é mais evidente no sistema nervoso central, principalmente no encéfalo. Vargas & Patarroyo (2004) descreveram os sintomas e sinais neurológicos, freqüentemente fatais. Apesar de ocorrer acúmulo de eritrócitos na microcirculação de outros órgãos como rim, mucosa intestinal, coração e pulmão, neste último pode ocorrer edema, levando a uma síndrome respiratória aguda (ARDS) que, possivelmente, é responsável pela maioria das mortes por babesiose bovina.

A imunidade contra babesiose inclui respostas inata e adaptativa, sendo que, em bovinos jovens, a imunidade inata pode ser suficiente para prevenir doença severa (HOMER *et al.*, 2000). Este mesmo autor considera de importância limitada a resposta imune humoral, uma vez que o parasita *B. bovis* pode subverter o componente humoral e manipulá-lo a seu favor.

Ruef *et al.* (2000), baseado em estudos de seqüenciamento de dados do GenBank, identificaram as HSPs da *B. bovis* sob os acessos AF107118 (HSP70) e AF136649 (HSP90). Ao comparar as HSPs 70 de *B. bovis* e do hospedeiro bovino, encontraram uma homologia de 70% de identidade e 82% de similaridade entre as espécies. Este alto grau de homologia também é confirmado em relação a outros parasitas como o *Plasmodium falciparum*, através de análises filogenéticas (COOKE *et al.*, 2005). Isto sugere perspectivas futuras para produção de vacinas baseadas em fragmentos de HSP do parasita, uma vez que esta já é uma realidade para *P. falciparum* (QAZI *et al.*, 2005).

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Departamento de Veterinária (DVT) e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG. À partir de um modelo para mensuração das respostas imune e celular dos peptídeos sintéticos SBbo 23290 e Sbm 7462, buscou-se avaliar o estresse de bovinos mantidos no isolamento contra artrópodes e vetores de hematozoários. Considerou-se como agente estressante os imunógenos sintéticos SBbo 23290 e Sbm 7462, inoculados juntos e separadamente, em três doses com intervalos de trinta dias entre estas. O experimento, efetivamente, teve a duração de 120 dias e durante este período foram realizadas coletas para análises histopatológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas.

### 4.1 - Animais

Para realização do experimento, foram utilizados 16 bezerros machos cruzados, com grau de sangue variando entre meio sangue holandês/ gir até 7/8 holandês/gir, típicos representantes da maioria do rebanho nacional. Estes animais foram mantidos no Isolamento contra Artrópodes e Vetores de Hematozoários para Bovinos, localizado no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG.

Os bezerros foram confinados com idade entre sete e quinze dias, sendo alimentados com sucedâneo de leite na mamadeira até os 4 meses de idade, em quantidade suficiente para atender a demanda de crescimento dos animais. Além do leite de substituição, também receberam feno de Tifton e concentrado balanceado com 18% de proteína bruta e 75% de NDT, com minerais equilibrados de acordo com exigências da categoria. A água manteve-se *ad libitum* durante todo o experimento. Após os quatro meses de idade o feno foi substituído por capim Elefante.

Todos os animais foram vermifugados no primeiro dia de isolamento e examinados sorológica e hematologicamente quanto à presença de hemoparasitas. Também receberam brincos numéricos para identificação.

Parâmetros clínicos tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, elasticidade da pele, mucosas, tempo de retorno capilar, bem como peso e estimativa de escore corporal, foram mensurados ao início do experimento para aferição do estado de saúde dos animais. O peso foi aferido mensalmente através de fita Bovitec®.

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de quatro bezerros cada, conforme o quadro 1.

QUADRO 1 – Divisão dos grupos de animais

| GRUPO                          | ANIMAIS        | BAIAS |
|--------------------------------|----------------|-------|
| 1. Controle                    | 41, 28, 22, 46 | 1 e 2 |
| 2. Saponina                    | 45, 29, 20, 23 | 3 e 4 |
| 3. SBbo23290(D)<br>SBm7462 (E) | 25, SN, 27, 24 | 5 e 6 |
| 4. Polivalente                 | 53, 42, 21, 54 | 7 e 8 |

Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.2 - Esquema de inoculação dos peptídeos sintéticos e desafio

Após um período de 10 meses, considerando-se que os animais estariam adaptados ao ambiente em boas condições corporais, iniciou-se o experimento.

Cada grupo de quatro animais recebeu 3 inoculações de água, adjuvante ou peptídeo, de acordo com a divisão dos grupos, nos dias 01, 30 e 60 do experimento (Quadro 2). Entre os dias 78 e 80 todos os grupos foram infestados com larvas de carrapatos, simulando o estresse de uma infestação natural e, no dia 85, desafiados com cepa patogênica de *Babesia bovis*.

Os animais do grupo controle, denominado Controle, receberam 2mL de água deionizada, por via sub-cutânea, do lado direito do pescoço. Os animais do grupo

adjuvante , denominado Saponina, receberam 1,5 mg de saponina<sup>1</sup> diluída em água deionizada, por via sub-cutânea, do lado direito do pescoço. Os do grupo duas vacinas, denominado Duas Vacinas, receberam 2 mg do peptídeo sintético SBbo23290, associado a 1,5 mg de saponina, diluído em 2 ml de água deionizada, no lado direito do pescoço. No lado esquerdo do pescoço deste grupo, foi inoculado o peptídeo sintético SBm7462, associado a 1,5 mg de saponina, diluído em 2 ml de água deionizada. As vacinas foram aplicadas simultaneamente, por via sub-cutânea. O grupo que recebeu o imunógeno polivalente, denominado Polivalente, recebeu 2 mg do peptídeo SBbo 23290, mais 2 mg do peptídeo SBm 7462, associado a 1,5 mg de saponina, diluídos em 5 ml de água deionizada. Esta vacina, em dose única, foi aplicada por via sub-cutânea, do lado direito do pescoço. O esquema destes procedimentos estão descritos no quadro 2 e figura 1.

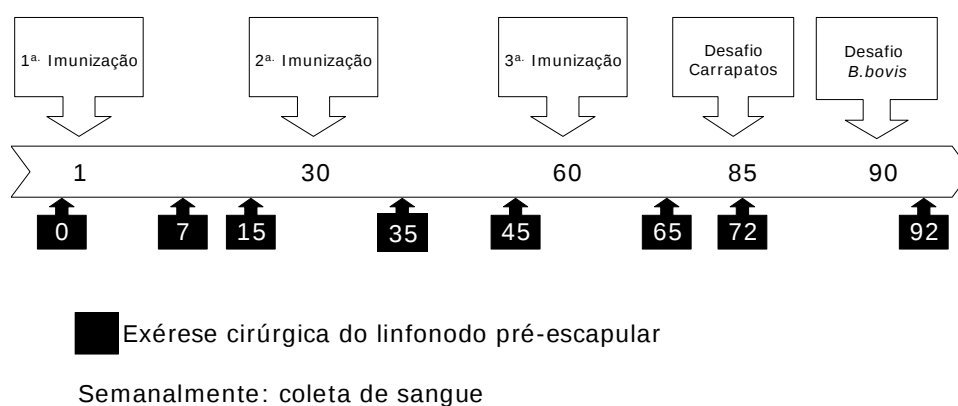


Figura 1: Delineamento experimental

Todos os animais foram submetidos a mensurações de temperatura corporal diariamente, bem como exame clínico geral, após início do esquema de inoculação.

O desafio dos animais foi feito 30 dias após a terceira inoculação, utilizando larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* livres de parasitas Universidade Federal do Rio Grande do Sul de Porto Alegre–RG. Uma seringa contendo em torno de 2000 larvas, foi aderida ao corpo de cada um dos dezesseis animais na região cervical. Para evitar mortalidade e ou retirada mecânica dos parasitas durante o período de fixação, os bezerros foram mantidos em cabrestros

<sup>1</sup> Saponina 5012 sample NO SOSO8064 Quantity 100g (Kerry Bio- Science) Ireland.

curtos e tiveram a cauda amarrada próxima ao corpo. Todo o procedimento foi repetido no dia seguinte, totalizando, em média, 4000 larvas por animal.

QUADRO 2 – Grupos de animais e imunógenos utilizados no experimento. (D) imunógeno aplicado do lado direito, (E) imunógeno aplicado do lado esquerdo, SC: via de aplicação subcutânea.

| GRUPO              | ANIMAIS        | IMUNÓGENO          | VOLUME<br>INOCULADO | VIA |
|--------------------|----------------|--------------------|---------------------|-----|
| Controle<br>(água) | 41, 28, 22, 46 | Água<br>deionizada | 2 mL                | SC  |
| Saponina           | 45, 29, 20, 23 | Saponina           | 1,5 mg              | SC  |
|                    |                | Água<br>deionizada | 2 mL                |     |
| Duas Vacinas       |                | SBm 7463           | 2 mg                |     |
| SBm7462(E)         | 25, SN, 27,    | Saponina           | 1,5 mg              | (E) |
| SBbo23290(D)       | 24             | Água<br>deionizada | 2 mL                |     |
|                    |                | —————              | 2 mg                | SC  |
|                    |                | SBbo 23290         | 1,5 mg              | (D) |
|                    |                | Saponina           | 2 mL                |     |
|                    |                | Água<br>deionizada |                     |     |
| Polivalente        |                | SBm 7462           | 2 mg                |     |
| (SBm7462 +         | 53, 42, 21, 54 | SBbo 23290         | 2 mg                | SC  |
| SBbo23290)         |                | Saponina           | 1,5 mg              |     |
|                    |                | Água<br>deionizada | 5 mL                |     |

Aos 35 dias após a terceira inoculação dos peptídeos, foi realizado o desafio com *Babesia bovis* cepa UFV1 – 9ª passagem, diluída em PBS a uma concentração de  $1 \times 10^6$  *B. bovis*/mL, administrada por via endovenosa.

#### 4.3 - Acompanhamento clínico dos animais

Os grupos tiveram seus parâmetros clínicos avaliados, objetivando identificação de alterações condizentes com um quadro clínico de doença. Após o desafio, a avaliação destes parâmetros passou a ser diária e a temperatura foi mensurada duas vezes ao dia.

Nos animais que apresentaram alterações nos parâmetros clínicos associada à diminuição no hematócrito, hemoglobina e presença de parasitemia, foi realizado tratamento com 3,5 mg/kg de diaceturato de 4,4 diazoaminobenzamidina (Ganaseg®), por via intramuscular, em dose única.

#### 4.4 - Coleta de Material

##### 4.4.1 - Coleta de linfonodos

Com o objetivo de se avaliar a expressão das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90, bem como a expressão dos peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 dos animais do experimento, foram realizadas biópsias dos linfonodos pré-escapular direito e esquerdo.

As coletas seguiram um cronograma de datas, sendo realizadas nos dias 0, 07, 15, 35, 45, 65, 72 e 92 do experimento, conforme figura 1. A cada dia de cirurgia, um bezerro representante de cada um dos quatro grupos era operado, totalizando quatro intervenções diárias. Após a remoção cirúrgica, cada linfonodo foi medido nos sentidos de comprimento e largura.

O protocolo cirúrgico seguiu as recomendações de antisepsia pré-operatória, com tricotomia, desinfecção com álcool iodado. Os animais foram sedados com xilazina 10 mg, recebendo 0,01 ml para cada 10 kg de peso vivo, por via endovenosa. Após contenção mecânica, foi realizado bloqueio anestésico local com lidocaína 2 %, seguindo a técnica de L ( em média de 20 ml por animal). Seguiu-se a incisão

cirúrgica, extirpação do linfonodo e ligadura dos vasos. Foi feita redução do espaço morto com fio de nylon 2-0, bem como sutura externa com pontos simples separados utilizando-se fio de nylon 2-0. Todos os animais receberam uma dose de 20 mg/kg de peso corporal de antibacteriano Oxitetraciclina, por via intramuscular, em dose única.

#### 4.4.2 - Coleta de sangue

Semanalmente, coletaram-se amostras de sangue por punção da veia jugular, de todos os animais utilizando tubos sem anticoagulante, com anticoagulante ácido etilendiamino tetracético (EDTA) e com fluoreto, para acompanhamento do perfil hematológico e bioquímico dos animais antes, durante as vacinações e após o desafio.

No perfil hematológico avaliou-se hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, sendo mensurado em sangue total coletado em frascos com EDTA. O soro foi obtido após centrifugação dos frascos sem anticoagulante, em 2500 giros por 5 minutos, para análise de proteínas de fase aguda haptoglobina e proteína C- reativa. O plasma foi obtido do sangue coletado em frascos com fluoreto e centrifugados a 2500 giros por 10 minutos, para análises de glicose e lactato. Tanto o soro quanto o plasma foram aliquotados em tubos Eppendorf devidamente identificados e congelados a – 20° C até o momento das análises.

#### 4.5 - Histopatologia dos linfonodos bovinos

Os linfonodos coletados foram seccionados em fragmentos de 1 a 2 cm de espessura e fixados em paraformaldeído a 4%, pH 7,2, durante 8 horas. Após este período, foram lavados com álcool 70% e nele conservados até o procedimento de inclusão. Os fragmentos foram então desidratados em soluções alcoólicas crescentes de 70%, 80%, 90% e duas de 100%, sendo, a seguir, diafanizados em xilol. A inclusão se deu em Paraplast Plus (Sigma®) (PROPHET *et al.*, 1992).

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo de rotação modelo SPENCER – American Optical Company, com a espessura de 4 µm, sendo corados com Hematoxilina & Eosina.

A avaliação das alterações histológicas das lâminas foi feita em microscópio óptico binocular, modelo ECLIPSE E600, Nikon, Japan.

#### 4.6 - Imunoistoquímica da expressão de HSP70 e HSP90

A expressão das HSPs foi mensurada utilizando-se cortes histológicos, em lâminas silanizadas. Os cortes foram mantidos em estufa a 56° C por 24 horas, sendo, a seguir, desparafinados em duas passagens de xilol com 30 minutos de duração cada e dois banhos de álcool absoluto (5 minutos cada). A hidratação foi feita com banhos decrescentes de álcoois 90%, 80%, 70% e PBS pH 7,4 (1,48g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,43g de fosfato de sódio monobásico anidro, 7,2g de cloreto de sódio e água deionizada q.s.p. 1000mL), com duração de 5 minutos cada.

A recuperação antigênica foi realizada com os cortes mergulhados em tampão citrato pH 6,0, durante 30 minutos a 90° C. Seguiram-se três lavagens em PBS pH 7,4 com duração de 5 minutos cada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 15 minutos, a temperatura ambiente e em câmara úmida e escura. Após duas lavagens com PBS pH 7,4, foi adicionado sobre os cortes, soro normal de coelho diluído em PBS pH 7,4 (1:10), incubando em câmara úmida por mais 45 minutos, com o objetivo de bloquear os sítios inespecíficos da reação.

O soro foi então removido das lâminas e adicionado o anticorpo primário diluído em PBS pH 7,4 (1: 50) anti-HSP 70<sup>2</sup> ou anti-HSP 90<sup>3</sup>, ficando durante 18 horas incubadas em câmara úmida a 4° C. Após este período, os cortes foram lavados com PBS pH 7,4 por 3 vezes de 5 minutos de duração cada e cobertos com o anticorpo secundário marcado com peroxidase, produzido pelo LBCHV, na diluição de 1: 500 em PBS pH 7,4 e novamente incubados em câmara úmida por 1 hora, a 37° C.

Procederam-se mais duas lavagens dos cortes com PBS pH 7,4 de 5 minutos de duração cada, para em seguida cobri-los com a solução reveladora DAB adicionada de 5 µL de peróxido de hidrogênio, diluído em PBS pH 7,4 (1:500) por 15 minutos em câmara úmida a 37° C, lavando-se novamente por mais duas vezes de cinco minutos cada.

---

<sup>2</sup> HSP 70 (K-20): sc-1060 – Santa Cruz Biotechnology, INC.

<sup>3</sup> HSP 90 (N-17): sc-1055 – Santa Cruz Biotechnology, INC.

A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) na diluição de 2,5mg/10mL, durante 15 minutos em câmara escura, lavando com PBS pH 7,4 a seguir. Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris 1:9 diluída em água destilada durante 10 segundos. Após serem lavados com PBS pH 7,4 por 5 minutos, os cortes foram então desidratados em álcoois crescentes e diafanizados em xilol, para finalmente serem montados com Entellan® entre lâmina e lamínula.

O controle negativo foi obtido de um animal pertencente ao grupo controle, sendo que o corte histológico, não recebeu o anticorpo primário durante todo o processo de imunoistoquímica.

#### 4.7 - Imunoistoquímica da expressão dos peptídeos SBm7462 e SBbo23290

Os cortes histológicos foram mantidos em estufa a 56° C por 24 horas, sendo, a seguir, desparafinados em duas passagens de xilol com 30 minutos de duração cada e dois banhos de álcool absoluto (5 minutos cada). A hidratação foi feita com banhos decrescentes de álcoois 90%, 80%, 70% e PBS pH 7,4 (1,48g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,43g de fosfato de sódio monobásico anidro, 7,2g de cloreto de sódio e água deionizada q.s.p. 1000mL), com duração de 5 minutos cada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio metanólico 3%, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após três lavagens em PBS pH 7,4, os cortes foram cobertos com soro normal de cabra diluído em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida com temperatura ambiente.

O soro foi removido das lâminas e adicionou-se o anticorpo primário IgG de coelho anti-peptídeo SBm 7462 ou IgG de coelho anti-peptídeo SBbo 23290, produzidos no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores e diluídos em PBS pH 7,4 (1:10). Após incubação por 30 horas a 4° C em câmara úmida, repetiram-se mais três lavagens e adicionou-se o anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de coelho diluído em PBS pH 7,4 (1:10).

Os cortes foram novamente incubados em câmara úmida por 45 minutos a 37° C. Procederam-se mais duas lavagens dos cortes com PBS pH 7,4 de 5 minutos de duração cada, para em seguida cobri-los com a solução reveladora DAB adicionada de 5 µL de peróxido de hidrogênio, diluído em PBS pH 7,4 (1:500) por

15 minutos em câmara úmida a 37° C, lavando-se novamente por mais duas vezes de cinco minutos cada.

A revelação foi feita com DAB na diluição de 2,5mg/ 10mL, durante 15 minutos em câmara escura, lavando com PBS pH 7,4 a seguir. Os cortes foram então contracolorados com hematoxilina de Harris 1:10 diluída em água destilada durante 20 segundos, lavados, a seguir, com água destilada por 5 minutos e as bordas das lâminas foram secas com papel absorvente. Após serem lavados com PBS pH 7,4 por 5 minutos, os cortes foram então desidratados em álcoois crescentes e diafanizados em xilol, para finalmente serem montados com Entellan® entre lâmina e lamínula.

#### 4.8 - Análises bioquímicas do soro e plasma

O perfil bioquímico dos animais foi mensurado para a concentração de glicose, lactato, proteína C-reativa e haptoglobina. As APPs foram mensuradas no soro e glicose e lactato mensurados no plasma. As análises foram realizadas de forma automatizada utilizando-se o equipamento Image Immunochemistry System – Beckman Coulter <sup>TM</sup>.

A técnica utilizada para mensuração dos níveis de Hp e PCR foi a nefelometria. Trata-se de uma técnica de dissipação de luz, onde ocorre a formação do imunocomplexo Ag-Ac e a quantidade de luz dissipada é diretamente proporcional à concentração do imunocomplexo formado. É considerada uma técnica quantitativa.

#### 4.9 - Modelo Analítico das variáveis bioquímicas

No experimento, os 16 animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4 grupos X 17 tempos, com quatro repetições. Os grupos foram denominados de Controle, Adjuvante, Duas Vacinas e Polivalente. O tempo foi distribuído em semanas, iniciando-se em 10/03/06 e término em 10/07/06.

A variável grupo foi analisada pelo teste de Tukey e a variável tempo, pelo teste de Scott Knott. As variáveis foram analisadas por testes comparativos diferentes em função das ambigüidades encontradas. A ambigüidade é definida quando dois tratamentos tidos como diferentes entre si não diferem de um terceiro.

Segundo Ferreira (2003), o teste de Scott Knott visa a separação de médias de tratamentos em grupos distintos, através da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos. Na sua própria natureza teórica, os resultados nunca poderão apresentar-se ambíguos. Desta forma, os mesmos são facilmente interpretados, resultando em maior objetividade e clareza. Foi possível a sua aplicação devido à existência de mais de 15 observações para a variável tempo.

Utilizou-se o software Sisvar®, versão 4.6 (build 62) 2003 para análise dos dados, ao nível de 5% de probabilidade.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Avaliação dos parâmetros clínicos dos animais

Considerando-se uma avaliação do estado geral dos animais durante o experimento, pode-se afirmar que se mantiveram saudáveis, não apresentando sinais clínicos de doença instalada. Com exceção do animal número SN, pertencente ao grupo Duas Vacinas. Este apresentou parasitemia confirmada pela presença do agente na circulação periférica e redução do hematócrito em 72%. Foi tratado com diaceturato de 4,4 diazoaminobenzamidina (Ganaseg<sup>®</sup>) na dosagem de 3,5 mg/Kg de peso corporal, por via intramuscular, em dose única.

Doença, em um sentido amplo, pode ser decorrente de uma situação na qual não há uma boa adaptação entre o indivíduo e o meio em que ele vive, alterando os processos normais de formação, desenvolvimento e sobrevivência (BOGLIOLO, 1978).

Durante todo o experimento não ocorreu nenhum óbito nos animais dos quatro grupos avaliados, apesar de ter ocorrido parasitemia em animais dos grupos Controle, Saponina e Duas Vacinas. Considerando-se o estado geral dos animais durante o experimento, pode-se afirmar que se mantiveram saudáveis, não apresentando sinais clínicos de doença instalada. Com exceção do animal número SN, pertencente ao grupo Duas Vacinas. Este apresentou parasitemia confirmada pela presença do agente na circulação periférica e redução do volume globular em 72%. Foi tratado com diaceturato de 4,4 diazoaminobenzamidina (Ganaseg<sup>®</sup>) na dosagem de 3,5 mg/Kg de peso corporal, por via intramuscular, em dose única.

Alterações na temperatura corporal são comuns em doenças infecciosas e a resposta inicial do organismo é a febre ou hipertermia (OLFERT & GODSON, 2000). Para avaliação da temperatura corporal, consideraram-se alteradas as medidas superiores a 39° C, sendo que todos os animais do presente estudo apresentaram aumento da mesma 24 horas após as inoculações, independentemente do grupo ao qual pertenciam (figuras 2,3 e 4).

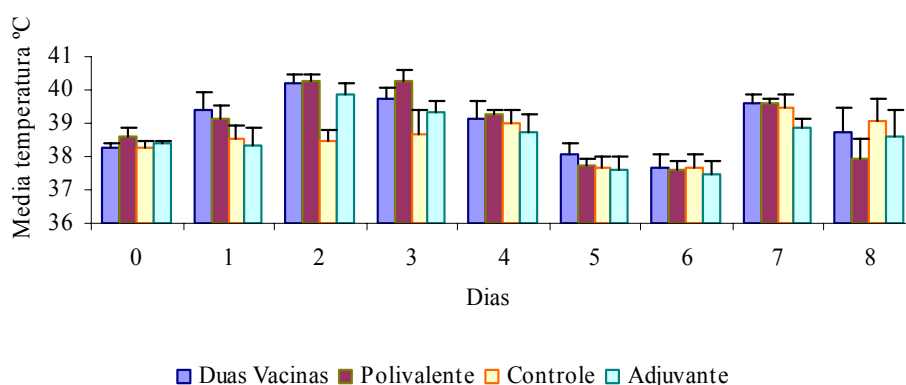
Após a segunda inoculação, ou seja, no dia trinta do experimento, ocorreu um pico febril com duração de 72 horas nos animais pertencentes aos grupos Duas Vacinas e Polivalente, sendo a temperatura máxima 40,1° C e 40,2° C, respectivamente (Figuras 2 e 3).

Aos sessenta dias de experimento, data da terceira inoculação de imunógenos, os animais dos grupos Duas Vacinas e Polivalente apresentaram temperaturas de 40,2° C e 39,7° C, respectivamente. Os animais do grupo controle, nesta mesma data, apresentaram temperatura máxima de 38,4° C, significando menor resposta em relação aos demais grupos (Figura 4).

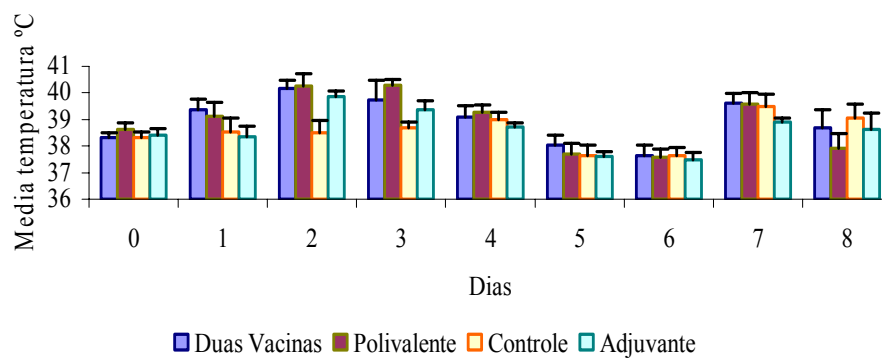
Muitos estudos mostram que a indução do choque térmico em mamíferos requer aumento acima de 4°C nos níveis de temperatura basal. Pequenos aumentos na temperatura têm, porém, ativado resposta ao estresse em alguns modelos vivos (HASDAY & SINGH, 2000). Em contrapartida, a febre pode promover efeitos inibitórios na resposta do hospedeiro, uma vez que células polimorfonucleares (PMN), mesmo tendo a motilidade e capacidade fagocitária aumentadas pela temperatura elevada, têm diminuída a quimiotaxia e a atividade bacteriostática torna-se fraca.

Os níveis máximos de temperatura dos animais de todos os grupos não excederam o limite de 40,2° C, sendo insuficiente para promover uma redução na resposta imune. Esta redução seria esperada em temperaturas superiores a 41° C (HASDAY & SINGH, 2000).

A resposta imunológica pode ser influenciada por fatores como privação materna, mudança de ambiente e alimentação. Segundo Marsland *et al.* (2002), podem ocorrer diferenças entre indivíduos estressados durante uma resposta a doença.

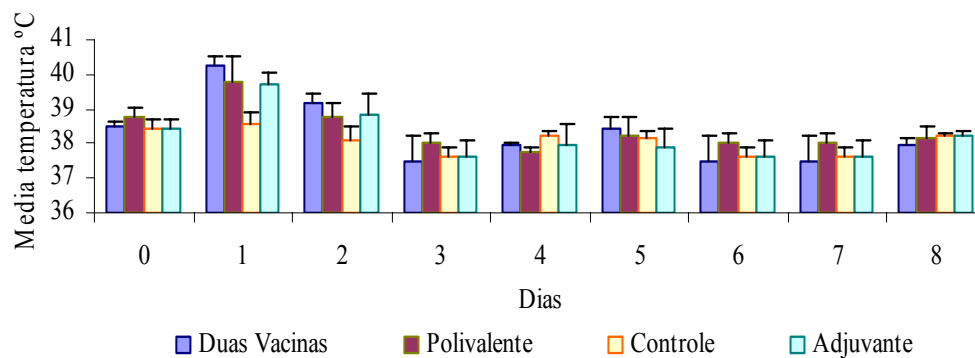


Fonte: Dados da pesquisa  
 Figura 2 – Médias de temperatura retal após primeira inoculação



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 - Médias de temperatura retal após segunda inoculação



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 - Médias de temperatura retal após terceira inoculação

Os bezerros deste experimento sofreram influência destas variáveis, porém, considerando a capacidade de adaptação da espécie bovina a variados manejos, o fator ambiente, provavelmente, não contribuiu para aumentar a susceptibilidade ao estresse. Logo, os animais mantiveram-se saudáveis mesmo após o desafio com a cepa patogênica de *Babesia bovis*, sugerindo a importância do bem estar na eficiência da resposta imunológica.

## 5.2 - Avaliações macroscópica e histopatológica dos linfonodos

Macroscopicamente, o linfonodo pré-escapular, ou cervical profundo, de um bovino jovem e saudável deve-se apresentar alongado, com comprimento variando entre 1 e 10 centímetros, e largura entre 1,5 e 2 centímetros. Sua face profunda tem

um hilo longo e distinto, por onde penetram os vasos aferentes e de onde emerge a circulação eferente (GETTY, 1981).

Antes que fossem iniciados os procedimentos propostos durante o experimento, realizou-se a remoção cirúrgica do linfonodo pré-escapular de um dos animais do grupo Controle para obtenção de um parâmetro comparativo. Este se apresentou, macroscopicamente, com 2 centímetros de comprimento por 1 centímetro de largura, consistência firme, confirmando as dimensões consideradas normais por Getty (1981).

A partir do início do experimento, observou-se um aumento de volume crescente nestes órgãos linfáticos, até a coleta realizada após a segunda inoculação, com pico máximo de tamanho dos animais dos grupos que receberam inoculação dos peptídeos. Nestes grupos, o tamanho dos linfonodos alcançou 17 X 4 centímetros. Aos quinze dias após a segunda inoculação, houve regressão no tamanho, como pode ser observado no Quadro 3. Esta regressão do órgão pode ser interpretada como um processo anérgico.

Os animais do grupo Controle não apresentaram alterações macroscópicas no decorrer do experimento.

O aumento macroscópico dos linfonodos coincide com as alterações histológicas, cuja dinâmica foi correlacionada nos grupos Duas Vacinas e Polivalente.

Ao exame microscópico dos linfonodos, verificou-se que 7 dias após a primeira inoculação já é possível perceber reatividade de centros germinativos (CGs) e hiperplasia de áreas paracorticais, nos animais que receberam doses de peptídeos sintéticos, ou seja, nos grupos Duas Vacinas e Polivalente. Estes também foram os achados de Freitas (2001) e Castro (2005), quando avaliaram a inoculação de uma cepa atenuada de *B. bovis* e do peptídeo SBbo 23290, respectivamente, em linfonodos bovinos.

Os animais do grupo Controle mantiveram-se com discreta reatividade durante as inoculações de água, o que pode ser observado pelo reduzido tamanho dos CGs, presentes na figura 4A. Estes achados estão de acordo com Freitas (2001) e Resende (2003), que consideraram como uma resposta inespecífica. Após o desafio, os linfonodos destes mesmos animais apresentaram discreta hiperplasia de paracortical., com aumento do número e do tamanho dos CGs, conforme figura 4B. Esta reatividade sugere uma resposta contra *B.bovis*.

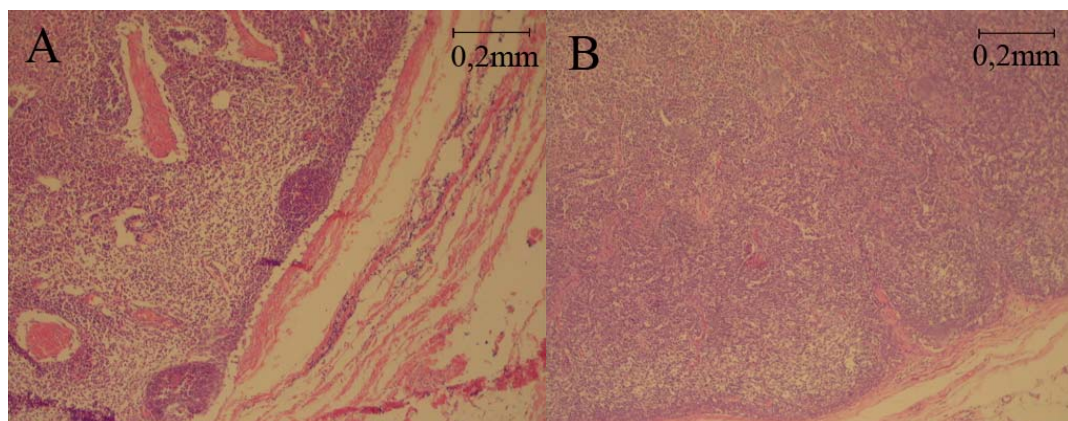
QUADRO 3 – Macroscopia dos linfonodos dos grupos Controle, Adjuvante, Duas Vacinas e Polivalente, ao longo do período.

| Animal | Grupo        | Lado     | Medida *  | Coleta | Tempo X Procedimento  |
|--------|--------------|----------|-----------|--------|-----------------------|
| 41     | Controle     | direito  | 2 x 1     | 09/mar | Antes do início       |
| 28     | Controle     | direito  | 1,8 x 1,5 | 20/mar | 7 dias após 1ª inoc.  |
| 29     | Adjuvante    | direito  | 2 x 1,3   | 20/mar | 7 dias após 1ª inoc.  |
| SN     | Duas Vacinas | direito  | 2 x 1,3   | 20/mar | 7 dias após 1ª inoc.  |
| 53     | Polivalente  | direito  | 2,5 x 1,5 | 20/mar | 7 dias após 1ª inoc.  |
| 22     | Controle     | direito  | 2,5 x 1,5 | 28/mar | 15 dias após 1ª inoc. |
| 45     | Adjuvante    | direito  | 2,5 x 1,5 | 28/mar | 15 dias após 1ª inoc. |
| 25     | Duas Vacinas | direito  | 2,8 x 2   | 28/mar | 15 dias após 1ª inoc. |
| 42     | Polivalente  | direito  | 3 x 1,8   | 28/mar | 15 dias após 1ª inoc. |
| 46     | Controle     | direito  | 4 x 1,5   | 17/abr | 5 dias após 2ª inoc.  |
| 20     | Adjuvante    | direito  | 12 x 3    | 17/abr | 5 dias após 2ª inoc.  |
| 27     | Duas Vacinas | direito  | 15 x 3    | 17/abr | 5 dias após 2ª inoc.  |
| 54     | Polivalente  | direito  | 17 x 4    | 17/abr | 5 dias após 2ª inoc.  |
| 41     | Controle     | esquerdo | 2 x 2     | 27/abr | 15 dias após 2ª inoc. |
| 23     | Adjuvante    | direito  | 4 x 2     | 27/abr | 15 dias após 2ª inoc. |
| 24     | Duas Vacinas | direito  | 6 x 2,5   | 27/abr | 15 dias após 2ª inoc. |
| 21     | Polivalente  | direito  | 7 x 3     | 27/abr | 15 dias após 2ª inoc. |
| 28     | Controle     | esquerdo | 6 x 1,5   | 17/mai | 5 dias após 3ª inoc.  |
| 45     | Adjuvante    | esquerdo | 5 x 1,5   | 17/mai | 5 dias após 3ª inoc.  |
| 25     | Duas Vacinas | esquerdo | 7 x 2     | 17/mai | 5 dias após 3ª inoc.  |
| 53     | Polivalente  | esquerdo | 4,5 x 1,2 | 17/mai | 5 dias após 3ª inoc.  |
| 22     | Controle     | esquerdo | 6 x 1,5   | 24/mai | 12 dias após 3ª inoc  |
| 29     | Adjuvante    | esquerdo | 6 x 1,5   | 24/mai | 12 dias após 3ª inoc  |
| SN     | Duas Vacinas | esquerdo | 7 x 2     | 24/mai | 12 dias após 3ª inoc  |
| 42     | Polivalente  | esquerdo | 5 x 1,2   | 24/mai | 12 dias após 3ª inoc  |
| 46     | Controle     | esquerdo | 4 x 1,5   | 25/jun | 7 dias após desafio   |
| 20     | Adjuvante    | esquerdo | 1 x 0,5   | 25/jun | 7 dias após desafio   |
| 27     | Duas Vacinas | esquerdo | 6 x 2,5   | 25/jun | 7 dias após desafio   |
| 54     | Polivalente  | esquerdo | 7 x 3     | 25/jun | 7 dias após desafio   |

Fonte: Dados da pesquisa

Segundo Drayton *et al.* (2006), após uma imunização, ocorre um aumento imediato do fluxo eferente nos linfonodos, com pico de 24 a 48 horas, e, após este período, há uma temporária ausência de linfa eferente. É verificado também um decréscimo com o passar do período de estimulação e com o decorrer da idade do indivíduo, o que caracteriza a plasticidade destes órgãos.

Comparando a evolução macroscópica e os achados histopatológicos, fica caracterizada esta plasticidade deste órgão linfóide. Houve um aumento de tamanho após as primeiras imunizações, acompanhado de uma maior densidade celular e maior reatividade de CGs. A partir da terceira imunização, verificou-se uma regressão no diâmetro dos linfonodos, com conseqüente diminuição da reatividade dos CGs e menor densidade celular (figura 5).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 – Linfonodos bovinos do grupo Controle inoculados com água. A: Aos sete dias após a primeira inoculação. B: Aos sete dias após desafio com *B.bovis*. Coloração H&E, 100X.

Aos quinze dias após a primeira inoculação, os animais dos grupos imunizados apresentaram evidente aumento de densidade celular nos CGs, com presença de células dendríticas foliculares e ocasionais figuras mitóticas próximas à área de transição entre a zona clara e a escura. Houve também aumento de paracortical e discreta hiperplasia de seios medulares, concordando com os achados de Resende (2003) e Castro (2005).

Freitas (2001) e Resende (2003) atribuíram a formação de CGs nos linfonodos a uma resposta T-dependente, estimulada pelo peptídeo. Uma resposta T-independente seria ocasionada por lipopolissacárides ou alguns surfactantes, não presentes nas preparações dos peptídeos.

Os animais do grupo Adjuvante demonstraram uma resposta semelhante a dos animais imunizados, após a segunda inoculação, porém mais discreta. Segundo Sales Júnior (2003), a saponina utilizada como adjuvante pode provocar uma resposta inespecífica. Haddad *et al.* (2002), afirmam que o estresse pode agir como

LPS, cujas moléculas mediadoras seriam IL-1 e TNF- $\alpha$ . Baseado nestas informações, é provável que os linfonodos tenham se tornado reativos após uso de adjuvante.

Segundo Camacho *et al.* (1998), os CGs com distinção entre zonas clara e escura, somente são observados duas semanas após uma imunização, o que é devido a uma seleção por afinidade e hipermutação de células B dentro da rede de FDCs, localizadas na zona clara. Aos cinco dias após a segunda imunização, verificou-se a presença de CGs de contornos bem definidos, com presença de células com pouco citoplasma e núcleos de cromatina densa, sugerindo mitose, discordando de Camacho *et al.* (1998).

A interação entre células B e células T-auxiliares, após reconhecimento de antígeno, foi recentemente visualizada em tempo real (OKADA & CYSTER, 2006). As células B possuem grande mobilidade até mesmo após conjugadas com células T. Ao contrário, as células T perdem a mobilidade após formação do conjugado com as células B. A formação do conjugado Células B-T parece ser responsiva a quimiocinas e é necessária para ativação da resposta de memória.

Avaliando-se a cinética dos CGs dos linfonodos, observou-se que sete dias após a primeira inoculação, os CGs formados apresentaram grande densidade de células de característica basal acidófila, correspondente à zona escura e uma área central mais clara.

Ao contrário das observações de Freitas (2001), não se verificou uma inversão entre zonas clara e escura após a segunda inoculação. A área central foi adquirindo proporções maiores com o decorrer do tempo da imunização, apresentando menor densidade celular. Provavelmente, isto se deve à mobilidade de células B, sofrendo hipermutação na tentativa de promover uma resposta humoral (CAMACHO *et al.* 1998; OKADA & CYSTER, 2006).

A hiperplasia dos cordões medulares verificada após a segunda imunização está de acordo com as observações de Lui *et al.* (1997), demonstrando que as células B de memória são capazes de originar reações plasmocitárias extrafoliculares após uma nova estimulação antigênica. Este fato se deve à diferenciação terminal das células B de memória em plasmócitos. As Células B de memória, se comparadas às células B “naive”, são mais eficientes. Originam de cinco a oito vezes mais plasmócitos e secretam de três a quatro vezes mais imunoglobulinas.

Segundo Brown *et al.* (2006), as imunoglobulinas são importantes no controle da babesiose em função da sua capacidade opsonizante. Os altos níveis de IgG anti-

SBbo23290 encontrados por Benavides (2006) nos animais vacinados sugerem estimulação de clones de linfócitos B, com conseqüente formação de células de memória.

Histologicamente, estes dados são confirmados pelo aumento da zona clara nos CGs e evidente hiperplasia de cordões medulares nos animais dos grupos Duas Vacinas e Polivalente (figuras 6B e 6C).

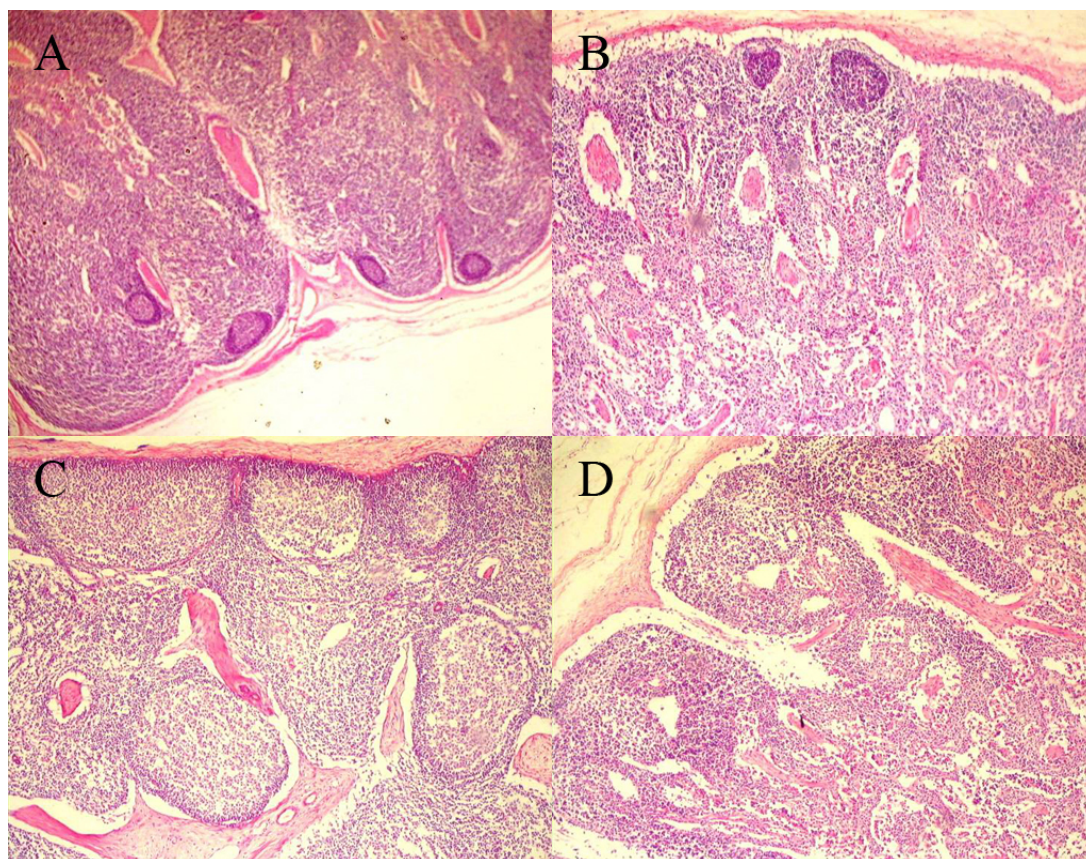


Figura 6 – Linfonodos bovinos imunizados com peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462. A: Grupo Controle (animais inoculados com água). Presença de pouca reatividade, com poucos e pequenos CGs. B: Grupo Duas Vacinas (que recebeu a inoculação dos dois peptídeos em locais diferentes) aos 7 dias após primeira imunização. C: Grupo Polivalente (recebeu os dois peptídeos em uma única inoculação), aos 15 dias após segunda imunização. D: Grupo Polivalente, aos 12 dias após terceira imunização. Coloração H&E, 100X.

Aos cinco dias após a terceira inoculação, a reatividade dos linfonodos começou a apresentar declínio, com presença de um menor número de CGs em relação às duas primeiras inoculações.

Nos linfonodos analisados ao sétimo dia após o desafio, ainda persistia um menor número de CGs, porém, estes encontravam-se com maior densidade celular quando comparados àqueles após a terceira inoculação. Estes dados sugerem que houve formação de células de memória, fazendo com que a reatividade das zonas de células T e B fosse menor em relação às observadas após a primeira e segunda inoculações dos peptídeos e posterior ao desafio.

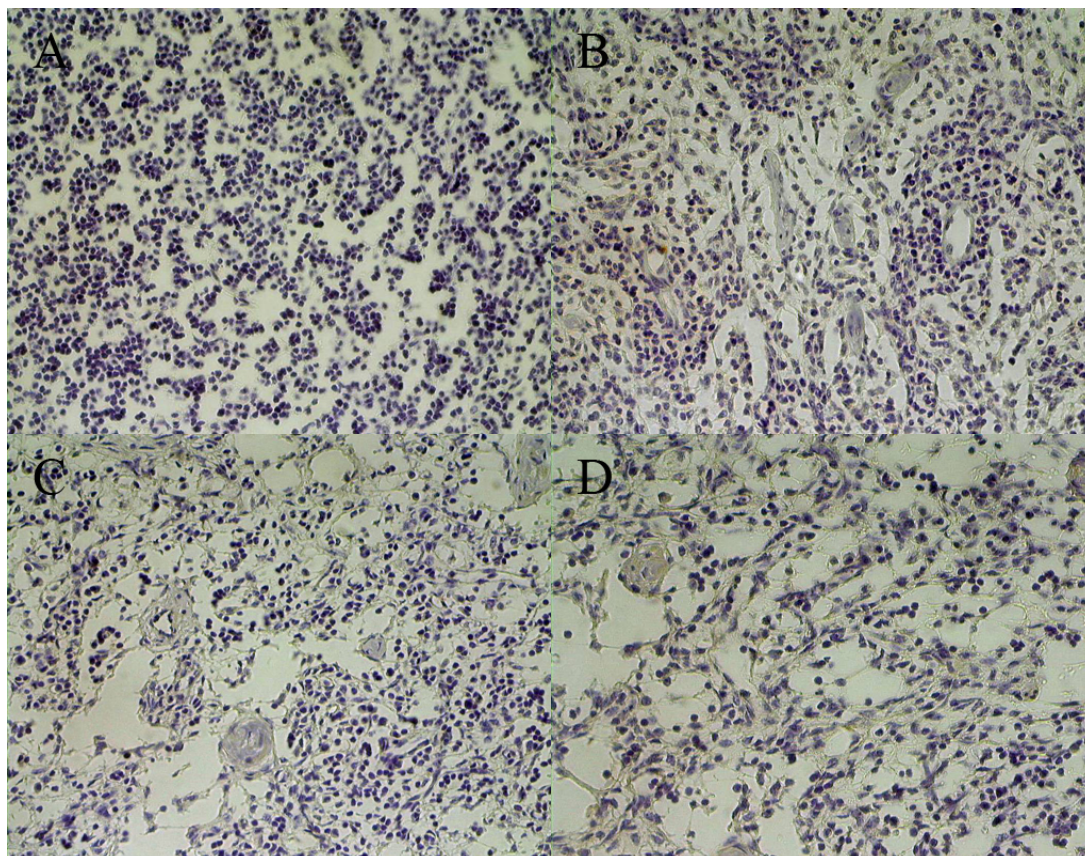
Bousso & Kourilsky (1999), citados por Freitas (2001), afirmam que células antígeno-específicas são mais rápidas e eficientes ao responderem a novos desafios antigênicos. Isto sugere que os imunógenos utilizados foram capazes de evocar uma resposta de memória.

### 5.3 - Expressão de proteínas do choque térmico

A expressão de proteínas do estresse nos linfonodos bovinos, pela técnica imunoperoxidase, apresentou discreta imunomarcacão. A HSP90 apresentou imunomarcacão mais evidente quando comparada à HSP70 em praticamente todas as fases do experimento como pode ser visto na figura 7.

As HSPs são encontradas em todas as células vivas (MEYER & SILVA, 1999; MEHTA *et al.*, 2005). Segundo Pockley (2003), são expressas constitutivamente, ou seja, 5 a 10 % destas já estão presentes em uma célula em condições de crescimento saudável.

A expressão de HSPs pode ocorrer independente de um dano físico direto. O estresse psicológico como manejo, atordoamento ou aquele provocado por exoantígenos como parasitas, seriam suficientes para que houvesse manifestação do efeito citoprotetor. O local de expressão destas proteínas seria, inicialmente, o local de fixação ou porta de entrada da infecção, que posteriormente levaria a uma lesão tecidual. As HSPs minimizariam o dano provocado pela agressão, através do mecanismo de liberação de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a resposta inflamatória (SEGAL *et al.*, 2006).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7 – Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunoistoquímica imunoperoxidase para expressão de HSP70 e HSP90. A: HSP70 em animal do grupo Polivalente, 7 dias após primeira imunização com peptídeos sintéticos, região medular. B: HSP90 no mesmo animal, região medular. C: HSP70 em animal do grupo Polivalente 7 dias após segunda imunização, região cortical. D: HSP90 no mesmo animal, também na região cortical. 100X.

As HSPs aumentam no local de uma injúria agindo como protetoras celulares contra uma lesão celular (MEYER & SILVA, 1999; SEGAL *et al.*, 2006). Buscou-se, através dos imunógenos SBbo23290 e SBm7462, um estímulo para expressão de HSPs. O tecido linfóide analisado mostrou-se reativo conforme já descrito histologicamente.

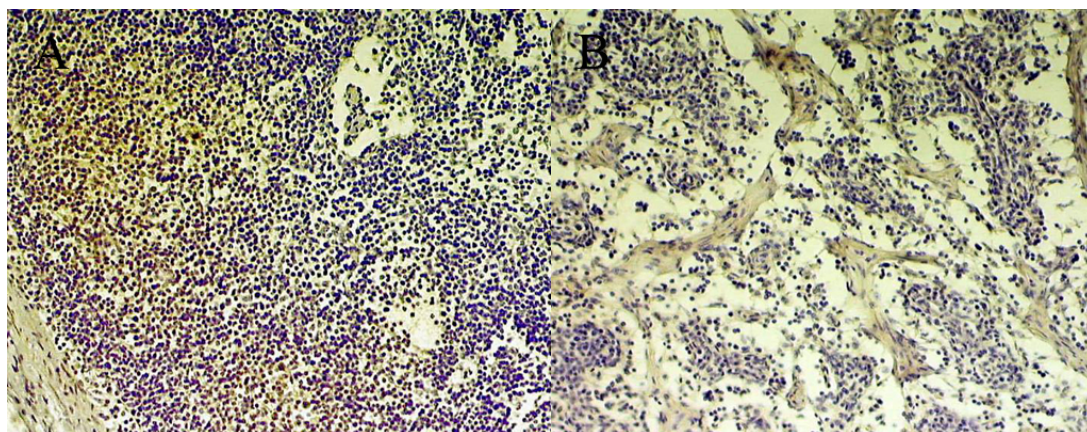
Níveis de expressão de HSP70 e HSP90 podem servir como biomarcadores da saúde de um tecido ou população celular (ROBERT, 2003). Importante compreender qual tecido pode ser eleito para coleta de amostras. Em ruminantes, não existe um local pré-determinado para avaliação destas proteínas.

Semanalmente, os animais foram manuseados para venopunção da jugular, exame clínico e mensuração de temperatura retal. O fator mais estressante a que se

submeteram foram as cirurgias dos linfonodos pré-escapulares, que tinham a duração média de 60 minutos, incluindo a contenção, anestesia, cuidados pré e pós cirúrgicos.

Segundo Meyer & Santos (1999), o tempo necessário para expressão de HSPs nas células é em torno de 18 horas após o estímulo. A cirurgia, principal agente estressante, não foi suficiente para alteração dos níveis basais destas proteínas no tecido linfóide em questão.

Nas lâminas analisadas, a expressão de HSP90 se estendeu por uma área maior nos cortes histológicos, quando comparada à HSP70. A HSP90 expressou-se mais na região medular e, às vezes, na paracortical. Já a HSP70 apresentou marcação mais evidente na região paracortical, sempre atingindo uma área menor do corte (figura 8).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8 – Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica imunoperoxidase para expressão de HSP70 e HSP90. A: HSP90 apresentando imunomarcação na região medular. B: HSP70 com imunomarcação na paracortical. 100X

O comportamento bovino apresenta particularidades em relação a outras espécies, principalmente no que diz respeito à grande capacidade de adaptação. Os animais do experimento foram mantidos em condições de isolamento, desde os primeiros dias de vida, sugerindo que eles se adaptaram à manipulação humana.

Admitindo que eles se adaptaram às condições de ambiente e tratamento, a avaliação de HSP70 e HSP90, como marcadores de estresse nos animais deste experimento, não pôde ser confirmada, pela ausência de estímulo estressante direto.

Entretanto, acredita-se que os níveis basais destas proteínas encontrados promoveram citoproteção nestes animais, quando desafiados por carrapatos e pela *B. bovis*.

Os animais de todos os grupos não apresentaram sinais de doença evidente. O pico febril foi dentro de temperaturas consideradas não lesivas ao organismo e houve controle da doença, mesmo nos animais não vacinados, o que, em momento algum, invalida a eficiência desta vacina.

Paralelamente, estas proteínas do estresse podem agir como apresentadoras de antígenos. De acordo com Segal *et al.* (2006) o mecanismo utilizado pelas células apresentadoras de antígeno para o transporte de peptídeos são as HSPs. Hickman-Miller *et al.* (2004) identificaram em torno de 25 peptídeos derivados de HSP, confirmando a hipótese do transporte e apresentação de peptídeos pelas HSPs.

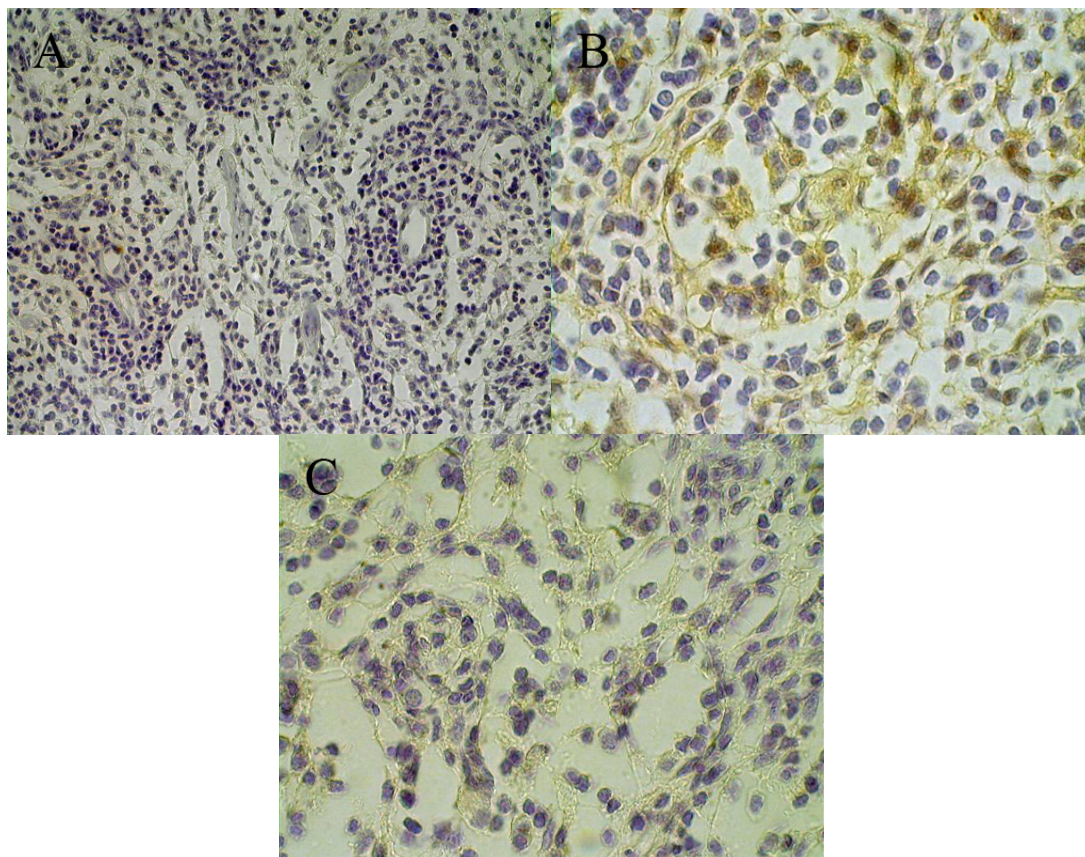
Peptídeos isolados podem não promover uma resposta imune efetiva. Por isso, a importância da formação de complexos estáveis, capazes de promover imunização. A habilidade das HSPs em formar complexos com peptídeos pode ser um caminho para gerar uma efetiva vacina baseada em peptídeos (LI, 2004).

A imunomarcação das proteínas do estresse verificada nos linfonodos após as inoculações, coincide com os períodos de melhor visualização da expressão imunoistoquímica dos peptídeos. Isto sugere a ocorrência de formação dos complexos HSP-peptídeo, que promoveriam uma melhor apresentação do antígeno (figura 9). As proteínas de choque térmico, provavelmente, agiram como “chaperonas”, auxiliando as células no reconhecimento dos antígenos e na formação resposta imunológica.

#### 5.4 – Imunoistoquímica dos peptídeos sintéticos

Os animais dos grupos Duas Vacinas e Polivalente apresentaram comportamento semelhante em relação à imunomarcação dos peptídeos SBm7462 e Sbbo23290. Aos sete dias após a primeira inoculação dos peptídeos, foi possível verificar células marcadas nos CGs e na região paracortical (figuras 9B e 9C).

Algumas células PAP positivas apresentaram prolongamentos citoplasmáticos, sugerindo tratar-se de células dendríticas. Outras células apresentaram citoplasma mais escasso semelhante a células linfocíticas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Castro (2005), que utilizou a mesma técnica para avaliação do peptídeo SBbo23290, e observou células imunomarcadas aos cinco dias após a primeira imunização.



Fonte: Dados da pesquisa.

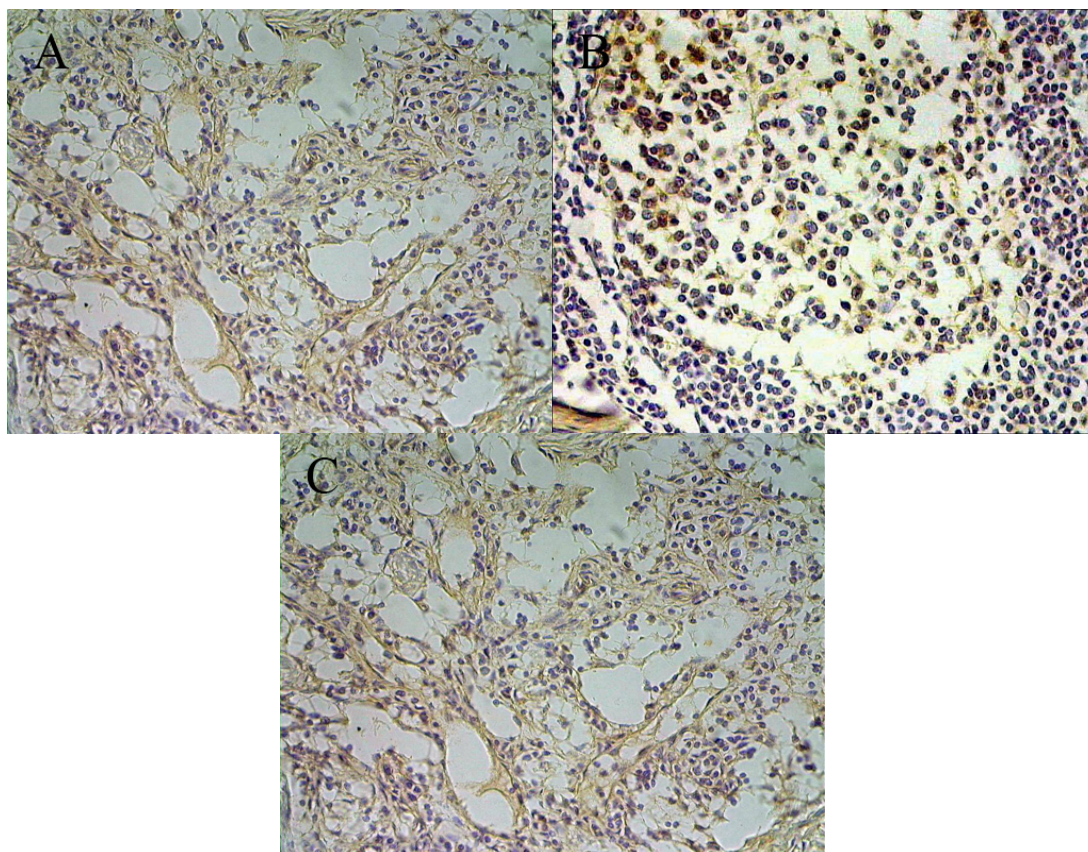
Figura 9 - Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica 7 dias após a primeira imunização. A: Expressão de HSP90 na região medular. B: Expressão de SBB0 23290. C: Expressão de SBm762. 400X.

A presença de DCs imunomarcadas pôde ser verificada nos cortes histológicos dos animais imunizados nos diferentes tempos de coleta. Segundo Abbas *et al.* (2003) sua função é o transporte de antígenos protéicos, via linfa, até o linfonodo, sugerindo sua competência na apresentação dos peptídeos às células T (HOWARD *et al.*, 1999).

Aos quinze dias após a segunda imunização, encontraram-se cordões medulares imunomarcados com presença de DCs, macrófagos e plasmócitos no corte histológico do grupo Polivalente. Os CGs apresentaram imunomarcção menos evidente em relação à região medular.

A partir da terceira imunização e após o desafio, as células PAP marcadas mantiveram-se mais na região medular, uma vez que os CGs encontravam-se em menor número. Estes eventos estão de acordo com Freitas (2001) e Castro (2005), sugerindo uma resposta de memória antígeno-específica.

A localização da imunomarcação para os peptídeos sintéticos coincide com a imunomarcação das proteínas de estresse quando se compararam os mesmos cortes histológicos, dos mesmos animais, dentro dos mesmos tempos de experimentação. A expressão da HSP90 acompanha a imunomarcação dos peptídeos SBbo23290 e SBm7462 (figuras 9 e 10).



Fonte: Dados da pesquisa

Figuras 10 - Linfonodos bovinos submetidos à técnica imunohistoquímica 15 dias após a segunda imunização. A: Expressão de HSP90 na região medular. B: Expressão de SBBo 23290. C: Expressão de SBm7462. 100X.

De acordo com Li (2004), os peptídeos “chaperonados” pelas HSPs favorecem a apresentação deste complexo ao sistema imune pelas moléculas MHC. Os principais alelos do MHC classe I apresentam ligantes de HSP para inspeção imune. Estes ligantes podem ser de diferentes HSPs, porém, a HSP90 possui, em média, oito peptídeos ligantes cada uma tornando-as mais aptas a apresentá-los ao sistema imune (HICKMAN-MILLER & HILDEBRAND, 2004).

As HSPs possuem habilidade para acompanhar peptídeos exógenos e introduzi-los via endógena, gerando uma potente resposta CD8+ restrita ao MHC classe I. Qazi et al. (2005), afirmam que a capacidade destas proteínas do estresse em formar complexos peptídeos-HSP, torna possível elucidar uma resposta MHC classe II antígeno específica, restrita a CD4+.

BROWN *et al.* (2006) confirma a importância da resposta de células T CD4+ na imunidade contra *Babesia spp.* atuando como ligação entre a resposta imune inata e a resposta antígeno-específica. Estas informações somadas sugerem que a capacidade imunoestimulante das HSPs pode ser utilizada para o desenvolvimento de vacinas, podendo atuar como adjuvantes (LI, 2004; QAZI *et al.*, 2005).

Devido à coincidência entre a localização da imunomarcagem para os peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 com a imunomarcagem das HSP70 e HSP90 encontradas nos cortes histológicos, acredita-se que houve um sinergismo destes no mecanismo de proteção dos animais desafiados pelo carrapato *R. (B.) microplus* e pela *B. bovis*.

#### 5.5 - Parâmetros bioquímicos:

Os parâmetros bioquímicos foram analisados, objetivando avaliar o estado de saúde dos animais e compará-los nas etapas do experimento. Os resultados encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3 e na figura 10.

As HSPs se apresentaram, durante o experimento, de forma basal. Desta forma, não foi possível fazer correlações entre os valores encontrados para glicose, lactato, haptoglobina e proteína C reativa com a expressão das proteínas de choque térmico.

##### 5.5.1 – Glicose

A glicose é importante no metabolismo energético dos bovinos. Seus níveis fisiológicos variam de 45 a 75 mg/dL, podendo alterar em função de um estado patológico (KANEKO *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Análise de variância dos parâmetros bioquímicos dos bezerros

| Fator variação | GL | Glicose    |                      | Lactato |                     | Proteína C Reativa (PCR) |                     |
|----------------|----|------------|----------------------|---------|---------------------|--------------------------|---------------------|
|                |    | QM         | F                    | QM      | F                   | QM                       | F                   |
| Grupo          | 3  | 56,381863  | 1,530 <sup>ns</sup>  | 0,42959 | 1,563 <sup>ns</sup> | 1,23548                  | 6,538 <sup>**</sup> |
| Tempo          | 16 | 374,605781 | 10,167 <sup>**</sup> | 0,68701 | 2,499 <sup>**</sup> | 1,65821                  | 8,775 <sup>**</sup> |
| Grupo*Tempo    | 48 | 36,018790  | 0,978 <sup>ns</sup>  | 0,30317 | 1,103 <sup>ns</sup> | 0,13534                  | 0,716 <sup>ns</sup> |
| CV %           |    | 9,09       |                      | 28,15   |                     | 48,89                    |                     |
| Média          |    | 66,750000  |                      | 1,86272 |                     | 0,889081                 |                     |

Fonte: Dados da pesquisa

ns – não significativo; \* - significativo ao nível de 5,0%; \*\* - significativo ao nível de 1,0%

Conforme a tabela 1, o valor médio de glicose analisado nos animais foi de 66,75 mg/dL, com um coeficiente de variação de 9,09%, dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie (KANEKO *et al.*, 1997). Ao analisar o teste F, observa-se que entre os grupos não houve diferença estatística, ao nível de 5,0%, para glicose. Os dados dos grupos Controle, Adjuvante, Duas Vacinas e Polivalente, quando analisados pelo teste comparativo de Tukey, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5,0%, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Análises dos parâmetros bioquímicos entre os grupos, pelo teste comparativo de Tukey

|              | Glicose                | Lactato               | Proteína C Reativa (PCR) |
|--------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Controle     | 67,429412 <sup>a</sup> | 1,947500 <sup>a</sup> | 0,778235 <sup>a</sup>    |
| Adjuvante    | 67,597059 <sup>a</sup> | 1,764412 <sup>a</sup> | 1,071471 <sup>b</sup>    |
| Duas vacinas | 65,719118 <sup>a</sup> | 1,901176 <sup>a</sup> | 0,796765 <sup>a</sup>    |
| Polivalente  | 66,254412 <sup>a</sup> | 1,837794 <sup>a</sup> | 0,909853 <sup>ab</sup>   |

Fonte: Dados da pesquisa

Letras diferentes na coluna indicam que as médias são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5,0%.

Houve diferença significativa, ao nível de 1,0%, quando foi considerada a variável tempo, mostrando que existiu mudança nos níveis de glicose ao longo do experimento, que coincidiu com os procedimentos de imunização e desafio (tabela 3 e figura 11).

As imunizações aconteceram, respectivamente, nos dias treze de março, doze de abril, doze de maio e os desafios em doze de junho com carrapatos e dezoito de junho com *B. bovis*. Os valores de glicose mostraram-se elevados na coleta subsequente a estes procedimentos.

Observa-se que os níveis de glicose encontrados após cada procedimento, foram estatisticamente diferentes, ao nível de 5,0%, em relação às amostras anteriores. Houve uma variação de 65,05625 para 68,98125 mg/dL, de 61,53750 para 74,98750 mg/dL, de 66,58125 para 77,81875 mg/dL e de 63,25000 para 72,18750 mg/dL, após a primeira, segunda, terceira imunizações e após os desafios, respectivamente.

Esta tendência pode ser visualizada na figura 11. Observa-se que as curvas para os diferentes grupos apresentaram a mesma tendência, com picos nos níveis de glicose também coincidentes com os procedimentos já descritos.

Os grupos Controle e Adjuvante receberam água e saponina, respectivamente. Os demais grupos receberam imunização com os peptídeos sintéticos. Desta forma, as mudanças nos níveis de glicose devem ser provenientes do estresse de manejo e não das imunizações. Segundo Kerr (2003), uma elevação nos valores de glicose pode ser esperada após episódios de estresse, estimulada por glicocorticoide e adrenalina.

Ressalta-se que, embora os resultados sejam estatisticamente diferentes, eles estão dentro dos padrões normais para a espécie (KANEKO *et al.*, 1997).

#### 5.5.2 – Lactato

A concentração de lactato no plasma pode indicar o grau de intensidade de um processo de doença. Isto pode estar relacionado a uma alteração no balanço entre o metabolismo anaeróbico e aeróbico e também por um desequilíbrio na relação entre produção e liberação de lactato (COGHE *et al.*, 2000).

Conforme a tabela 1, o valor médio de lactato encontrado nos animais foi de 1,86 mmol/L, com um coeficiente de variação de 28,15%. Observa-se uma maior dispersão dos dados, o que está de acordo com os parâmetros considerados normais para a espécie bovina.

Ao analisar o teste F, observa-se que entre os grupos também não houve diferença estatística, ao nível de 5,0%, para lactato. Os dados dos grupos Controle,

Adjuvante, Duas Vacinas e Polivalente, também não apresentaram diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5,0% (tabela 2).

Tabela 3 - Análises dos parâmetros bioquímicos ao longo do tempo, pelo teste comparativo de Scott Knott

| Data      | Glicose               | Lactato              | Proteína C Reativa (PCR) |
|-----------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| 10/03/06  | 65,05625 <sup>b</sup> | 1,71813 <sup>a</sup> | 1,01875 <sup>b</sup>     |
| 27/3/2006 | 68,98125 <sup>c</sup> | 2,06250 <sup>b</sup> | 1,08750 <sup>c</sup>     |
| 03/04/06  | 66,30000 <sup>b</sup> | 1,77875 <sup>a</sup> | 1,13063 <sup>c</sup>     |
| 10/04/06  | 61,53750 <sup>a</sup> | 1,85563 <sup>a</sup> | 0,94813 <sup>b</sup>     |
| 17/04/06  | 74,98750 <sup>d</sup> | 1,73250 <sup>a</sup> | 1,38938 <sup>c</sup>     |
| 24/04/06  | 64,85000 <sup>b</sup> | 1,76438 <sup>a</sup> | 0,46438 <sup>a</sup>     |
| 01/05/06  | 61,13750 <sup>a</sup> | 1,80125 <sup>a</sup> | 0,72375 <sup>b</sup>     |
| 08/05/06  | 66,58125 <sup>b</sup> | 1,67250 <sup>a</sup> | 0,87563 <sup>b</sup>     |
| 15/05/06  | 77,81875 <sup>d</sup> | 2,42688 <sup>b</sup> | 1,13000 <sup>c</sup>     |
| 20/05/06  | 66,84375 <sup>b</sup> | 1,80750 <sup>a</sup> | 1,15375 <sup>c</sup>     |
| 29/05/06  | 70,18750 <sup>c</sup> | 1,72188 <sup>a</sup> | 0,22125 <sup>a</sup>     |
| 05/06/06  | 67,70625 <sup>b</sup> | 1,86188 <sup>a</sup> | 0,95250 <sup>b</sup>     |
| 12/06/06  | 63,25000 <sup>a</sup> | 1,95438 <sup>a</sup> | 0,22250 <sup>a</sup>     |
| 19/06/06  | 72,18750 <sup>c</sup> | 2,25250 <sup>b</sup> | 0,76813 <sup>b</sup>     |
| 26/06/06  | 64,32500 <sup>b</sup> | 1,84688 <sup>a</sup> | 1,01188 <sup>b</sup>     |
| 03/07/06  | 61,68125 <sup>a</sup> | 1,68688 <sup>a</sup> | 0,98063 <sup>b</sup>     |
| 10/07/06  | 61,41875 <sup>a</sup> | 1,72188 <sup>a</sup> | 1,03563 <sup>b</sup>     |

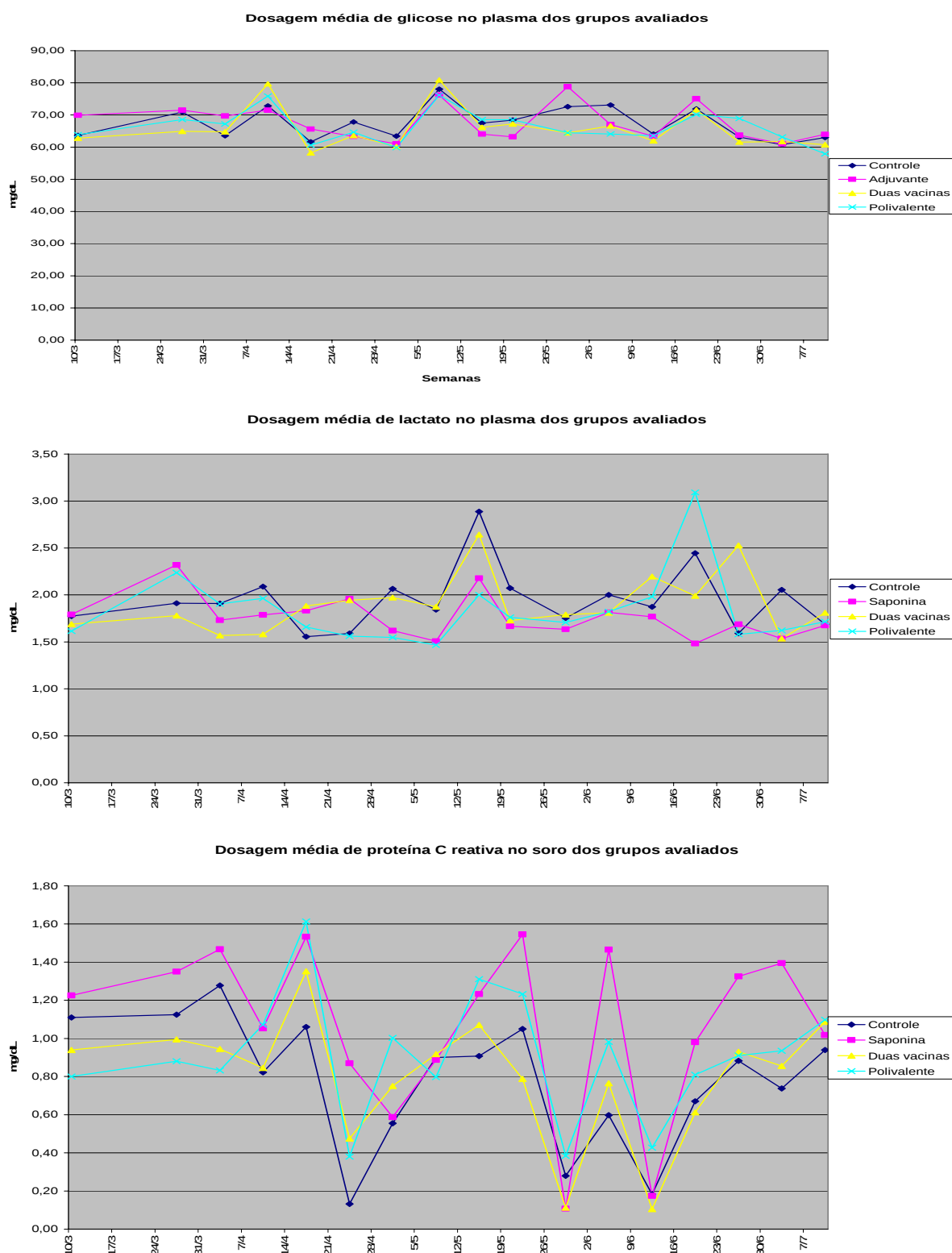
Fonte: Dados da pesquisa

Letras diferentes na coluna indicam que as médias são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5,0%.

Houve mudanças nos níveis de lactato ao longo do experimento, apresentando uma diferença significativa, ao nível de 1,0%, observado no fator de variação tempo. Conforme observado na tabela 3 e figura 11, as mudanças ocorreram justamente após os procedimentos de imunização e desafio.

Observa-se que após a primeira e terceira imunizações e após o desafio, as taxas de lactato foram estatisticamente diferentes das demais, ao nível de 5,0%, porém, não foram diferentes entre si. Houve um aumento nos valores de lactato para

2,06250, 2,42688 e 2,25250 mmol/L, de acordo com os períodos referidos, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 11 – Dosagens de parâmetros bioquímicos médios nos grupos avaliados ao longo do tempo.

Estas alterações estão evidenciadas na figura 11, onde se observam picos nas curvas para todos os quatro grupos após as intervenções, lembrando que não há diferença significativa entre os mesmos. Os níveis de lactato, estatisticamente, sempre se mantiveram, ao longo do tempo, dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie, que variam de 0,56 a 2,22 mmol/L (KANEKO *et al.*, 1997).

Allison *et al.*, (2006), referem-se aos valores normais de lactato entre 0,29 a 1,83 mmol/L. Segundo Coghe *et al.* (2000), a distribuição do lactato no soro difere entre espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie. Níveis de lactato acima de 4,0 mmol/L indicam alto grau de severidade do estado do indivíduo, com possível óbito entre 24 e 48 horas. Cinco amostras de lactato apresentaram valores superiores a 4,0 mmol/L, e os respectivos animais não apresentaram alteração comportamental condizente com sinais de doença.

Ao confrontar os valores obtidos para lactato nas amostras com os parâmetros citados por Kaneko *et al.* (1997), os valores se encontram dentro da normalidade. Quando os mesmos são comparados com os valores de Allison *et al.* (2006), em média, os animais apresentaram uma hiperlactemia.

Devido à dispersão das taxas de lactato encontradas, as divergências entre os valores fisiológicos e o estado geral dos animais, não foi possível correlacionar este parâmetro com o estresse ou indício de doença.

#### 5.5.3 – Proteínas de fase aguda (APPs)

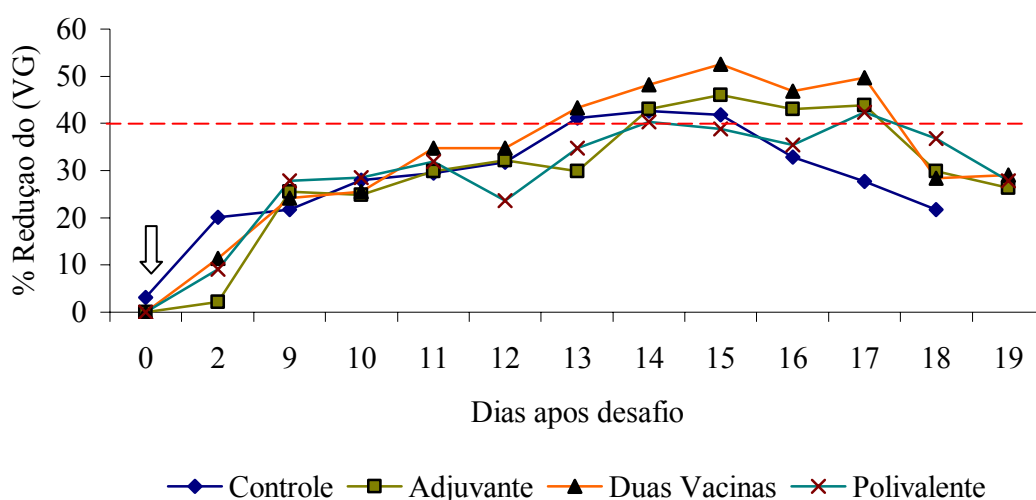
A primeira reação do corpo é inata e uma resposta não específica precede uma reação imune específica. Uma APR é uma reação sistêmica do organismo a um distúrbio na homeostase local ou sistêmica, causada por infecção, injúria, trauma ou cirurgia, crescimento neoplásico ou outra desordem imunológica (GRUYS *et al.*, 2005b).

Aumentos séricos nos níveis de citocinas e proteínas de fase aguda (APPs) ocorrem até mesmo antes de alterações comportamentais e fisiológicas, servindo como indicadores da presença de doenças infecciosas e como parâmetros da severidade e capacidade do organismo de resolver a infecção (OLFERT & GODSON, 2000).

### 5.5.3.1 – Haptoglobina (Hp)

A haptoglobina é considerada a principal APP em bovinos e pode aumentar rapidamente como consequência de uma infecção microbiana ou inflamação. Segundo Ramirez *et al.* (2002), apenas 0,6% dos bovinos saudáveis apresentam níveis detectáveis de haptoglobina.

Nenhuma amostra analisada apresentou níveis detectáveis desta proteína, através da metodologia utilizada, onde o nível mínimo mensurado foi de 5,83 mg/dL, confirmando a suposição de que se mantiveram saudáveis durante todo o experimento. Desta forma, não há como explicar se houve diferença entre os grupos e ao longo do tempo.



Fonte: Adaptado de BENAVIDES, 2006.

Figura 12 - Porcentagem (%) de redução do VG após desafio. A seta indica o desafio com *Babesia bovis*.

De acordo com Benavides (2006), os animais apresentaram percentagens de redução do volume globular acima de 40% após o desafio com *B. bovis*, conforme figura 12. A concentração plasmática de Hp pode sofrer influências além da APR. Nos bovinos, esta proteína desaparece da circulação durante uma crise hemolítica aguda de babesiose. Os níveis não detectados da Hp podem estar correlacionados com este fato (PETERSON, 2004).

Segundo Slocombe & Colditz (2005), os níveis de Hp permanecem elevados na circulação durante 2 a 4 dias após uma APR. Os intervalos entre as coletas de

sangue dos animais foram de 7 dias, o que pode ter impedido de mensurá-las durante seu pico.

A principal função das Hp é transportar o complexo haptoglobina-hemoglobina ao fígado. Em função disto, durante uma hemólise vascular os níveis de Hp tendem a diminuir independentemente de haver uma APR (PUÖRÄLÄ, 2000).

Os animais dos grupos Controle e Adjuvante apresentaram parasitemia com duração de 6 e 5 dias, respectivamente (BENAVIDES, 2006). A presença do hemoparasita *B. bovis* na circulação destes animais pode ter ocasionado hemólise, contribuindo para diminuição dos níveis de Hp.

#### 5.5.3.2 – Proteína C-reativa (PCR)

Durante os estágios iniciais de infecção, as concentrações plasmáticas de PCR aumentam e este aumento tem sido descrito antes de uma elevação da temperatura retal ser observada. Entretanto, esta proteína não tem sido considerada uma proteína de fase aguda em bovinos (PETERSEN *et al.*, 2004). Segundo Kent (1992), a PCR pode estar presente em bovinos saudáveis, podendo não apresentar aumento marcante durante uma APR.

Nos soros analisados, o nível médio de PCR foi 0,889081 mg/dL, com um coeficiente de variação de 48,89%, indicando uma elevada dispersão dos dados. O teste *F* mostrou que houve diferenças, estatisticamente significativas, ao nível de 1,0%, entre os grupos e no tempo, conforme tabela 1.

Entretanto, ao se compararem as médias dos valores de PCR através do teste de Tukey, o resultado apresentou ambigüidades, ou seja, as médias dos grupos Controle, Duas Vacinas e Polivalente não são estatisticamente diferentes. O grupo Adjuvante, estatisticamente, é diferente dos dois primeiros, porém, é igual ao Polivalente (Tabela 2).

Na tabela 3, observa-se que, ao longo do tempo, encontram-se médias estatisticamente diferentes, ao nível de 5,% de significância. Mais uma vez, os resultados foram maiores na semana seguinte aos procedimentos de inoculação e ou desafio e se apresentaram diferentes, estatisticamente. Após as três inoculações, os resultados encontrados não foram estatisticamente diferentes entre si, porém, o foram após o desafio.

Não se encontrou uma padronização nos valores de PCR para a espécie bovina. Lee *et al.* (2003), citam que os níveis de PCR em bovinos podem aumentar em até dez vezes durante um processo infeccioso, porém, no presente trabalho, não apresentaram quais seriam os níveis normais.

As alterações nos níveis de PCR podem ser observadas na figura 11. Os níveis desta proteína apresentaram a mesma tendência para os quatro grupos de tratamento, seguindo as intervenções de inoculações e desafios.

Para Petersen *et al.* (2004), a padronização das análises de APPs é necessária, antes que elas possam ser aplicadas para monitoramento sistemático da saúde em medicina veterinária.

Após episódios de vacinações, uma reação de fase aguda pode ser desenvolvida. Isto parece limitar as vantagens das vacinas, principalmente porque as respostas de fase aguda são conhecidas por ser contraprodutivas em função do anabolismo muscular promovido pelas APPs (GRUYS *et al.*, 2005).

Os animais dos grupos Controle, Duas Vacinas e Polivalente não apresentaram diferenças estatisticamente para PCR e não houve detecção de valores para Hp. Baseado nisso, pode-se inferir que não ocorreu uma resposta de fase aguda para estes grupos, o que pode favorecer a eficiência protetora dos peptídeos inoculados. Com relação ao perfil de resposta de APPs nos animais do grupo Controle, acredita-se que o comportamento seja o mesmo, sem expressão de uma resposta de fase aguda, estando saudáveis e aptos a responder ao desafio.

## **6 – CONCLUSÕES**

Em virtude dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- 1 - Os bovinos se adaptaram às condições do ambiente e de manejo, mostrando-se saudáveis durante todo o experimento;
- 2 - Os linfonodos coletados apresentaram reatividade consistente com a produção de uma resposta imune;
- 3 - Os bovinos imunizados com os peptídeos Sbbo23290 e SBm7462 apresentaram maior reatividade macroscópica e microscópica nos linfonodos;
- 4 - Houve expressão basal de HSP70 e HSP90 nos linfonodos analisados por meio da técnica imunohistoquímica, com melhor expressão da HSP90, cuja imunomarcação esteve mais evidente na região medular;
- 5 - As células dos linfonodos dos animais imunizados apresentaram imunomarcação para os peptídeos SBbo23290 e SBm7462;
- 6 - A localização da expressão dos peptídeos Sbbo23290 e SBm7462 e da HSP90 ocorreu no mesmo sítio anatômico nos linfonodos analisados;
- 7 - Os animais dos quatro grupos apresentaram comportamento semelhante quanto às variáveis bioquímicas analisadas e os valores mantiveram-se dentro dos limites considerados normais;
- 8 - Não foi possível estabelecer correlações entre os parâmetros bioquímicos dos bovinos e a expressão de proteínas do estresse.

## **7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os animais adaptaram-se às condições de confinamento e manejo, o que minimiza a possibilidade de estresse. O fato de não ter ocorrido lesão celular no órgão linfóide coletado, dificultou a expressão das proteínas do estresse neste tecido.

No entanto, os níveis basais de expressão de HSP70 e HSP90 nos linfonodos e a presença dos peptídeos Sbbo23290 e SBm7462 nos mesmos sítios anatômicos que a HSP90, sugerem que ocorreu um sinergismo entre os mesmos.

De acordo com a literatura, as HSPs “chaperonam” peptídeos, formando complexos HSP-peptídeos, favorecendo a apresentação às moléculas MHC. É provável que a HSP90 cumpriu este papel em relação aos peptídeos sintéticos utilizados nesta pesquisa. Portanto, tornam-se necessárias novas pesquisas sobre a possibilidade da utilização das proteínas do choque térmico em vacinas de peptídeos.

As proteínas de fase aguda pesquisadas, devido à inconsistência dos valores encontrados para bovinos, suscitam novos trabalhos para sua melhor utilização como parâmetro de saúde ou doença.

Persiste a incógnita de até que ponto se pode manipular a resposta imune em favor do bem estar do hospedeiro. O limiar da indução das HSPs entre a promoção da saúde e o dano ao organismo suscita novas pesquisas em prol do uso clínico, como vacinas ou terapêutica, visando a saúde animal e do homem.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. Editora Revinter Ltda. 4ª. edição. p.544. 2003.

ALLISON, G.C.; HORTON, R.A.; REES STEVENS, P.; JACKMAN, R.; MOORBY, J.M. Changes in plasma metabolites and glycogen are correlated to bovine spongiform encephalopathy in infected dairy cattle. **Research in Veterinary Science**. Disponível em: < <http://www.elsevier.com/locate/rvsc> > Acesso em 28 de Janeiro de 2007.

BASU, S.; MATSUTAKE, T. Heat shock protein-antigen presenting cell interactions. **Methods**. v.32. p.38-41. 2004.

BENAVIDES, J.A.M. **Avaliação dos peptídeos sintéticos SBbo 23290 e SBm 7462 na forma monovalente e polivalente em bovinos desafiados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI,1887) e Babesia bovis (BABES, 1888 e STARCOVICI, 1888): resposta humoral, parâmetros clínicos e biológicos**. 2006. 129p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.H.; BRANCO, L.G.S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. p. 01-24. 2006.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**. v.16. p.622-653. 2002.

BOGLIOLO, L.. **Patologia geral básica. Agressão. Defesa. Adaptação. Doença**. Editora Guanabara Koogan. 1ª. Edição. p.713. 1978.

BORN, P.; HAPP, M.P.; DALLAS, A.; REARDON, C.; KUBO, R.; SHINNICK, T.; BRENNAN, P.; O'BRIEN, R. Recognition of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  cell function. **Immunology Today**. V.11.p.44-47. 1990.

BROUN, U.; CAMENZIND, D.; WANNER, M.; HAESSING, M. The influence of a fermentation-resistant glucose diet on the glucose concentration and other metabolites in portal and jugular blood in cows. **Journal Veterinary Medicine**. v. 50. p. 8–13. 2003.

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

CAMACHO, S.A.; VILBOIS-KOSCO, M.H.; BEREK, C. The dynamic struture of the germinal center. **Immunology Today**. v.11. p. 1327-1329. 1998.

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

COGHE, J.; UYSTEPRUYST, CH.; BUREAU, J.; ART, T.; LEKEUX, P. Validation and prognostic value of plasma lactate measurement in bovine respiratory disease. **The Veterinary Journal**. V.160. p. 139-146. 2000.

COOKE, B.M.; MOHANDAS, N.; COWMAN, A.F.; COPPEL, R.L.. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Veterinary Parasitology**. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/vetpar>> Acesso em 29 de agosto de 2005.

DEVRIES, E.M.; RAN, L.; KELVIN, D.J. On the edge: the physiological and pathophysiológical role of chemokines during inflammatory and immunological responses. **Seminars in Immunology**. v.11.p.95-104. 1999.

DOBBIN C.A.; SMITH, N.C.; JOHNSON A.M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- $\kappa$ B and nitric oxide. **The Journal of Immunology**. v.169. p.958-965. 2002.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAN, M.A.. Calcium in cell injury and death. **Annual Review Pathology Mechanism Disease**. v.1. p.405-434. 2006.

DRAYTON D.L.; LIAO S.; MOUNZER R.H.; RUDDLE N.H.. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nature Immunology**. v.7.p.344-353. 2006.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue Medicine Veterinary**. v. 151.p.577-584. 2000.

FERNANDES, M.; SILVA, R.; RÖSSLE, S.C.; BISCH, P.M.; RONDINELLI, E.; ÜRMÉNYI, T.P. Gene characterization and predicted protein struture of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. **Gene Section Evolutionary Genomics**. v.394. p.135-142. 2005.

FERREIRA, D. F.; BORGES, L. V. Poder e taxas de erro tipo 1 dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newmankeuls sob distribuições normal e não normais dos resíduos. **Revista de Material Estatístico**. v. 21.n.1.p. 67-83. 2003.

FERRER, E. GONZÁLEZ, L.M.; FOSTER-CUERVAS, M.; CORTÉZ, M.M.; DÁVILA, I.; RODRIGUEZ, M.; SCIUTTO, E.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. *Taenia solium*: characterization of a small heat shock protein (Tsol-sHSP35.6) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. **Experimental Parasitology**. v.101 p.1-11. 2005.

FLESHNER, M.; CAMPISI, J.; AMIRI, L.; DIAMOND, D.M. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. **Psychoneuroendocrinology**. v.29. p. 1142-1152. 2004.

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

FRIER, B.; LOCKE, M.. Preservation of heat stress induced myocardial hsp 72 in aged animals following caloric restriction. **Experimental Gerontology**. v. 13.n.45. p.1-3. 2005.

GELETA, A.R.. Antibody response to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by vaccinated and unvaccinated cattle in an endemic area. Disponível em: <<http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd>>. Acesso em 08 de Agosto de 2005.

GILROY, D.W.. The endogenous control of acute inflammation – from onset to resolution. **Drug Discovery Today: Therapeutic Startegies**. v.1. n. 3. p.313-319. 2004.

GONZÁLEZ, L. C. Z. **Controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm 7462**. 2003. p.74. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M; UPRAGARIN, N.; VAN EDEREN, A.M.; ADEWUYI, A.A.; CANDIAANI, D.; NGUYEN, T.K.A.; SABECKIENE (BALCIUTE), J. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. **Journal of Zhejiang University Science**. v.10. p. 941-947. 2005a.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**. v.11. p. 1045- 1056. 2005b.

GETTY, R. **Sison/Grossman: Anatomia dos animais domésticos**. Editora Interamericana. 5ª edição. Vol.1. p.1134.1981.

GULL, C.A.; TEOH, G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. **Immunology Letters**. v. 94. p.1-10. 2004.

HADDAD, J.J.; SAADÉ, N.E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**. v.133. p.1-19. 2002.

HASDAY, J.D.; SINGH, I.S. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. **Cell Stress & Chaperones**. v.5. p. 471-480. 2000.

HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BEVERIDGE, L.; MATTHEWS, L.R. The welfare of extensively managed dairy cattle: A review. **Applied Animal Behaviour Science**. v.42. p.161-182. 1995.

HERNANDES, R.; FERRO, J.A.; GONZALES, E.; MACARI, M.; BERNAL, F.E.M.; FERRO, M.I.T. Resistência à síndrome ascítica, competência homeotérmica e níveis de HSP 70 no coração e pulmão de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31. n.3. 2002.

HERNANDEZ, M.X.S. **Expressão de moléculas de adesão de *Babesia bovis* (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-SELECTINA E TROMBOSPONDINA) em células endoteliais**. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

HICKMAN-MILLER, H.D.; HILDEBRAND, W.H.. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. **Trends in Immunology**. v. 25. n.8. p.427-433. 2004.

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

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. **Advances in Veterinary Medicine**. v.41. p. 275-288. 1999.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUS, M.L.. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal**. Academic Press. Fifth Edition. P.932. 1997.

KANITZ, E.; TUCHSCHERER, M; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A.; STABENOW, B. Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine and immunological responses. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 18. p. 35-45. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em: 04 de Junho de 2005.

KENT, J. Acute phase proteins their use in veterinary diagnosis (guest editorial). **British Veterinary Journal**. v.148. p.279-282. 1992.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. 2ª. Ed. São Paulo: Editora Roca LTDA. 436p. 2003.

KOLB, L.; GÜRTLER, H.; KETZ, H.-A.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**. Editora Guanabara. 5ª. Ed. 611p. 1987.

LEE, W; HSIAO, H; WU, Y; LEE, Y; FUNG, H; CHEN, H; CHEN, Y; CHU, R. Serum C-reactive protein in dairy herds. **The Canadian Journal of Veterinary Research.** v.67. p. 102-107. 2003.

LI, Z. In vitro resconstitution of heat shock protein- peptide complexes for generating peptide-specific vaccines against cancers and infectious diseases. **Methods.** v. 32. p.25-28. 2004.

LUI, Y-J.; BOUTEILLER, O.; FUGER-VIVIER, I. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. **Current Opinion in Immunology.** v.9. p.256-262. 1997.

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U.; LOPES, M.F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends in Parasitology.** v.17. n.10. 2001.

LYDYARD M.P.; VAN EDEN, W. Heat shock proteins: immunity and immunopathology. **Immunology Today.** v. 11.n. 7.p.228-230. 1990.

MARSLAND, A.L; BACHEN, E.A.; COHEN, S.; RABIN, B.; MANUCK, S.B. Stress, immune reativity and susceptibility to infectious disease. **Physiology & Behavior,** v.77, p. 711-716, 2002.

MASEK, K.; SLÁNSKY, J.; PETROVICKY, P.; HADDEN, J.W. Neuroendocrine immune interactions in health and disease. **International Immunopharmacology.** v.3. p.1235-1246. 2003.

MEHTA, T.A.; GREENMAN, J.; VENKATASUBRAMANIAM, A.; CHETTER, I.C.; McCOLLUM, P.T.. Heat shock proteins in vascular disease – a review. **European Journal Vascular and Endovascular Surgery.** v.29.p.359-402.2005

MEYER, T.N.; DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.45. n. 2. Abr / Jun, 1999.

MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatística agropecuária 1995-2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> .Acesso em 03 de Fev 2007.

MINOWADA, G.; WELCH, W.J. Clinical implications of the stress response. **Journal Clinical Investigation**. v. 95. p.3-12. 1995.

MOINE, P.; ASEHNOUNE, K.; EDOUARD, A.; PAYEN, D. Immunomodulation and sepsis – Impact of the microorganisms. **Reanimation**. v.12. p.182-191. 2003.

MONTENEGRO – JAMES, S. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, Supl. 3, p.27-36, 1992.

MÖSTIL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**. v.23. p.67-74. 2002.

NICCHITA, C.V.; CARRICK, D.M.; BAKER-LEPAIN, J.C. The messenger and the message: gp96 (GPR 94)-peptide interactions in cellular immunity. **Cell Stress & Chaperones**. v.9. n.24. p.325-331. 2004.

NJEMINI, R.; DAMANET, C.; METS, T. Comparason of two ELISAs for determination of HSP70 in serum. **Journal of Immunological Methods**. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/jim>>. Acesso em: 04 de Jun 2005.

NYLÈN, E.S.; ALARIFI, A.A. Humoral markers of severity and prognosis of critical illnes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 15. p.553-573. 2001.

OKADA, T.; CYSTER, J.G. B cell migration and interactions in early phase of antibody responses. **Current Opinion in Immunology**. v. 18. p.1-8.2006.

OLFERT, E.D.; GODSON, D.L. Humane endpoints for infectious disease animal models. **ILAR Journal Online**, v. 41, 2. p. 1-16. 2000.

PARKER, A.J.; HAMLIN, G.P.; COLEMAN, C.J.; FITZPATRICK, A. Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in *Bos indicus* steers. **Animal Growth, Physiology and Reproduction**. 2004.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; FREITAS, C.M.; MACEDO, P.A.; PRATES, A.A.; PORTELA, R.W.; CAETANO, B.C. Mapeamento de epítópos T reativos da proteína B<sub>v</sub>60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. **Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Salvador, 1999.

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

PATARROYO, J.H.; SOSSAI, S. Alternativa para o controle de carrapatos: vacinas e medicamentos. **Simpósio de produção de gado de corte**, IV, 2004, Viçosa. **Anais ...**, Viçosa. Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Vet. Res.** v.35. p.163-187. 2004.

POCKLEY, A.G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **The Lancet**. v. 362.p. 469-476. 2003.

PROPHET, E.B; MILLS, B; ARRINGTON, J.B; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in histotechnology**. Washington Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p.27.

PYÖRÄLÄ, S.. **Hirvonen's thesis on acute phase response in dairy cattle**. 2000. 80 f. Faculty of Veterinary Medicine - University of Helsinki – Helsinki -

QAZI, K.R.; WIKMAN, M.; VASCONCELOS N.; BERZINS, K.; STAHL, S.; FERNÁNDEZ, C. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of Plasmodium falciparum malarial antigen gene fused with a fragment of HSP70 gene. **Vaccine**. v. 23. p. 1114-1125. 2005.

RAMÍREZ, N.; MOLINA, S.; SIERRA, G.; PAREJA, J.. Prevalencia de niveles séricos de haptoglobina em bovinos adultos, de cuatro hatos de Antioquia. **Revista do Col. Cienc. Pec.** v 15. p.160-168. 2002.

RENSIS, F.D.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**. V. 60. p.1139-1151. 2003.

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

REZZANI, R.; BUFFOLI, B.; RODELLA, L.; STACCHIOTTI, A.; BIANCHI, R.. Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. **International Immunopharmacology**. v.5. p.1397-1405. 2005.

ROBERT, J.. Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental & Comparative Immunology**. v.27. p.449-464. 2003.

ROUSSEL, S.; BOISSY, A.; MONTIGNY, D.; HEMSWORTH, P.H.; DUVAUX-PONTER, C. Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity of goat kids. **Hormones and Behavior**. V. 47. p. 256-266. 2005.

RUEF, B.J.; WARD, T.J.; OXNER, C.R.; CONLEY, P.G.; BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C.. Phylogenetic analysis with newly characterized *Babesia bovis* hsp70 and hsp90 provides strong support for paraphyly within the piroplasms. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 109. p.67-72. 2000.

RUIS, M.A.W.; GROOT, J.; BRAKE T, et al. Behavioural and physiological consequences of acute defeat in growing gilts: effects of the social environment. **Applied Animal Behaviour Science**. v.70, p.201-225. 2001.

SALES JÚNIOR, P.A. **Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm 7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos**. 2003. 77 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

SANDOVAL, M.P.C.. **Estudio inmunohistoquímico de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP 70 y HSP 27) em pulmón humano y tumoral**. 2002. 271 f. Doutorado (Grado de Doctor em Medicina) – Universidad Complutense de Madrid – Madrid.

SANTOS, E. O.. **Metabolismo do estresse: impactos na saúde e na produção animal**. 2005. Seminário (Disciplina Bioquímica do Tecido Animal no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SEGAL, B.H.; WANG, X.; DENNIS, C.G.; YOUN, R.; REPASKY, E.A.; MANJILI, M.H.; SUBJECK, J.R.. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. **Drug Discovery Today**. v.11. p. 534-540. 2006.

SEPPONEN, K.; PÖSÖ, A.R.. The inducible form of heat shock protein 70 in the serum, colon and small intestine of the pig: Comparison to conventional stress markers. **The Veterinary Journal**. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/tvj>>. Acesso em: 06 de Jul 2005.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T.. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research**. v. 18.n.3.p. 385-405. 2004.

SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, **Centro de processamento de dados**, Viçosa-MG, 1999.

SLOCOMB, L.L.; COLDITZ, I.G.. Evaluating the stress of production in cattle using haptoglobin. 5º. **Intennational Colloquium on Animal Acute Phase Proteins – Dublin – March 2005**.

STEPTOE, A.; WARDLE, J.; MARMOT, M.. positive affect and health-related neuroendocrine, cardiovascular, and inflammatory process. **PNAS**. v. 102. 18. p.6508-6512. 2005.

STEWART, G.R.; YOUNG, D.B.. Heat-shock proteins and host-pathogen intaraction during bacterial infection. **Current Opinion in Immunology**. v.16. p.506-510. 2004.

TAYLOR, R.P.; BENJAMIN, I.J.. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v.38.p.433-444. 2005.

VAN REENEN, C.G.; O'CONNELL, N.E.; VAN DER WERF, J.T.N.; KORTE, S.M.; HOPSTER, H.; JONES, R.B.; BLOKHUIS, H.J.. Responses of calves to acute stress: individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. **Physiology & Behavior**. v.85. p.557-570. 2005.

VARGAS, M. I. V.; PATARROYO, J. H. S. **Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis***. Curso de Patologia Geral, 01 – 30 de maio de 2004. 6 f. Notas de Aula. Mimeografado.

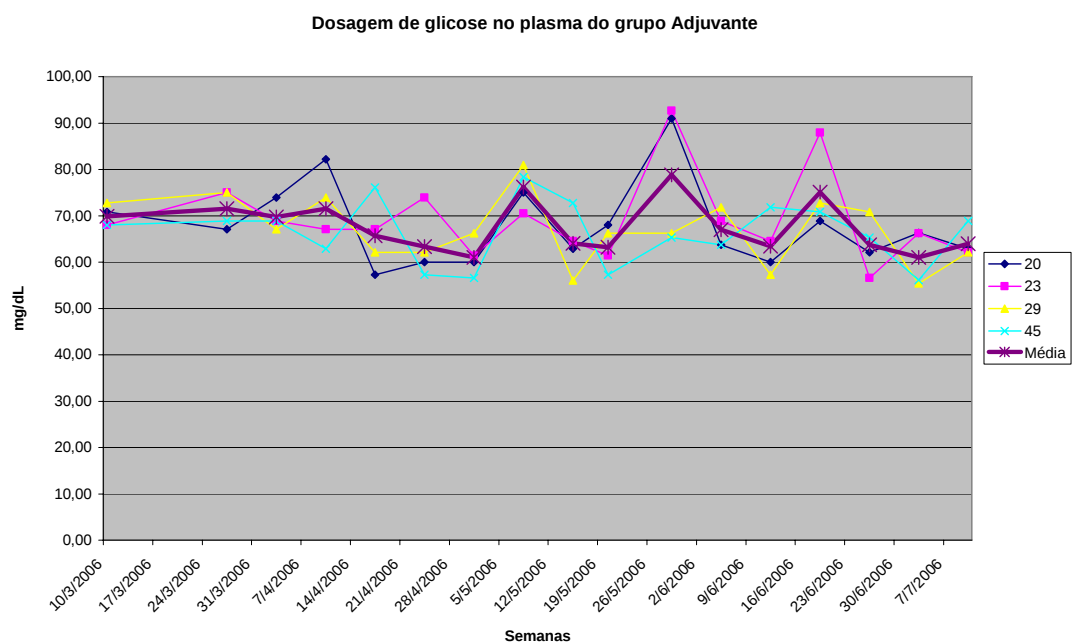
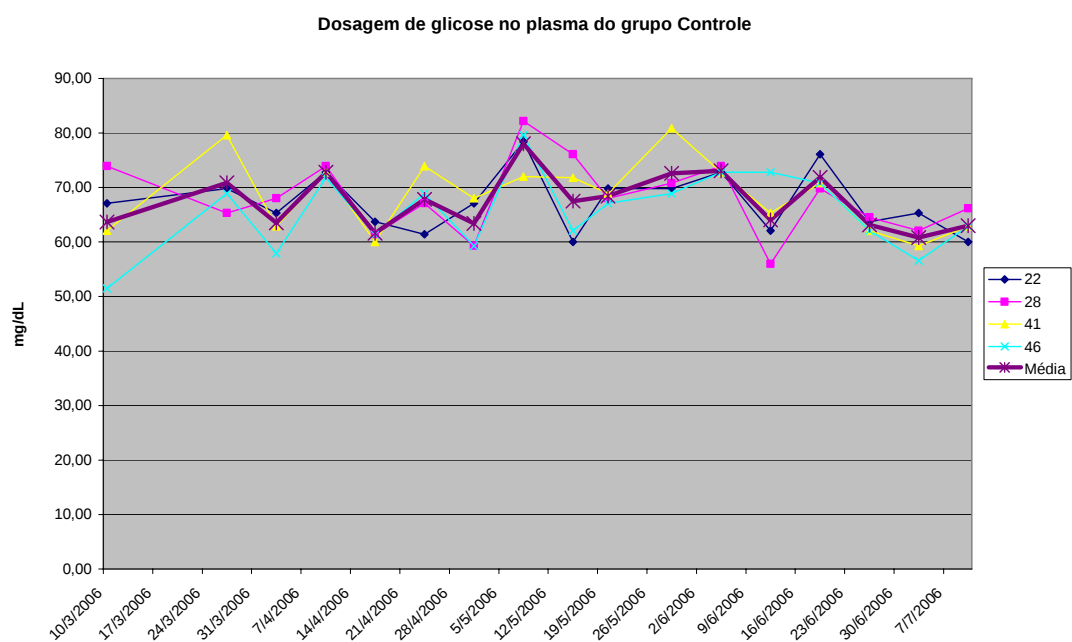
VON ADRIAN, U.H.; MEMPEL, T.R.. Homing and Cellular Traffic in Lymph Nodes. **Immunology**. v.3. p. 867-878. 2003.

UNGAR-WARON, H.; BRENNER J.; PAZ, R.; MOALEM, U.; TRAININ, Z..  $\gamma\delta$  T-lymphocytes and anti-heat shock protein reactivity in bovine leukemia virus infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 51. p. 79 – 87. 1996.

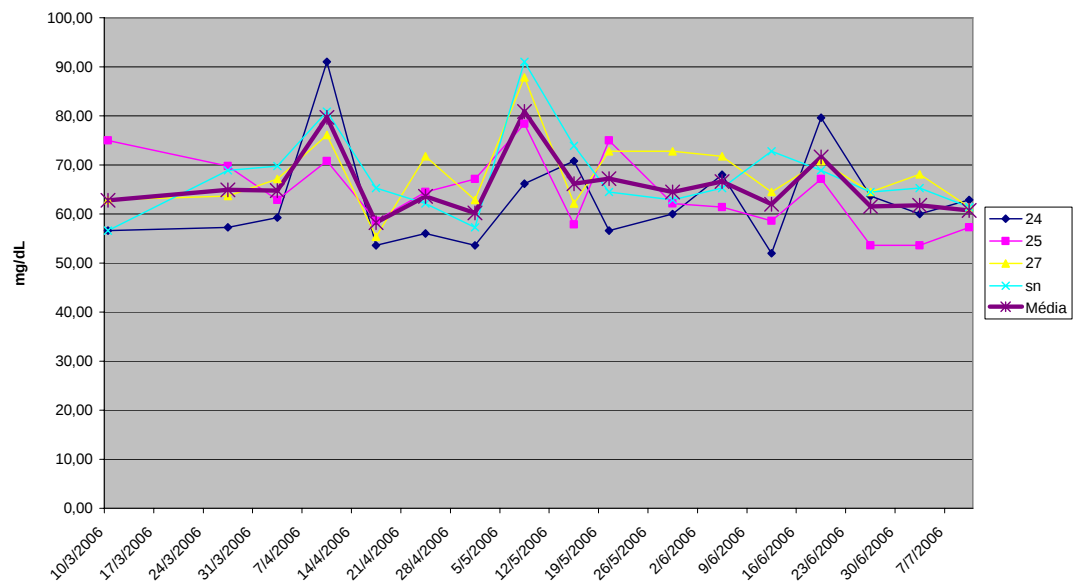
WEBSTER, J.I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E.M.. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu.Rev.Immunol**. v.20. p.125-163. 2002.

## 9 – ANEXOS

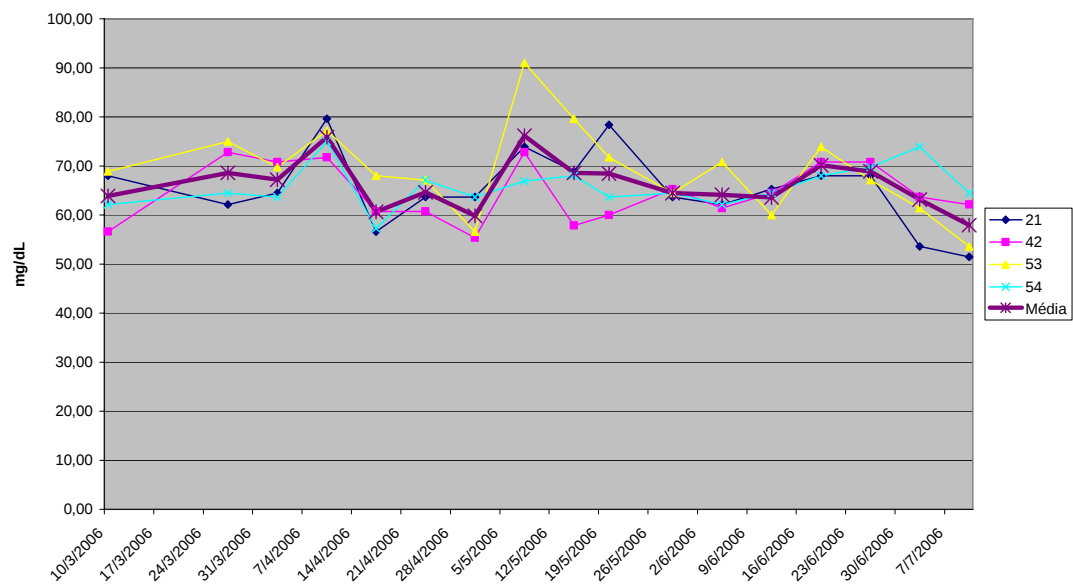
As figuras a seguir estão relacionadas aos valores das análises bioquímicas, com avaliação por animais em cada grupo.



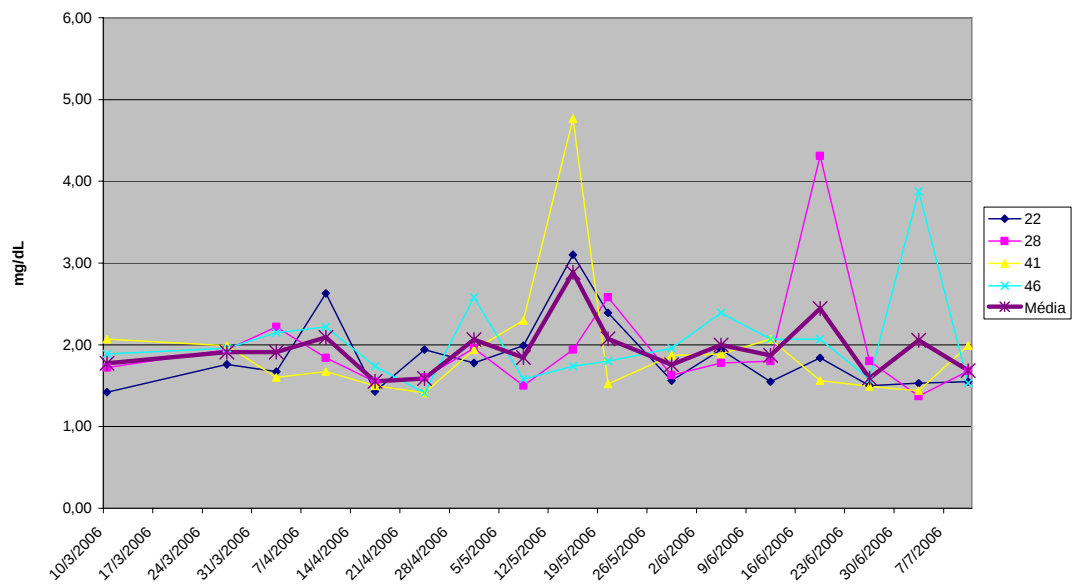
Dosagem de glicose do grupo Duas Vacinas



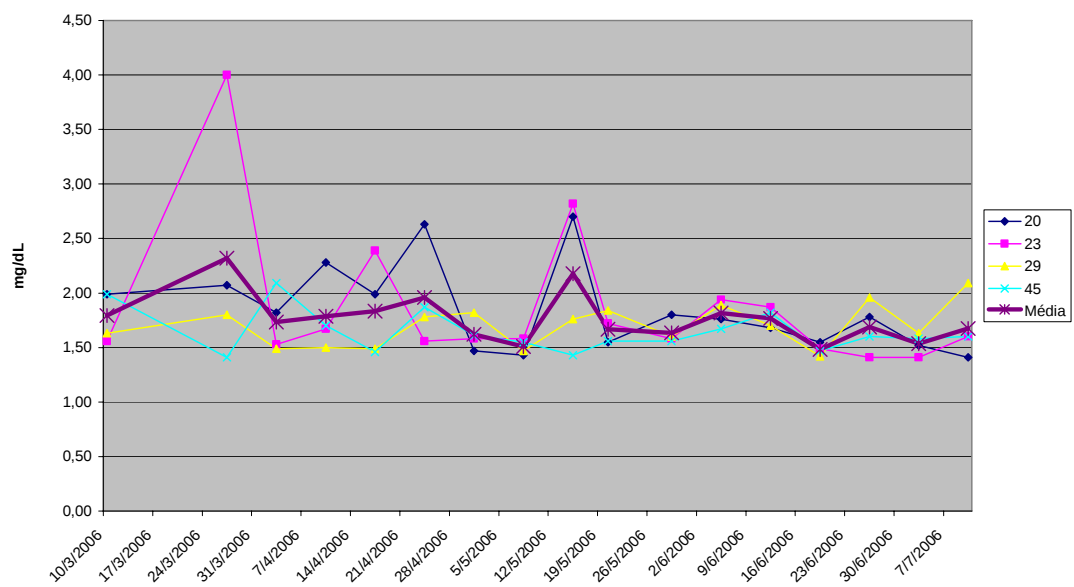
Dosagem de glicose do grupo Polivalente



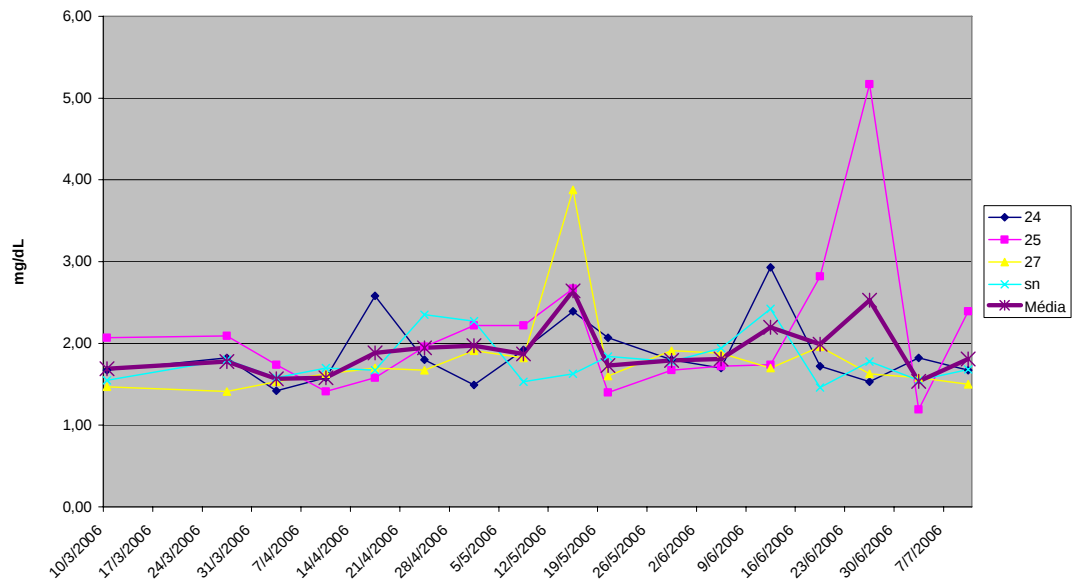
Dosagem de Lactato no plasma do grupo Controle



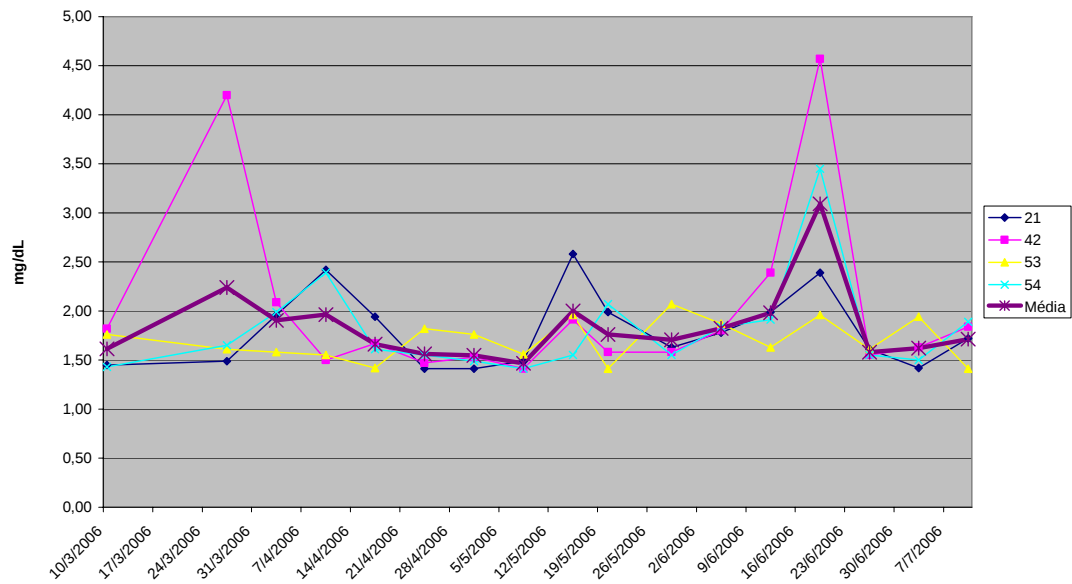
Dosagem de Lactato no plasma do grupo Adjuvante



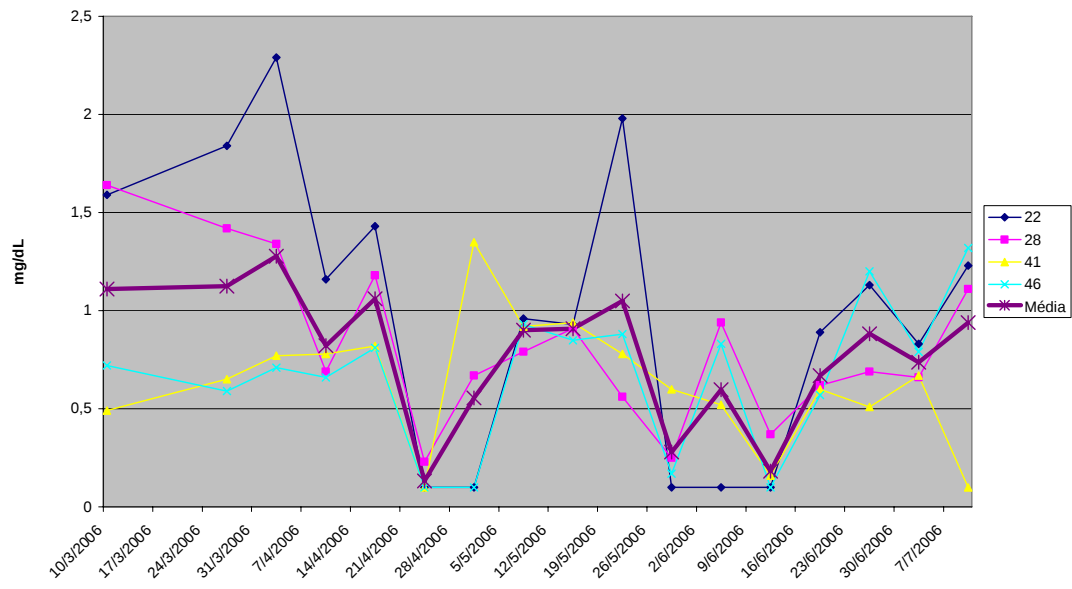
Dosagem de Lactato no plasma do grupo Duas Vacinas



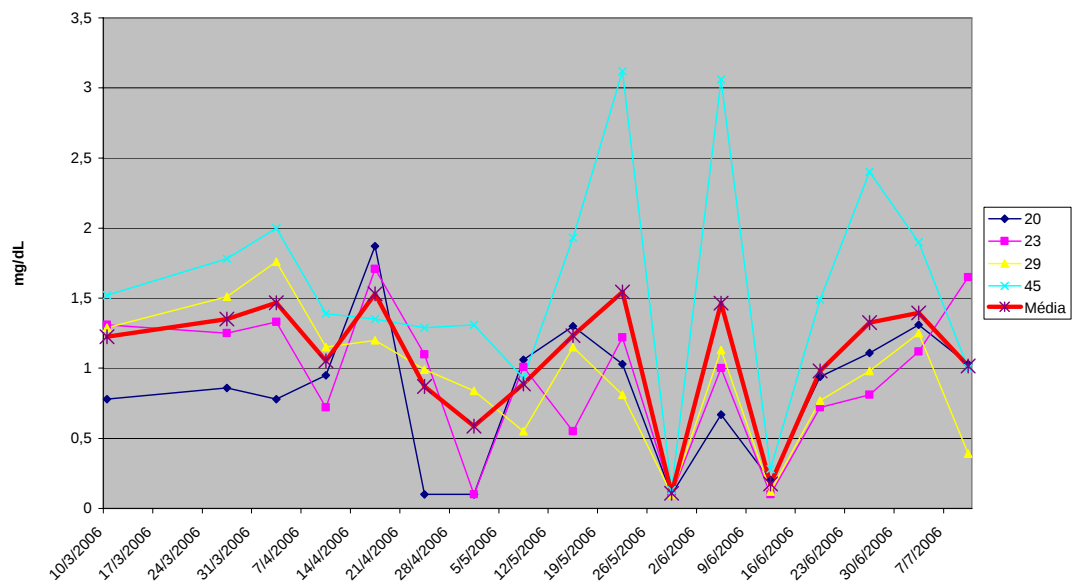
Dosagem de Lactato no plasma do grupo Polivalente



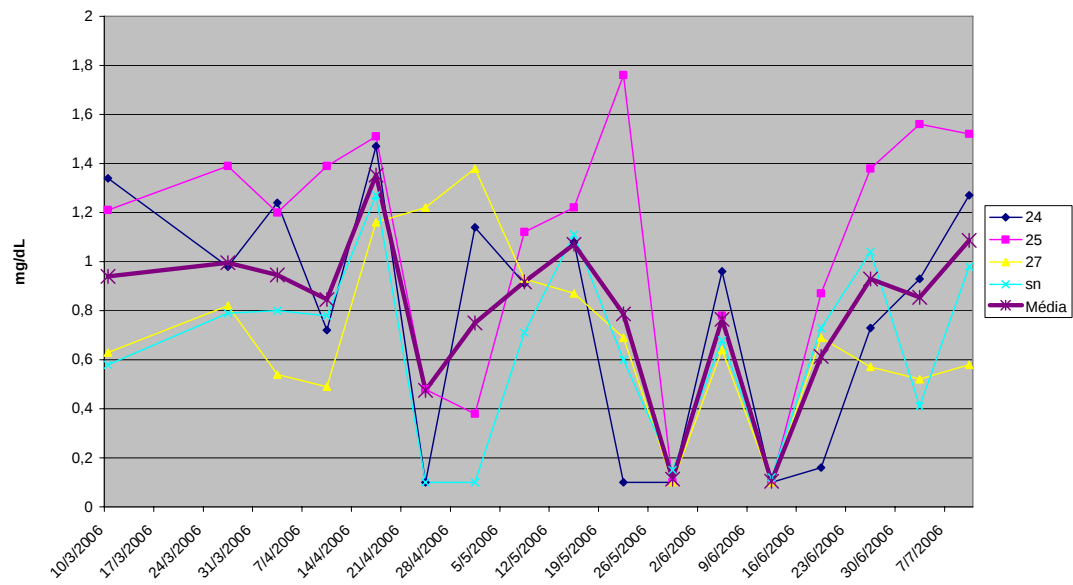
Dosagem de PCR no soro dos animais do grupo Controle



Dosagem de PCR no soro dos animais do grupo Adjuvante



Dosagem de PCR no soro dos animais do grupo Duas Vacinas



Dosagem de PCR no soro dos animais do grupo Polivalente

