

**LARISSA FERRAZ BEDÔR JARDIM**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM BOVINOS INOCULADOS COM O  
IMUNÓGENO SINTÉTICO SBbo 23290 E  
DESAFIADOS COM AMOSTRA VIRULENTA DE *Babesia bovis*  
(BABES, 1888; STARCOVICI, 1893)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

*"Ando devagar/ porque já tive pressa/  
E levo esse sorriso/ porque já chorei demais/  
Hoje me sinto mais forte/ mais feliz, quem sabe.  
Eu só levo a certeza/ De que muito pouco eu sei/  
Nada sei..."*  
*(Renato Teixeira e Almir Sater - Tocando em frente)*

*"O impacto da vacinação na saúde da humanidade é difícil de exagerar com exceção da água potável, nenhuma outra modalidade, nem mesmo os antibióticos, tem tido um maior efeito na redução da mortalidade e crescimento da população".*

*(S. Plotkin)*

## **OFERECIMENTO**

Aos meus pais, Jurandy Bedôr Jardim e Terezinha Ferraz Bedôr Jardim, pelo apoio incondicional e incentivo constante na minha vida.

Amo vocês, eternamente!

À minha filha Thaís Bedôr Jardim Chuí, pela sua compreensão, que é aquém da idade, e amor. Te amo muito!

Aos meus irmãos Lucila, Lúcio, Liana e Túlio e sobrinhos Rafaela, Ícaro, Júlia e Renan, pelo carinho, amizade e união, e por amenizarem a minha ausência para Thaís. Obrigada! Amo todos vocês!

Aos meus alunos, por serem estímulo constante na busca de saberes.

## AGRADECIMENTO

A Deus e à Virgem Maria, companheiros inseparáveis, mas que amenizaram meus momentos mais difíceis.

À Escola Agrotécnica Federal de Colorado do Oeste – Rondônia (EAF-CO/RO), por oportunizar a realização deste curso. A todos os integrantes das Unidades Educativas e de Produção de Zootecnia, por me acolherem e colaborar com a obtenção deste título.

Aos companheiros Arão A. Gomes, Aurélio F. Borges e Ênio R. Milani, pela confiança em mim depositada.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pela assistência e orientação prestadas, bem como pela paciência e compreensão.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pela orientação e amizade.

Ao professor José Dantas, pela orientação, confiança e amizade. Muito obrigada!

Ao professor e amigo Eduardo Paulino da Costa, pela valiosa colaboração na realização dos testes estatísticos.

Aos colegas de laboratório – Ana Paula, Carla, Carolina, Carlos, Diogo, Irma e Sidimar.

Aos amigos de fé – Ana Paula Adry e Fernando, Cristina Boock e Celber, Breno, Rogério, Ferdinan e Bruno Milagres, Cláudia Gonzalez e Policarpo; além da minha grande família "mineira" – Mozart, D. Diana, D. Leiva, D. Ruthe, D. Moema, D. Regina, Sr. Josuel, Cláudia e Carla, Zé Augusto, Ricardo, Pablo e Eliane. Muito obrigada!

Vocês se fizeram presentes, mesmo quando ausentes fisicamente – amo vocês!

Aos funcionários do Departamento de Veterinária – Adão e Cláudio, Cauzinho e Zé Carlos, Bel, Lucinda, Luiz Márcio e Rose – serei sempre grata pelo apoio e companheirismo. Obrigada!

Ao técnico laboratorista Márcio Mendes, pela paciência, pela dedicação, pelo incentivo, pelo profissionalismo e companheirismo. Meu muito obrigada!

A Mariana (Number One), pelas lições de inglês e de vida, mas também pelos mimos (doces e textos literários) e, sobretudo pela amizade. Você é 10!

A Aline Alencar Prates, pelas sugestões, incentivos e, sobretudo pela amizade. Valeu!

Aos integrantes do 115 - Túlio, Yasmine, Sandra que entraram nessa ordem em minha vida, com os quais compartilhei alegrias e tristezas de perto, mas sobre tudo Vitórias!

A Universidade Federal de Viçosa.

A Viçosa-MG pelo trânsito e frio inesquecíveis.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível essa pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

LARISSA FERRAZ BEDÔR JARDIM, filha de Jurandy Bedôr Jardim e Terezinha Ferraz Bedôr Jardim, nasceu em 11 de fevereiro de 1969, no município de Floresta, Estado de Pernambuco.

Formou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, em janeiro de 1993. Neste mesmo ano, foi contratada pela EMATER-RO (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Rondônia) e, em 1997, foi aprovada por concurso público para o cargo de professora de 1.º e 2.º graus da Escola Agrotécnica Federal de Colorado do Oeste-RO.

Em 1999, concluiu o Curso de Pós-Graduação, em nível de Especialização, em Metodologia e Didática do Ensino Superior, pela Faculdade de Educação de Cacoal, em Cacoal-RO. Na Fundação Universidade Federal de Rondônia, campus de Vilhena-RO, no ano de 2001, terminou o Programa Especial de Formação Pedagógica para ministrar a disciplina de Ciências. E, em dezembro de 2003, concluiu a Especialização "Lato Sensu" em Produção de Ruminantes pela Universidade Federal de Lavras, em parceria com a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão em Lavras-MG.

Ingressou no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em março de 2003.

## ÍNDICE

<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	<i>ix</i>
<i>RESUMO</i> .....	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>xi</i>
<i>1. INTRODUÇÃO</i> .....	<i>12</i>
<i>2. OBJETIVOS</i> .....	<i>3</i>
2.1. Objetivo geral .....	<i>3</i>
2.2. Objetivos específicos .....	<i>3</i>
<i>3. REVISÃO DE LITERATURA</i> .....	<i>4</i>
3.1. Babesiose bovina .....	<i>4</i>
3.2. Biologia .....	<i>5</i>
3.3. Patofisiologia da enfermidade .....	<i>6</i>
3.4. Mecanismos de Imunidade nos bovinos contra a <i>Babesia bovis</i> .....	<i>7</i>
3.5. Métodos de controle da babesiose .....	<i>10</i>
3.5.1. Premunicação .....	<i>11</i>
3.5.2. Vacinação .....	<i>12</i>
3.5.3. Controle com exoantígenos .....	<i>12</i>
3.5.4. Proteínas Associadas a Roptrias (RAP) .....	<i>13</i>
3.5.5. Peptídeos sintéticos .....	<i>14</i>
<i>4. MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	<i>17</i>
4.1. Local de realização do experimento .....	<i>17</i>

4.2. Animais.....	17
4.3. Peptídeo sintético.....	18
4.4. Adjuvante .....	18
4.5. Esquema de inoculação .....	18
4.6. Infecção – desafio.....	19
4.7. Avaliação clínica dos animais .....	20
4.8. Coleta de sangue dos animais para obtenção de soro.....	20
4.9. Teste imunoenzimático (ELISA).....	21
4.9.1. Teste de ELISA para pesquisas de anticorpos anti-peptídeo SBbo 23290.....	21
4.9.2. Teste de ELISA para a detecção de IgG1 a IgG2 bovina.....	22
4.10. Parâmetros pesquisados na avaliação da proteção .....	23
4.11. Análise estatística .....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Avaliação do perfil hematológico e parasitológico dos bovinos experimentais. ....	24
5.1.1. Avaliação hematológica e parasitológica dos bovinos imunizados. ....	24
5.1.2. Avaliações parasitológica e hematológica pós-desafio com amostra virulenta de <i>B. bovis</i> em bovinos imunizados.....	25
5.1.2.1 Febre .....	25
5.1.2.2. Período Pré-Patente .....	27
5.1.2.3. Parasitemia .....	27
5.1.2.4. Anemia .....	29
5.1.2.5. Necrópsia.....	31
5.1.2.6. Sobrevivência .....	31
5.2. Resposta humoral dos animais experimentais.....	32
5.2.1 Avaliação sorológica para pesquisa de IgG anti-SBbo 23290 .....	32
5.2.2. Avaliação de secreção de IgG1 e IgG2 em soro de bovinos imunizados com peptídeo sintético anti- <i>B. bovis</i> 23290.....	34
6. CONCLUSÕES.....	40
7. PERSPECTIVAS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Média da temperatura (°C) dos grupos durante o período pós-desafio com <i>B. bovis</i> .	26
Figura 2	Período pré-patente e a parasitemia no período pós-desafio com amostra virulenta de <i>B. bovis</i> .	28
Figura 3	Porcentagem da parasitemia no período pós-desafio com <i>B. bovis</i>	28
Figura 4	Volume globular (%) pós-desafio com <i>B. bovis</i> .	30
Figura 5	Produção de hemoglobina pós-desafio com <i>B. bovis</i> .	30
Figura 6	Cinética da produção de IgGs em bovinos imunizados com SBbo 23290.	33
Figura 7	Cinética da produção de IgG1 em bovinos imunizados com SBbo 23290.	35
Figura 8	Cinética de produção de IgG2 em bovinos imunizados com SBbo23290.	36
Figura 9	Cinética da produção de IgGs e isótipos IgG1, IgG2 em bovinos imunizados com SBbo 23290.	36

## RESUMO

JARDIM, Larissa Ferraz Bedôr, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005.  
**Avaliação da resposta imune em bovinos inoculados com o imunógeno sintético SBbo 23290 e desafiados com amostra virulenta de *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1893).** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo.

Bovinos da raça holandesa entre 3-4 meses de idade receberam quatro imunizações subcutâneas do peptídeo sintético 23290 anti-*Babesia bovis* mais saponina, e foram desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*, sendo avaliados alguns parâmetros clínicos como hematócrito, hemoglobina, parasitemia e temperatura, além do acompanhamento do desenvolvimento da resposta imune humoral, mediante quantificação de IgG total e identificação de isótipos IgG1 e IgG2 antígeno- específicos. Os parâmetros hematológicos e a temperatura foram analisados semanalmente no período de imunização, e diariamente a partir do 7º dia pós-desafio com o parasito; Os exames sorológicos foram realizados semanalmente durante todo o experimento. As análises sanguíneas demonstraram que SBbo 23290 minimizou o impacto da infecção pela *B. bovis*, além de inibir a carga parasitária. Os estudos sorológicos constataram que o SBbo 23290 estimulou a produção de imunoglobulinas G antígeno-específico, com predominância estatisticamente maior de isótipos IgG1 sobre IgG2 bem como elevação da produção de IgG total. Com relação aos parâmetros clínicos, que foram observados 18 dias pós-desafio, houve um declínio nos valores observados em todos os grupos. Quanto à temperatura, o observado foi que houve elevação significativa da mesma após o desafio com *B. bovis*, sendo diretamente proporcional à carga parasitária. Sendo assim, pode-se concluir que o peptídeo sintético induz de maneira eficaz uma resposta imunológica antígeno-específica, na qual encontram-se envolvidos mecanismos celulares e humorais.

## ABSTRACT

JARDIM, Larissa Ferraz Bedôr, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2005.  
**Evaluation of the immune answer in bovines inoculated with the synthetic immunizing agent SBbo 23290 and challenged with an virulent sample of *Babesia bovis*, (BABES, 1888; STARCOVICI, 1893).** Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

Tree-four month old bovines of the Holstein Friesian breed received four under-skin immunization of the synthetic peptide 23290 anti-*Babesia bovis* plus saponina. They were challenged with an virulent sample of *B. bovis* and they were evaluated considering clinic parameters such as packed cell volume, hemoglobin, parasitemy (presence of parasite), and temperature, besides, the observation of the development of the humoral immune answer through identification of specific-antigen isotypes IgG1 and IgG2, besides the total IgG. The hematological parameters and the temperature were checked every week during the immunization period, and every day after the seventh day after challenge. The serology were conducted every week during the whole experiment. The blood analyses demonstrated that SBbo 23290 minimized the impact of the infection *B. bovis*, besides by inhibiting the parasitological charge. The serologic studies evidenced that SBbo 23290 stimulated the production of antigen-specific immunoglobulin G. Showing a predominance of isotypes IgG1 statistically higher than IgG2 as well as an increase of the production of total IgG. Considering the clinical parameters, observed 18 days after challenge, a decrease of values was observed in all groups. On the other hand, the temperature became meaningfully higher after the challenge with *B. bovis*, at the same rate of the parasitological charge. We can conclude that the synthetic peptide induce an effective immunological specific-antigen answer, in which cellular and humoral mechanisms were involved.

## 1. INTRODUÇÃO

As babesioses são doenças que têm como agente etiológico hemoprotozoários intraeritrocitários obrigatórios do phylum Apicomplexa e do gênero *Babesia*. Esta doença em bovinos foi relatada no Brasil pela primeira vez por Fajardo em 1901 (SILVA, 1981), a qual afeta milhões de animais provocando a morte de alguns deles.

O gênero *Babesia* possui várias espécies que parasitam animais domésticos, silvestres e ocasionalmente o ser humano sendo transmitidas por carrapatos da família Argasidae e Ixodidae; porém a babesiose bovina é apenas transmitida pela família Ixodidae (FRIEDHOFF, 1990; EVANS *et al*, 2000).

Aproximadamente 300 milhões de cabeças de gado nas regiões tropical e subtropical do mundo estão sob o risco de infecção com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, (WRIGHT, 1990). A babesia bovina, especialmente a que é causada pela *B. bovis* continua sendo a de maior importância patológica e econômica no mercado agropecuário do Brasil.

Na América Latina, a babesiose causa prejuízos de mais de US\$ 1.365 milhões por ano (MONTENEGRO-JAMES, 1992).

Evidente que a prevenção da babesiose bovina pode ser realizada tanto pelo combate direto ou imunidade protetora contra seu vetor, o carrapato *Boophilus microplus* e/ou, através da estimulação imunológica contra o hematozoário.

A imunidade contra a *Babesia* spp requer não apenas a resposta imune inata, mas também a adaptativa. Esta tem sido induzida após a inoculação com antígenos, atenuados, ou sintéticos, assim como por sobrenadantes de cultura do parasito que contem antígenos solúveis.

A vacinação constitui um método de imunização ativa com o intuito de estimular os mecanismos de defesa de um hospedeiro, de forma a proteger o animal de futuras infecções ou de manifestações clínicas, além de ativar células de memórias. A imunidade inata interfere na infecção da *Babesia* spp.

A utilização de vacinas se destaca como uma tecnologia promissora alternativa ao método de controle tradicional, a premunição, devido à eficiência e segurança, bem como pela indução da memória imunológica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a proteção conferida a bovinos (*Bos taurus taurus*) e mensurar alguns parâmetros clínicos após "vacinação" com o imunógeno sintético SBbo 23.290, mediante alguns parâmetros clínicos e sorológicos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a cinética de produção das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2) anti-imunógeno;
- Avaliar a cinética de produção das subclasses de IgG (IgG1e IgG2) após o desafio com amostra virulenta e *B. bovis*;
- Analisar a resposta imune mensurando a parasitemia, temperatura, e anemia após o desafio.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Babesiose bovina

A babesiose bovina é uma enfermidade parasitária causada por várias espécies de babesia, entretanto, no Brasil a doença é provocada por duas espécies, *B. bovis* (BABES, 1888; STARCOVICCI, 1893) e *B. bigemina* (SMITH e KILBORNE, 1893) que em condições naturais são transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRI, 1887).

A mesma foi descrita primeira vez em nosso país, por Fajardo em 1901, segundo Silva (1986). Das duas espécies, a *B. bovis* é considerada a mais virulenta (ZAUGG, 1993).

Essa enfermidade tem ampla distribuição geográfica, que corresponde à área de existência do seu vetor biológico – carrapato, *Boophilus microplus*, a qual se estende entre as latitudes 32° Sul e 40° Norte da linha do Equador, constituindo um problema para os países tropicais e subtropicais (BUSHELL, *et al.*, 1991).

A dinâmica da infecção por *Babesia spp* é dependente de fatores como população de carrapatos infestantes, capacidade de transmissão do carrapato, susceptibilidade dos bovinos, a qual varia com a raça, idade, sexo, estado fisiológico e imunitário (SOUZA *et al.*, 2000).

As perdas econômicas causadas pela babesiose são difíceis de calcular. Elas são determinadas por muitos fatores, alguns dos quais são facilmente quantificáveis, enquanto que outros passam despercebidos pelo produtor (RISTIC, 1981); visto que os efeitos diretos e indiretos da babesiose bovina são causados, principalmente, pela queda da produção e perda dos animais doentes, gastos com tratamentos, além da profilaxia do rebanho (KESSLER *et al.*, 2000).

No Brasil, os prejuízos totais na produtividade da bovinocultura, causados direta e indiretamente pelo *Boophilus microplus*, foram calculados na cifra de dois bilhões de dólares anuais sendo quinhentos milhões devido às doenças transmitidas por estes (MADRUGA, 2003).

Segundo Bock *et al.* (1999), a mortalidade de animais é a consequência mais evidente da doença. Os maiores índices ocorrem entre animais *Bos taurus taurus* principalmente entre os não inunes, recém introduzidos em áreas endêmicas, já que, as áreas de instabilidade enzoótica caracterizam-se por serem regiões onde as condições climáticas não são tão favoráveis ao carrapato, assim as infestações variam conforme as estações e existe o risco de surtos esporádicos de babesiose (MAHONEY e ROSS, 1997).

A produção de cruzamentos entre zebuínos e taurinos não tem gerado resultados satisfatórios, pois os híbridos não guardam características de resistência e produtividade que tornem sua utilização vantajosa perante os animais puros (BOCK *et al.*, 1999).

### **3.2. Biologia**

A classificação taxonômica da *Babesia spp* compreende: filo: Apicomplexa, Classe: Aconoidasida, Ordem: Piroplasmorida, Família: Babesiidae e Gênero: Babesia (LEVINE,1973).

A manutenção da *Babesia spp* depende de duas classes de hospedeiros, o invertebrado (carrapato específico) que se alimenta do hospedeiro vertebrado, sendo capaz de se manter infectado com o parasita, constituindo-se um reservatório (HOMER *et al.*, 2000).

No hospedeiro vertebrado após ser inoculado pelo vetor no momento da alimentação, os esporozóitos entram na corrente sangüínea e penetram nas hemácias, desenvolvendo-se rapidamente, originando os trofozóitos que evoluem para merozóitos. A saída do merozóito rompe a célula infectada, embora possa vir a permanecer intacta. Um ciclo de divisão de *B. bovis* é de aproximadamente 8 horas; esse é um processo contínuo que depende fundamentalmente das condições imunológicas do hospedeiro (MAHONEY, 1977; RISTIC, 1988; MELHORN e SCHEIN, 1984). A invasão das hemácias pelo parasita é um processo ativo que envolve organelas do complexo apical como roptrias, grânulos densos e micronemas, além de corpos esféricos, conóide e anel polar (SAM-YELLOWE, 1996).

A fase sexuada do ciclo se dá quando o carrapato ao se alimentar, ingere os eritrócitos infectados com merozoítos, os quais irão se desenvolver no intestino do vetor (RISTIC, 1988).

A partir do intestino do carrapato, via hemolinfa, estas formas sexuadas – gametas podem invadir os ovários, tubos de malpighi e células musculares onde irão evoluir para zigoto.

No ovário, os oócitos infectados são responsáveis pela transmissão vertical da babesia. Depois da postura, o zigoto infectado dá origem a um cineto móvel (uninucleado) que irá se multiplicar assexuadamente no núcleo do ovo e as células-filhas invadem o epitélio intestinal em desenvolvimento da larva, produzindo esporocinetos, que irão invadir as glândulas salivares, transformando-se em esporozóitos (RISTIC, 1988).

A transmissão da forma infectante, esporozoíto, ocorre até três dias após a fixação do carrapato no hospedeiro. No caso da *B. bovis* se dá apenas na fase larvar (McHONEY, 1977), tais larvas se tornam negativas para *B. bovis* após a transmissão. A maior fonte de reinfecção pode ocorrer no final do período de ingurgitamento da fêmea adulta (KESSLER *et al.*, 2000). A transmissão em bovinos pode ser adquirida via transplacentária (raramente) (NEW *et al.*, 1997) ou iatrogenicamente, através de fômites contaminados (ZAUGG, 1993).

### **3.3. Patofisiologia da enfermidade**

Clinicamente na babesiose, causada pela *B. bovis*, apresenta-se febre (40°-42°C), depressão, icterícia, anorexia, taquicardia, taquipnéia, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e morte. A anemia é causada pela destruição intravascular de eritrócitos, devido à liberação de merozoítos após a reprodução intra-eritrocitária das babesias. Ademais, a fragilidade osmótica de toda população eritrocitária aumenta terminalmente de tal modo que ocorre maciça lise, ainda que a parasitemia possa ser inferior a 1% (WRIGHT, 1981).

A morte pode ser causada por síndrome similar ao choque, associado à liberação de substâncias vasoativas e anóxia anêmica. Entretanto, a mortalidade é extremamente variável, dependendo da espécie de babesia envolvida, da susceptibilidade do hospedeiro, dos fatores de manejo e de estresse (ZAUGG, 1993).

Os achados de necropsia nesse caso são emaciação da carcaça, palidez das mucosas, espleno e hepatomegalia, vesícula biliar distendida, bexiga contendo urina avermelhada, pulmões levemente edemaciados e congestos, bem como congestão do cérebro, rins e coração (PATARROYO *et al.*, 1982).

Segundo Zaugg (1993), a babesiose cerebral, caracterizada por hiperexcitabilidade, convulsões, opistótono, coma e morte pode ser observada em bovinos infectados por *B. bovis*. Os sintomas neurológicos são causados pela anóxia cerebral resultante da anemia grave e/ou bloqueio dos capilares cerebrais pelos eritrócitos. O dano causado pelo bloqueio dos capilares pode levar a uma condição, conhecida como babesiose cerebral (VALEIRÓN, 1998).

Trabalhos realizados por Caetano (2001), mostravam que a adesão resulta da interação entre antígenos de *B. bovis* na superfície dos eritrócitos e receptores endoteliais complementares. Variações na estrutura da composição de aminoácidos e dos antígenos podem alterar a afinidade de ligações com receptores expressos nas células endoteliais. Assim, mesmo que amostras diferentes de *B. bovis* sejam capazes de produzir antígenos que se aderem às hemácias, apenas ocorrerá adesão se estes antígenos apresentarem afinidade pelos receptores endoteliais. Amostras patogênicas diferentes possuem capacidade variada de produzir adesão de eritrócitos não parasitados em células endoteliais bovinas. Hernández (2002), demonstrou que o aumento da adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com *B. bovis* é devido à maior expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais.

### **3.4. Mecanismos de Imunidade nos bovinos contra a *Babesia bovis***

A imunidade para *Babesia* spp envolve os dois tipos de resposta imune: inata e adaptativa (pelo fato de ser um parasita intra-eritrocitário obrigatório), as células TCD4<sup>+</sup> representam a ligação entre estes dois tipos de resposta, uma vez que o eritrócito não possui Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) (BROWN e PALMER, 1999); ainda segundo Brown (2001), os eventos que ocorrem a partir do momento em que o parasito invade o hospedeiro vertebrado e entra em contato com alguns elementos da imunidade inata é que determinarão a magnitude da resposta imune específica. Os hospedeiros mamíferos desenvolvem após um episódio de infecção natural ou posterior a uma imunização profilática (HOMER *et al.*, 2000).

A resposta imune celular vem sobre tudo, do baço, reconhecidamente importante na defesa do hospedeiro contra *Babesia* spp. Diferentes mecanismos imunes contribuem para a resistência durante cada estágio da infecção na fase de estabelecimento da babesiose, tanto células do sistema imune inato quanto os anticorpos, especificamente as imunoglobulinas G

(IgGs) podem prevenir a infecção e neutralizar os merozóitos, impedindo que atinjam os eritrócitos (HOMER, 2000).

De acordo com James (1988), especificamente células NK e macrófagos, estão envolvidas na atividade antibabesia, pois na ausência destas, observa-se um aumento da parasitemia em curto período de tempo, sugerindo que mecanismos imunes inatos podem estar envolvidos na destruição dos parasitas antecipadamente à produção de anticorpos.

O mecanismo específico de proteção, contudo parece manter-se obscuro (WRIGHT e GOODGER, 1988). A proteção contra a infecção aguda de *Babesia* envolve macrófagos ativados (BROWN e PALMER, 1999), neutrófilos, células NK (COURT *et al.*, 2001), entre outros, mas o controle da parasitemia durante a infecção ou após esta por *Babesia* envolve também anticorpos (BROWN e PALMER, 1999).

A importância da proteção humoral na babesiose bovina foi demonstrada em estudos que utilizaram soro contendo IgG1 e IgG2, que promoveu proteção contra desafios com população homóloga de *B. bovis* (BROWN e PALMER, 1999).

Em bovinos, tanto a IgG1 quanto a IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação a IgG1 (McGUIRE *et al.*, 1979). A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina-4 (IL-4) enquanto que o IFN- $\gamma$  estimula a produção de IgG-2 (ESTES *et al.*, 1995). Estes resultados foram confirmados por Brown *et al* (1999), quando demonstraram que clones de células Th produtoras de IFN- $\gamma$  específicos para RAP-1 de *B. bigemina*, induziram aumento nos níveis de IgG-2 produzidos por linfócitos B e que células Tho, capazes de expressar IL-4 e IFN- $\gamma$ , forneciam sinais co-estimulatórios necessários para o aumento da síntese de IgG1 e IgG2 por células B.

A imunorregulação de infecções difere em relação aos tipos celulares envolvidos, as citocinas e mediadores secretados, assim como os seus efeitos supressores ou indutores sobre respostas imunes do tipo Th1 e Th2 (COX, 1997; BROWN *et al.*, 1988). A heterogeneidade da resposta imune relaciona-se com o perfil de citocinas produzidas e secretadas (ABBAS, 2003).

As citocinas desempenham importantes funções imunorreguladoras sobre células T diferenciadas. A IL-10 humana recombinante suprimiu a proliferação de linfócitos T bovinos e a produção de IFN- $\gamma$  sendo este efeito dependente de células apresentadoras de antígenos (APC), possivelmente macrófagos (CHITKO-McKOWN *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Brown *et al.* (1996), com clones de células Th de bovinos e humanos mostraram que a IL-12, produzida principalmente por macrófagos e por células

dendríticas, induziu a produção de IFN- $\gamma$  em todos os subtipos de clones Th analisados (Th0, Th1 e Th2), embora não tenha sido observado aumento significativo na taxa de proliferação celular.

A IL-12, além de induzir a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T, também induz sua produção pelas células NK. Além disso, esta citocina age como fator de diferenciação sobre as células TCD4<sup>+</sup> para um padrão de resposta do tipo Th1 e como potencializador das funções citolíticas das células NK e TCD8<sup>+</sup> ativadas. Portanto, a IL-12 age como um mediador da imunidade inata e da citotoxicidade, porque liga a ativação de macrófagos ao desenvolvimento das funções efetoras das células NK, simultaneamente favorece o desenvolvimento de respostas imunes específicas (BITTAR, 2002).

Em clones de células T antígeno específicas CD4<sup>+</sup> de bovinos, a IL-4 age inibindo ou aumentando a produção de IFN- $\gamma$  ou não causa efeito, porém vários estudos têm mostrado a importância do IFN- $\gamma$ , produzidos por linfócitos Th ativados, na proteção contra a babesiose bovina (TUO *et al.*, 1999).

A produção de óxido nítrico (ON) em macrófagos de bovinos, estimulados *in vitro* com antígenos de membrana de *Babesia bovis* e com sobrenadante de cultura de células Th antígeno-específicas contendo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  endógenos, parecem sugerir que o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) em macrófagos pode ser indicativo do potencial batedicida de NO (STICH *et al.*, 1988).

Todavia, a superprodução de NO, também pode estar associada a mecanismos patogênicos da infecção, incluindo a babesiose cerebral, já que várias disfunções orgânicas, observadas durante a evolução da malária e da babesiose, podem ser mediadas pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (GRAU *et al.*, 1989).

Estudos realizados por East *et al.* (1997) mostram a importância das diferentes citocinas na resposta imune, após desafio com *Babesia bovis* em bovinos; a quantidade de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , produzida pelas células mononucleares periféricas circulantes (PBL) tem uma estreita correlação com a imunidade conferida ao desafio. A produção de NO pelos macrófagos é induzida pelo TNF- $\alpha$  e pelo IFN- $\gamma$  que atuam como co-fatores estimuladores (STICH *et al.*, 1998).

É explícito o potencial de *Babesia bovis* na estimulação de macrófagos para estes produzirem TNF- $\alpha$ , assim como outras citocinas, incluindo IFN- $\gamma$  que por sua vez induzem a produção de IL-12 e IL-18. Segundo Shoda *et al.* (1999), os níveis destas citocinas aumentam na resposta imune contra eritrócitos infectados com *Babesia bovis*.

Experimentos realizados por Shoda *et al.* (2000), mostram que na fase aguda da infecção com *B. bovis* há liberação de citocinas reguladoras como IL-1, IL-12 e TNF- $\alpha$  que são importantes na resposta imune tanto inata quanto adaptativa contra o parasito.

Pollock e Welsh (2002) ressaltam a importância de células TCD4+, que tem papel primário na produção de citocinas ativadoras de macrófagos como INF- $\gamma$ , assim como as células TCD8+ que possuem papel citolítico, habilidade de lisar células infectadas e as células T $\gamma\delta$ , cuja população em bovinos jovens é elevada (>40%).

Às células T $\gamma\delta$  se atribuem várias funções, dentre as quais se destacam, a capacidade de secretarem citocinas que estimulam tanto células Th1 quanto células Th2, capacidade citolítica, imunomodulação (POLLOCK e WELSH, 2002), e participação na maturação de células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002).

### **3.5. Métodos de controle da babesiose**

Nas últimas décadas tem-se avançado muito no conhecimento epidemiológico desta enfermidade e na busca por uma vacina eficaz. A redução da transmissão da babesiose na atualidade é favorecida pelo controle dos carrapatos, o qual é realizado de maneira estratégica por meio de aplicação de drogas acaricidas em determinados períodos do ano. Segundo dados de levantamento epidemiológico, estas medidas reduzem os níveis populacionais dos carrapatos (NARI, 1990).

O controle intensivo do carrapato beneficia o rebanho, evitando os danos causados por este parasita, entretanto ou mas, promove um desequilíbrio na relação parasita/hospedeiro para as hemoparasitoses por ele transmitidas (KESSLER *et al.*, 2000). Segundo Bittar (2002), os processos de imunização são os mais apropriados para o controle dessa enfermidade, principalmente em animais importados, visto que as infestações por carrapatos acarretariam a morte do animal, quando introduzidos em áreas enzoóticas.

Considera-se como área de estabilidade enzoótica aqueles locais onde a soroprevalência apresenta-se acima do limite de 75%. Sendo áreas instáveis aquelas onde a soroprevalência é inferior a este (MAHONEY, 1975).

De Vos *et al.* (1982), estudando sobre eficiência de vacina contra babesioses, cita que uma vacina ideal deve apresentar as seguintes características: prevenir a doença, proteger contra as diferentes cepas, induzir imunidade de longa duração, ser livre de antígenos contaminantes, conservar a potência durante o armazenamento e transporte, de fácil administração.

### **3.5.1. Premunicação**

A premunicação consiste na inoculação de sangue de um animal portador (doador) em um animal susceptível (receptor), esta teve origem no início do século XX, na Austrália, por C. J. Pound (CALLOW *et al.*, 1977); apesar de ser o método mais antigo, atualmente, esta prática continua sendo amplamente utilizada no controle da babesiose em plantéis de bovinos leiteiros no Brasil.

Patarroyo (1979) destaca as limitações desse método já que o inoculo é desconhecido tanto qualitativamente como quantitativamente. A necessidade de medicação dos animais que apresentam a doença na forma aguda interrompe o mecanismo de desenvolvimento da imunidade, necessitando-se, por isso, de repetidas reinoculações. Como o volume de sangue inoculado é em geral de 5 mL, o que poderá conduzir à doença de incompatibilidade de sangue do bezerro em relação à vaca. Dimmock e Bele (1970), afirmam que isto ocorre devido à formação de anticorpos polireativos contra as hemácias.

Outra desvantagem é a necessidade de suporte veterinário mesmo após a fase de premunicação (SOUZA *et al.*, 2000). Pois, os doadores podem ser portadores de outras doenças infecciosas como brucelose, tuberculose, leucose, diarreia bovina a vírus (BVD), rinotraqueite infecciosa bovina (IBR), língua azul, erlichiose, tripanossomose, as quais podem ser disseminadas por este método. Aliado a isto, estão o alto custo do processo e a dificuldade de imunizar grande número de animais simultaneamente.

### 3.5.2. Vacinação

A primeira vacina contra *B. bovis* foi desenvolvida por pesquisadores australianos trata-se de uma vacina viva atenuada, que a princípio foi utilizada em áreas endêmicas do país e posteriormente exportada (CALLOW e MELLORS, 1966; CALLOW, 1979). Entretanto, por causa da variabilidade antigênica destes parasitos não tem sido possível obter, até o momento, uma vacina efetiva e economicamente viável (WRIGHT *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1995; PALMER e McELWAIN, 1995; PATARROYO *et al.*, 1995b)

A apresentação de reações pós-vacinais intensas, e a necessidade de tratamento terapêutico levou a pesquisas para atenuação de cepas de *Babesia* capazes de manter a sua imunogenicidade, através de passagens rápidas em bezerros esplenectomizados e/ou uso de radiação, a fim de diminuir a patogenicidade nos hospedeiros (CRUZ *et al.*, 1997).

Na atualidade não há vacinas inativadas no mercado, apesar das tentativas que tem sido realizadas. A imunogenicidade de parasitas mortos provenientes de eritrócitos infectados com *B. bovis* foi primeiramente abordada por Mahoney e Wright (1976), no entanto, os animais vacinados mostraram proteção parcial quando desafiados com organismos heterólogos, desenvolvendo a infecção, apenas na forma sub-clínica.

No Brasil, nenhuma pesquisa a nível de campo foi realizada com produto similar, apesar que a tecnologia de produção para esta vacina já esteja amplamente dominada (PATARROYO *et al.*, 1995b).

### 3.5.3. Controle com exoantígenos

Animais quando vacinados com exoantígenos presentes no sobrenadante de culturas *in vitro* de *B. bovis* mostraram proteção parcial após desafio com organismos heterólogos, enquanto que animais inoculados com vacina viva mostram-se fortemente protegidos com altos níveis de anticorpos específicos por mais de seis meses. Entretanto, os índices de estimulação linfocitária e a taxa de proliferação celular, quando desafiados com amostras homólogas foram maiores e por períodos mais prolongados nos animais inoculados com exoantígenos de cultivo de *B. bovis* (TIMMS *et al.*, 1983; TIMMS e STEWARD, 1984).

Exoantígenos presentes em sobrenadante de cultivo de amostra atenuada de *B. bovis* foram capazes de induzir uma resposta imune protetora contra amostras virulentas heterólogas quando deasfiados (PATARROYO *et al.*, 1995a). Indicando que a vacina com antígenos solúveis de *B. bovis* derivados destes cultivos são capazes de elicitar tanto a resposta imune humoral quanto a celular (PATARROYO *et al.*, 1995a; TIMMS e STEWARD, 1984).

Brown *et al.* (1995), bem como Tuo *et al.* (1999) realizaram pesquisas afins de indentificarem proteínas de *B. bovis* que fossem imunogênicas e pudessem ser utilizadas na produção de vacinas formadas por subunidades protéicas. A utilização de exoantígenos em vacinas contra Babesioses é uma técnica promissora que tem sido analisada por alguns pesquisadores nos EUA (MONTENEGRO-JAMES *et al.*, 1990) e no Brasil por Patarroyo *et al.* (1995a).

#### **3.5.4. Proteínas Associadas a Roptrias (RAP)**

A família multigênica que codifica proteínas de 58-60 kDa, denominadas RAP, que estão associadas tanto à superfície dos merozóitos quanto às roptrias do complexo apical de *B. bovis* e *B. bigemina*, demonstram capacidade de estimular a resposta imune adaptativa tanto do tipo humoral quanto celular. As proteínas produzidas em organelas do complexo apical têm grande importância no processo de invasão do parasita na célula hospedeira (BROWN *et al.*, 1996).

O contato entre o merozóito e o eritrócito, se dá por orientação do pólo apical do merozóito à superfície da hemácia. Após a fusão das membranas, há liberação do conteúdo das roptrias, invaginação da membrana do eritrócito e entrada do merozóito que fica dentro do vacúolo parasitóforo. As roptrias são importantes para a adesão e invasão do parasita na hemácia (BROWN *et al.*, 1996), além da expansão e manutenção da membrana do vacúolo parasitóforo.

A roptria associada a proteína-1 (RAP-1) família gene homólogo inclui: *Babesia bovis*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. divergens* e a *B. ovis* (SKUCE *et al.*, 1996). Segundo Wright *et al.* (1992), a proteína RAP-1 é responsável pelo estabelecimento do parasitismo intra-eritrócito e é conservada em vários isolados de espécies geograficamente diferentes, além de

apresentar epítomos altamente imunogênicos para linfócitos B e células T-CD4<sup>+</sup> (PALMER *et al.*, 1991; SUAREZ *et al.*, 1991).

Embora alguns estudos mostrem que os epítomos da proteína RAP-1, para células B sejam mais antigênicas, normalmente eles não são conservados entre espécies diferentes e que seqüências altamente conservadas são pouco imunogênicas (SUAREZ *et al.*, 1993), Brown *et al.* (1996), demonstraram, não apenas, que a proteína RAP-1 de *B. bovis* é altamente imunogênica como também que os epítomos para células Th são conservados entre isolados geograficamente diferentes de *B. bovis*.

A significância imunológica de RAP-1 é indicada pela inibição do desenvolvimento *in vitro* de Babesia utilizando anticorpo monoclonal específico contra RAP-1 bem como pela habilidade deste em imunizar contra alterações do parasitismo no gado (FIGUEROA e BUENING, 1991; McELWAIN *et al.*, 1991). Então, uma vacina contra *B. bovis* constituída de subunidades protéicas deve conter epítomos T e B reativos, não sujeitos a variação antigênica, devendo ser reconhecidos por uma grande variedade de moléculas MHC-II, o que coloca a proteína RAP-1 como forte candidata para produção de vacina ( BROWN e PALMER, 1999).

### **3.5.5. Peptídeos sintéticos**

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

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

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

1995b). Portanto, o uso de peptídeos sintéticos como vacinas teria a vantagem de ser mais um produto químico que biológico (PATARROYO e GUZMAN, 2004).

Esta nova geração de vacinas tem sido estimulada devido a estudos de predição computacional, baseados na estrutura primária e nas características bioquímicas das proteínas para identificação de possíveis sítios antigênicos em vírus, bactérias, parasitas e células neoplásicas (DeLISI e BERZOFSKY, 1985; SPOUGE *et al.*, 1987).

Atualmente há um interesse crescente pelo uso de peptídeos sintéticos no campo da medicina preventiva, diagnóstico e controle, assim como na terapêutica tem sido alavancada com diferentes provações e a aprovação de outros fármacos pela FDA. Assim, existem peptídeos em fases clínicas de teste como adjuvantes, para imunização contra o *Plasmodium falciparum*, o *Boophilus microplus*, o *Schistosoma mansoni*, entre outros para o diagnóstico de malária, doença de Chagas, leishmanioses, fascioloses, hidatioses e cisticercoses, sendo o mais recente avanço a liberação do Fuzeon™ para o controle da AIDS (PATARROYO e GONZÁLEZ, 2004); isto, também, se dá devido ao fato dos peptídeos poderem ser sintetizados e serem muito estáveis à temperatura ambiente, a utilização destes pode melhorar a padronização e reprodutibilidade dos diferentes testes para sorodiagnóstico (PATARROYO, 1999).

Desenho de seqüências com determinante imunogênico de proteína de roptria de *B. bovis* (RAP-1 de *B. bovis*) foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV)/Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO)/Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esta proteína tem P.M. de 64,97 kDa e é composta de 565 a.a. foi sintetizada em 31 peptídeos diferentes, alguns com "overlap" entre uma seqüência e outra.

Os peptídeos foram catalogados no livro de seqüências de 5.067 até 5.097. Após o mapeamento de epítomos B e T de todos os peptídeos, utilizando experimentos "in vitro" e "ex vivo", realizou-se a hibridização dos peptídeos SBbo 5.084 (epítomo B) e do SBbo 5.081 (epítomo T) com adição de cisteína no N- e C- terminal, originando o peptídeo sintético SBbo 23290 (PATARROYO *et al.*, 1999). Estudos realizados por Jackson *et al.* (2000), demonstram que para um peptídeo ser considerado um bom imunógeno é necessária a união de epítomos T e B reativos em sua estrutura.

Contudo, o uso de seqüências curtas de peptídeos sintéticos no desenvolvimento de uma resposta imunológica para determinada proteína provém do mecanismo de reconhecimento de estruturas antigênicas pelos linfócitos T do sistema imune. Este processo não é alcançado a partir da forma nativa da proteína, se faz necessário algum tipo de

processamento metabólico no interior das células apresentadoras de antígeno (BERZOFSKY *et al.*, 1987).

O peptídeo sintético SBbo 23290 foi desenhado e sintetizado pelo Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em parceria com a Fundación Instituto de Immunologia de Colômbia (FIDIC), baseado na estrutura íntegra da proteína RAP-1 (PATARROYO *et al.*, 1999); possuindo uma conformação distinta das apresentadas pelos peptídeos de origem, além de possuir um maior número de aminoácidos em sua estrutura, provavelmente apresentar novos epítomos em sua estrutura resultando em uma alta antigênicidade.

Os resultados, obtidos por Freitas (2001), em experimento com células *ex vivo*, corroboram com este dado, pois a resposta ao peptídeo híbrido 23.290 foi caracterizado pelas maiores taxas de produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 por PBMCs, sendo então o peptídeo que apresentou maior reconhecimento celular.

A intervenção vacinal com o peptídeo sintético 23.290, derivado de RAP-1 de *B. bovis* reduz a taxa de mortalidade de animais imunizados, após o desafio com amostra patogênica, bem como a eficácia desta vacinação, estar associada ao desenvolvimento precoce da habilidade de desenvolver uma resposta antígeno específica envolvendo células B e linfócitos TCD4<sup>+</sup> (BITTAR, 2002).

De acordo com pesquisas realizadas no LBCHVV/BIOAGRO utilizando peptídeos sintéticos, conclui-se que, quando bem desenhados e convenientemente testados tais peptídeos comportam-se como uma proteína nativa; por tanto este trabalho tem por intuito realizar estudos sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunológica ao imunogêno sintético SBbo 23290.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de realização do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) do Departamento de Veterinária (DVT), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) e no isolamento contra artrópodes e vetores de hematozoários para bovinos, localizado no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

### **4.2. Animais**

Foram utilizados, nos ensaios de imunização, 12 bovinos da micro-região de Viçosa, *Bos taurus taurus* da raça holandesa, machos, com idade entre 4-5 meses; os quais foram verificados sorológica e hematologicamente como negativos para hemoparasitos.

Os bovinos foram confinados no isolamento a prova de artrópodes e vetores de hematozoários. Durante a realização da pesquisa os mesmos receberam diariamente ração balanceada com 17% de proteína e capim napier, duas vezes por dia, além de consumirem suplemento mineral. Durante todas as fases os bovinos receberam água à vontade.

### **4.3. Peptídeo sintético**

O peptídeo sintético 23290 (SBbo 23290) é baseado na estrutura íntegra da proteína associada a roptrias de *Babesia bovis* (RAP-1) em que foram desenvolvidos dois peptídeos sintéticos que induziram "in vitro" a produção de células T e células B (5081 e 5084, respectivamente) (PATARROYO *et al.*, 1999).

Este peptídeo foi desenvolvido e produzido pelo LBCHV/BIOAGRO/DVT/ UFV, em parceria com a Fundación Instituto de Imunología de Colômbia (FIDIC).

O peptídeo sintético SBbo 23290 foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Merrifield (1963).

### **4.4. Adjuvante**

Foi utilizado saponina (Saponine®) na dose de 1,5 mg/animal/dose.

### **4.5. Esquema de inoculação**

Os 12 animais utilizados no experimento foram agrupados, através de sorteio, em dois grupos de quatro animais e um de três, mantidos em iguais condições ambientais. Esses animais foram inoculados por via subcutânea (sc) de acordo com o quadro abaixo. Sendo um animal para avivar a amostra.

Nº grupo	Nº animais	Inoculação (nº doses/via)	Intervalo	Produto
Peptíco	04	3x/sc	30 d	2 mg SBbo 23.290 1,5 mg saponina 2 mL H <sub>2</sub> O destilada
		1x/sc	90 dias após a 1ª inoculação	1 mg Sbbbo 23.290 1,5 mg saponina 2 mL H <sub>2</sub> O destilada
Saponina	04	4x/sc	30 d	1,5 mg saponina 2 mL H <sub>2</sub> O destilada
Controle	03	4x/sc	30 d	2 mL H <sub>2</sub> O destilada

#### 4.6. Infecção – desafio

Uma amostra virulenta de Bbo UFV1, sétima passagem, mantida sob criopreservação em nitrogênio líquido no LBCHV/BIOAGRO, foi descongelada para o experimento. Após o descongelamento, o parasito foi inoculado em um bezerro para reativação do mesmo. Quando a parasitemia alcançou 1,4% coletou-se o sangue para ser usado como inoculo nos animais do experimento.

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 receberam 1,0 mL de sangue contendo  $1,2 \times 10^6$  hemácias infectadas por mL, como inoculo de desafio por via endovenosa. O desafio foi realizado 60 dias após a última inoculação.

#### 4.7. Avaliação clínica dos animais

No isolamento, diariamente, os animais do experimento foram inspecionados clinicamente no momento da distribuição do alimento, antes de serem desafiados.

Após o desafio, os animais foram avaliados, também, por exame físico (aferição da temperatura) e laboratorial – determinação do hematócrito<sup>1</sup> esfregaços sangüíneos e mensuração da hemoglobina<sup>2</sup>. O período de análise da pós-inoculação, com a cepa virulenta de *B. bovis*, compreendeu 18 dias, nos quais a averiguação da temperatura dos animais ocorreu diariamente (2 x /dia). Os dados obtidos foram analisados em conjunto, a fim de avaliar a necessidade de intervir com medicamentos para cada animal, após serem comparados com os parâmetros normais da espécie bovina.

Sendo tratados da babesiose, apenas os bovinos que apresentavam hematócrito inferior a 12% e, ou, babesiose cerebral e cuja droga de eleição foi o diaceturato de 4,4 diazoaminodibenzamidina<sup>3</sup> na dosagem de 3,5 mg/kg/pv por via intramuscular em dose única.

#### 4.8. Coleta de sangue dos animais para obtenção de soro

Esta foi realizada semanalmente, durante seis meses, sendo a primeira coleta feita no dia zero – um dia antes da primeira inoculação.

O sangue foi coletado por punção na veia jugular em tubos de 5 mL (Venoject®), sem anticoagulante e mantido em geladeira por aproximadamente 12 horas, no LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV e outro frasco com EDTA. Para realização das análises hematológicas. A obtenção do soro ocorreu por centrifugação do material (1.500 rpm) após a retirada do coágulo, posteriormente aliquotado em tubos "eppendorf" e armazenados a -20°C até a sua utilização.

---

<sup>1</sup> Microcentrifuga

<sup>2</sup> Kit cianeto

<sup>3</sup> Ganaseg.

## **4.9. Teste imunoenzimático (ELISA)**

### **4.9.1. Teste de ELISA para pesquisas de anticorpos anti-peptídeo SBbo 23290**

O teste imunoenzimático – ELISA foi realizado de acordo com o protocolo de rotina do LBCHV para pesquisa de anticorpos anti-peptídeo SBbo 23290 no soro dos animais do experimento.

Sensibilizou-se as placas de ELISA a 4°C por 12 horas com o peptídeo SBbo 23290 (1 µg/cavidade) diluídos em Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,293 g de NaHCO<sub>3</sub> e água destilada q.s.p. 100 mL). Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0 g de cloreto de sódio; 500 µL de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1.000 mL), seguido por um bloqueio com solução de caseína 2% em PBS pH 7,6 (8,5 g de NaCl; 1,28 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,16 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O a água destilada q.s.p. 1.000 mL) por 60 minutos em temperatura ambiente.

Repetiu-se as lavagens e adicionou-se os soros dos animais testados diluídos 1:400 em Tampão de Incubação (100 mL de PBS pH 7,6; caseína 0,25% e Tween 20 0,05%). Ficou incubada por duas horas a temperatura ambiente, as placas foram lavadas seis vezes com Tampão de Lavagem e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (IgG de coelho anti-IgG bovina-peroxidase) diluído de acordo com a recomendação do fabricante em Tampão de Incubação. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas.

Realizou-se mais seis lavagens das placas com Tampão de Lavagem. Para revelação do teste, adicionou-se o substrato composto de uma solução contendo 4 mg de OPD (ø-fenildiaminobenzeno), 2,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mL de Tampão de Substrato pH 5,0 (7,19 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,19 g de ácido cítrico e água destilada q.s.p. 1.000 mL) e incubou-se na ausência da luz durante 20 minutos.

A reação foi paralisada com 30 µl de ácido sulfúrico 1:20 e, em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 492 nm.

#### 4.9.2. Teste de ELISA para a detecção de IgG1 a IgG2 bovina

Para avaliar a cinética da produção de IgG1 e IgG2 em bovinos inoculados com soro fisiológico, saponina e peptídeo SBbo 23290 realizou-se o teste de ELISA segundo o protocolo descrito por González (2003), com modificações. Os testes foram realizados em triplicatas, sempre utilizando soros dos grupos controle, saponina e vacina para cada coleta.

As placas de ELISA MaxSorpNunc® foram sensibilizadas com o peptídeo SBbo 23290 (2µg/cavidade) diluídos em Tampão Cobertura pH 9,6 (0,53 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e água destilada q.s.p. 100 mL o tempo de adsorção será de uma hora a temperatura ambiente.

Em seguida foram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (6,055 g de Tris; 8,18 g de NaCl; 500 µl de Tween 20 e H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1.000 mL) e bloqueadas com solução bloqueio (idem Tampão de Lavagem) por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e os soros dos animais do experimento foram diluídos 1:100 em Tampão de Diluição (idem Tampão de Lavagem) e incubados por uma hora à temperatura ambiente.

Realizou-se mais duas lavagens e, em seguida, adicionou-se o conjugado (ovelha anti-IgG1 ou IgG2 bovina conjugado com peroxidase) diluído em Tampão de Diluição 1:30000 e 1:30000, respectivamente.

Depois de incubar por 60 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lavadas mais três vezes e incubadas por um período de 30 minutos na ausência de luz a temperatura de 28 °C com Solução Reveladora contendo 4 mg de O.P.D. (θ-fenildiaminabenzeno), 2,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mL de Tampão de Substrato pH 5.0.

Finalmente a reação foi interrompida com 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M e as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.10. Parâmetros pesquisados na avaliação da proteção**

A fim de avaliar o efeito do desafio nos bovinos do experimento, realizou-se uma avaliação imunológica medindo o título de anticorpos, bem como, o acompanhamento dos seguintes parâmetros:

- Período pré-patente;
- Parasitemia;
- Temperatura;
- Duração da febre
- Hematócrito;
- Hemoglobina;
- Duração da anemia.

O título de anticorpos foi mensurado semanalmente durante 26 semanas, os demais parâmetros no 5º dia pós desafio e diariamente entre o 7º e o 18º dia pós desafio.

#### **4.11. Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e posteriormente a análise de variância. Apresentando significância foi realizado o teste de Duncan. Não atendendo as premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kurskal Wallis (SAEG, 1999).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação do perfil hematológico e parasitológico dos bovinos experimentais.

#### 5.1.1. Avaliação hematológica e parasitológica dos bovinos imunizados.

Todos os bovinos envolvidos no experimento mantiveram-se no isolamento à prova de artrópodes da Universidade Federal de Viçosa, encontrando-se livres de babesia e seus vetores durante o decorrer da imunização; fato este comprovado por pesquisa do parasita em esfregaços sanguíneos e de anticorpos anti-babesia bovis.

Na atualidade, provavelmente a maneira mais eficaz, e economicamente viável, de obter proteção imune contra patógenos, exceto resistência genética, seria a aplicação de vacinas eficazes.

Entretanto, o desenvolvimento destas ainda é um desafio para vários grupos de pesquisa que buscam controlar a babesiose através da vacinação (TIMMS e BARRY, 1988; PATARROYO, 1991; FREITAS 2001; GONZÁLEZ, 2003).

A avaliação do grau de proteção imune conferida por uma vacina encontra dificuldade nos tipos de exames que poderiam ser executados. Segundo Brown, *et al.* (1995), a imunidade protetora para *B. bovis* deve ser avaliada pelo mecanismo imune, humoral e celular, visto que uma vacina eficiente deverá estimular a ambas. Conseqüentemente, a análise da eficácia de uma vacina deve ser feita baseada na resposta imunológica, além de análises paralelas das alterações de parâmetros tais como parasitemia, temperatura, hematócrito, hemoglobina, contagem de hemácias e sinais clínicos.

Os parâmetros acima mencionados foram efetivados semanalmente durante o período de imunização e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A falta de isogenicidade dos animais mesmo dentro de uma raça, constitui outro empecilho, pois as respostas não são uniformes, provavelmente devido a característica polimórfica dos genes que codificam as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC), o qual apresenta o maior nível de polimorfismo e heterozigocidade descrito para qualquer organismo (HUGHES e YAGER, 1998). A função das moléculas codificadas por esse complexo, glicoproteínas expressas em superfícies celulares, é a de apresentar peptídeos antigênicos a receptores de linfócitos T, passo essencial para a indução da resposta imune (ELLIS, 2004).

### **5.1.2. Avaliações parasitológica e hematológica pós-desafio com amostra virulenta de *B. bovis* em bovinos imunizados.**

Foi constatado uma elevação da mesma a partir do 2º dia Pós-Desafio (P.D.). Já os parâmetros hematológicos foram avaliados no 5º dia P.D. e diariamente a partir do sétimo dia até o 18º P.D.

Quanto aos parâmetros sorológicos, estes continuaram sendo analisados semanalmente após o desafio durante três semanas.

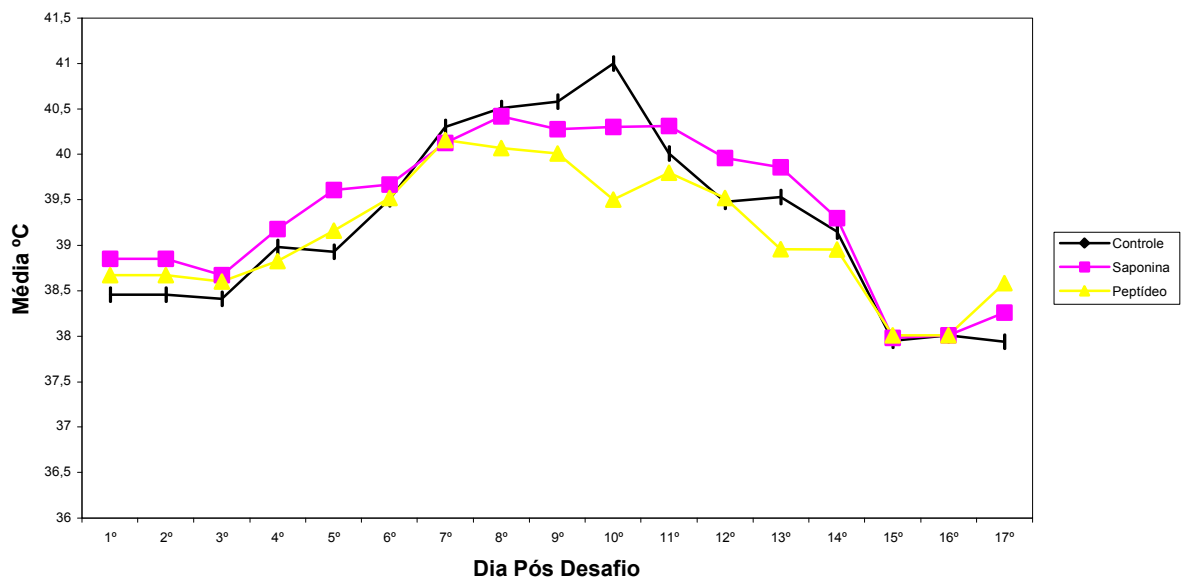
#### **5.1.2.1 Febre**

Considerando como limite febril mínimo 39°C observou-se que a duração média da febre foi de 7 dias para os animais do grupo peptídeo e de 11 dias para os grupos saponina e controle, os dados obtidos neste experimento concordam com os reportados por Bittar (2002). Sendo que os mesmos contrastam com os observados por Patarroyo (1991), que constatou 8,6 dias para o grupo controle, 6,5 dias para o grupo saponina e de 1 dia para o grupo vacinado.

Sendo que a média das temperaturas máximas observada no grupo controle do experimento foi de 41°C no 10º dia P.D., no grupo saponina a média foi de 40,5°C no 8º dia pós-desafio e no grupo peptídeo de 40,1°C no sétimo dia pós-desafio (Figura 1). Estes dados

concordam com Mahoney (1977), que relata a elevação da temperatura com aumento da parasitemia alcançando o máximo de 41°C –41,5°C.

Conforme Ristic (1988) a elevação da temperatura ocorre em função da liberação de antígenos solúveis pirogênicos, após o rompimento das hemácias devido a multiplicação do parasito no interior das mesmas. A febre também pode dever-se a resposta inflamatória gerada em função da anóxia tecidual resultante da obstrução dos vasos que acarreta necrose e liberação local de fatores pró-inflamatórios que induzem a quiomiotaxia e a diapedese de leucócitos (LOSOS, 1986; WRIGHT *et al.*, 1989).



**Figura 1.** Média da temperatura (°C) dos grupos durante 18 dias pós desafio com amostra de *B. bovis*.

### 5.1.2.2. Período Pré-Patente

A identificação de merozoítos de *B. bovis* foi observado no 8º dia P.D. nos grupos controle e saponina, através de exame direto, em esfregaço sangüíneo fino de sangue periférico (sangue periférico), e/ou jugular. O parasito permanece detectável até o 17º dia P.D. no grupo controle (Figura 2).

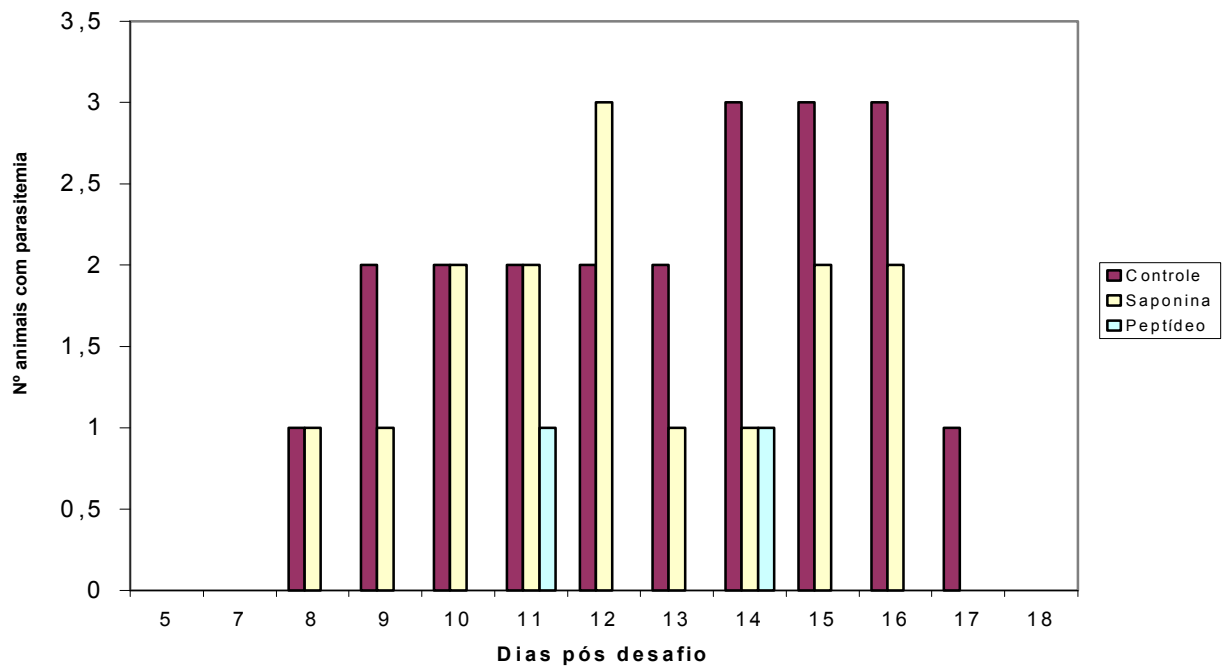
O período pré-patente e de incubação pode variar extremamente após a inoculação do sangue infectado com *B. bovis*, pois dependem do número de organismos viáveis inoculados (ZAUGG, 1993) e da rota (MAHONEY, 1977).

### 5.1.2.3. Parasitemia

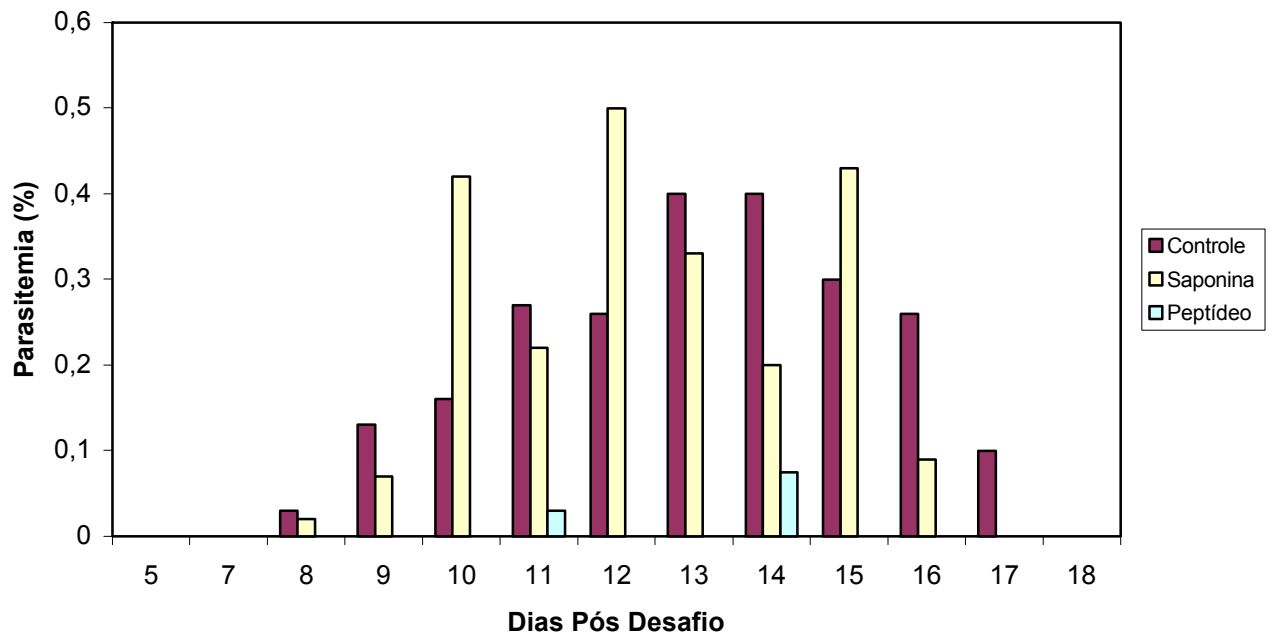
Detectou-se parasitemia em apenas um animal pertencente ao grupo peptídeo, em três do grupo saponina e em todo do grupo controle concordando com dados obtidos por Patarroyo (1991).

A parasitemia observada no animal imunizado foi mais branda (figura 3), estando de acordo com trabalhos realizados por Wright *et al* (1992), que também demonstram a redução de parasitemia em animais imunizados com proteínas de RAP-1 e posteriormente desafiados com *B. bovis*. Grupos de pesquisa em babesiose têm conseguido diminuir a parasitemia, o volume globular e a duração da hipertermia mediante aplicação de vacinas com RAP-1 de *B. bovis* (PATARROYO *et al*, 1999).

O perfil da parasitemia observada após o desafio com amostra virulenta de *B. bovis* seguiu o curso típico da doença, ocorrendo entre o 8º e o 10º dia P.D. estando de acordo com Friedhoff (1999). A duração da parasitemia observada no grupo controle foi de 10 dias, no grupo saponina de 9 dias e no grupo peptídeo de 1 dia (Figura 2).



**Figura 2.** Período pré-patente e a parasitemia no período pós-desafio com amostra virulenta de *B. bovis*.



**Figura 3.** Porcentagem da parasitemia no período pós-desafio com *B. bovis*.

#### 5.1.2.4. Anemia

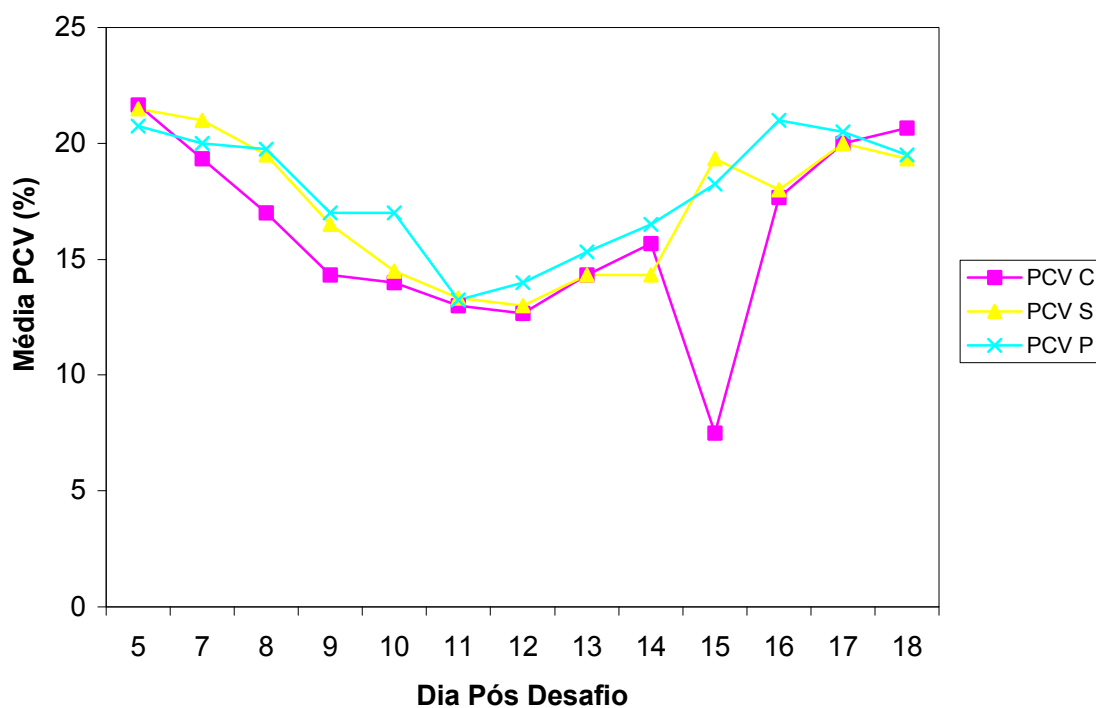
Considerando-se como anemia a perda mínima de 40% do volume globular pré-desafio, foi constatada a presença da mesma em todos os grupos a partir do 4º dia pós-desafio, porém com duração e intensidade distintas.

Anemia na babesiose pode ocorrer muito rapidamente e é causada pela destruição intravascular de eritrócitos e pela liberação de merozoítos após a multiplicação intra-eritrocitária das babesias (WRIGHT, 1981).

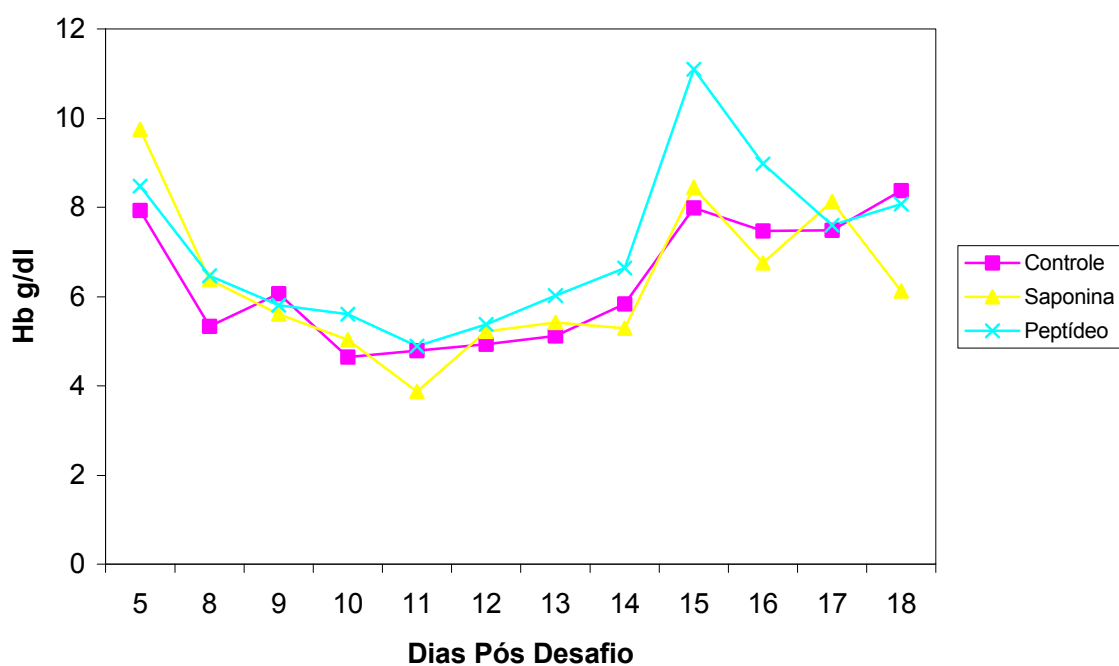
O baço e o fígado aceleram a atividade fagocitária do sistema monocítico na babesiose e também eleva a taxa de retirada de eritrócitos normais contribuindo para a anemia (MAHONEY, 1977). A depressão do volume globular foi expressa como sendo a média máxima baseada no valor anterior a pré-infecção (MCLELLAN, 1998).

Um animal do grupo saponina veio a óbito no 11º dia P.D. apesar de não ter sido detectado a presença do parasito na sua circulação sangüínea periférica; entretanto o mesmo apresentava perdas superiores a 60% nos parâmetros hematológicos pesquisados. Losos (1986), sugere que a morte nessa condição ocorra devido a redução significativa do hematócrito, traduzida e provocada pela estase sangüínea e hipotensão, além da anemia que dificulta o suprimento de oxigênio nos tecidos.

A imunização com o peptídeo sintético SBbo 23290, minimizou os efeitos clínicos da babesiose, uma vez que atingiram um período de baixa nos valores hematológicos (hemoglobina e volume globular) o grupo peptídeo obteve uma recuperação precoce quando comparado aos demais grupos. Conforme pode ser observado nas figuras 4 e 5.



**Figura 4.** Volume globular (%). Valores em média por grupo do experimento, após o desafio com *B. bovis*.



**Figura 5.** Produção de hemoglobina pós-desafio com *B. bovis*. Valores médios por grupo.

#### 5.1.2.5. Necropsia

O óbito na babesiose pode ocorrer devido a anemia intensa (LOSOS, 1986), que nesse caso apresentava-se marcante (>60%) e com tudo não foi detectado a presença do parasita no sangue circulante. A explicação mais plausível é que animais infectados com *B. bovis* podem apresentar problemas neurológicos, ataxia, crises convulsivas, coma e morte (MAHONEY e MIRRE, 1997), caracterizando o quadro de babesiose cerebral, fatal na maioria dos casos (AIKAWA *et al*, 1992).

A necropsia do animal morto do grupo saponina revelou várias alterações características da babesiose. Macroscopicamente observou-se que as mucosas e o tecido subcutâneo encontravam-se amarelados e edemaciados além de hepatoesplenomegalia. O fígado encontrava-se icterico, com a vesícula repleta de bile espessa e escura. Os rins se mostravam congestos e a bexiga distendida contendo urina de coloração vermelho-escura.

Os vasos sanguíneos cerebrais apresentavam-se congestos; tais dados condizem com aqueles observados por Patarroyo (1991), Wrigth e Goodger (1988) e Zaugg (1999). Microscopicamente, foi constatada a presença de hemácias parasitadas por *B. bovis* nos capilares cerebrais, através “imprint” do cérebro. Mahoney (1977) relata que este parasita tem predileção por capilares do cérebro e do rim.

#### 5.1.2.6. Sobrevivência

A taxa de sobrevivência dos animais do experimento foi elevada, tanto no grupo controle quanto no peptídeo não houve casos fatais. Entretanto, os animais sobreviventes que não faziam parte do grupo peptídeo encontravam-se bastante debilitados.

Ocorreu perda de peso acentuada em todos os animais do grupo controle, em dois do grupo saponina e em apenas um animal imunizado; dados semelhantes foram obtidos por Patarroyo (1991), cuja perda média do grupo controle foi de 5,80 kg ao testar uma vacina com exoantígenos obtidos de cultura de *B. bovis*; sendo o desafio realizado 30 dias após a imunização.

O quadro clínico de babesiose ocorreu em 1 animal do grupo peptídeo, em 3 do grupo saponina e em todos os animais do grupo controle, após serem desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*, concordando com Bittar (2002).

Animais sobreviventes a este desafio, desenvolvem mecanismo de imunidade protetora que controla o parasita; esses eventos imunoprotetores são caracterizados pela expansão de células B, produção de IgG específica anti-*B. bovis* (BITTAR, 2002).

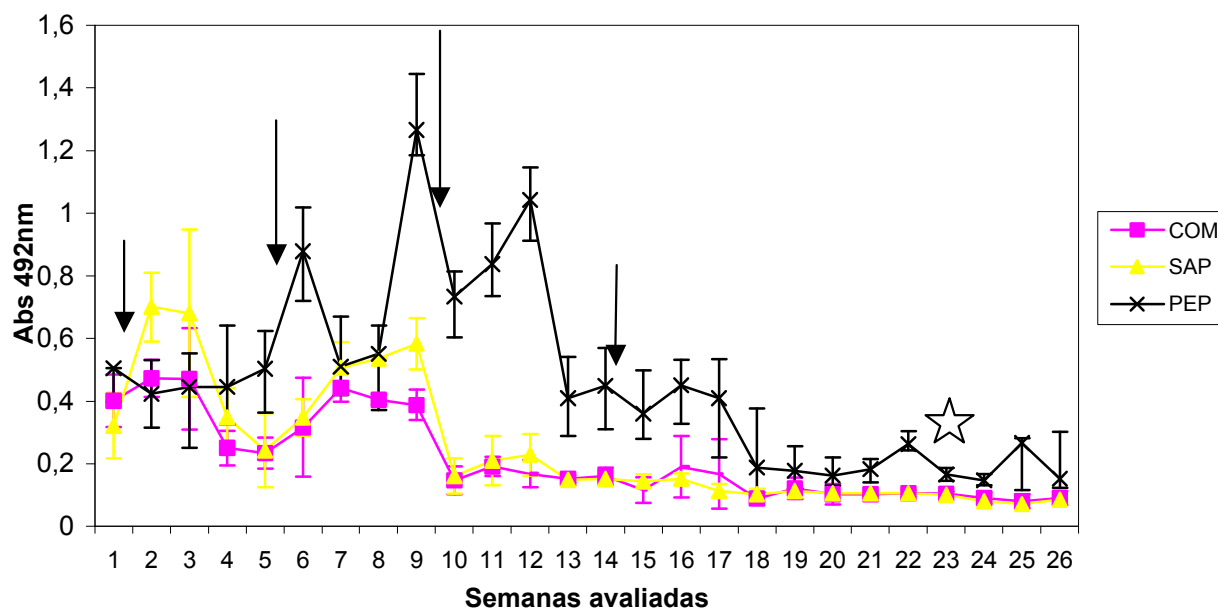
## **5.2. Resposta humoral dos animais experimentais**

### **5.2.1 Avaliação sorológica para pesquisa de IgG anti-SBbo 23290**

A técnica de ELISA empregada no experimento foi eficaz na identificação de anticorpos específicos anti-SBbo 23290 mostrando uma cinética de resposta imune IgG clássica, bem como indicou a especificidade do teste ao se constatar que o grupo controle manteve um nível basal de reatividade específica anti- SBbo 23290 semelhante aos soros pré- imunes (Figura 6).

Não houve diferença acentuada entre os grupos controle, saponina e peptídeo até a 2º semana após a primeira inoculação, a partir da qual foi observado um aumento progressivo na Densidade Óptica (D.O.) para os animais do grupo peptídeo e sem soroconversão para os animais do grupo saponina e controle, mantendo-se assim por todo experimento.

No grupo de animais imunizados o nível de IgG elevou-se significativamente após cada inoculação, atingindo o máximo de D.O. oito semanas após a primeira imunização; conforme pode ser observado na figura 6.



**Figura. 6.** Cinética da produção de IgGs em bovinos imunizados com SBBo 23290. Valores em média das absorvâncias de IgGs antígeno- específicos em animais imunizados e controles. Os locais indicados pelas setas correspondem as imunizações e o símbolo representado pela estrela o dia de desafio.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo imunizado (peptídeo) com o saponina, bem como o controle, que encontra-se representada na figura 6. Entretanto, não ocorreu diferença significativa entre o grupo controle inoculado somente com a água MILLIQ e o grupo controle de adjuvante inoculado com saponina, indicando que a mesma como adjuvante adaptável para o tipo de imunização aplicada.

Na primeira coleta após a primeira imunização não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de absorvância entre o grupo controle, grupo saponina, e o grupo vacinado, possivelmente devido ao fato de que a resposta imune após a 1ª inoculação corresponde a uma resposta primária, onde se tem a estimulação dos clones de linfócitos B reativos aos epítopos dos peptídeos, sendo pela primeira vez mais lenta, e menos intensa com uma produção baixa, ou até indetectável de imunoglobulinas da classe G.

Ao contrario, a resposta imune secundária é mais rápida, duradoura e caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos antígeno-específico (TIZZARD, 2000). Como pôde ser observado pelo incremento das IgG após as imunização conseqüentes.

Uma semana após a 2<sup>a</sup> inoculação, houve resposta de memória rápida, na qual houve aumento significativo a partir da 2<sup>a</sup> semana e na 3<sup>a</sup> inoculação, sendo a resposta maior e mais persistente. Isso se deve basicamente ao rápido processamento por parte das células apresentadoras de antígeno e a rápida apresentação às células TCD4+ (ABBAS *et al*, 2003), principalmente Th2, quando se estuda a resposta imune mediada por anticorpos.

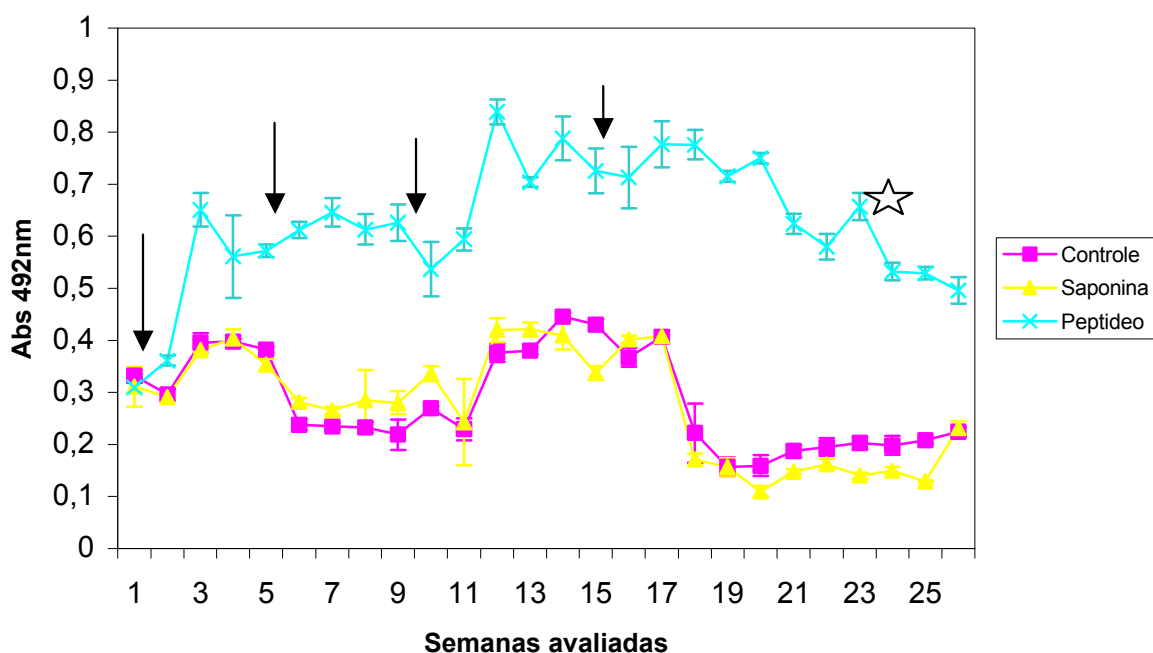
Sabendo-se que a *B. bovis* é um parasito intracelular obrigatório dos glóbulos vermelhos e que estes não possuem MHC, logo células TCD4+ constituem o elo de ligação entre ambas as respostas imunológicas. Segundo Bittar (2002), a eficácia da vacinação, empregando o peptídeo sintético 23290, está associada ao desenvolvimento precoce da habilidade de desenvolver uma resposta antigênica específica envolvendo células B e linfócitos TCD4+.

Sendo assim a cinética de resposta ao peptídeo 23290 demonstrada, apresentou uma curva clássica de resposta de IgG, mostrando uma resposta intensa alcançando a produção máxima entre a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> semana após cada inoculação e declinando em seguida.

### **5.2.2. Avaliação de secreção de IgG1 e IgG2 em soro de bovinos imunizados com peptídeo sintético anti-*B. bovis* 23290.**

O estudo da cinética de IgG1 e IgG2 constitui-se em uma valiosa ferramenta para avaliação da resposta imune protetora contra a *B. bovis*, visto que, estas imunoglobulinas são importantes no controle de infecção devido a sua capacidade opsonizante além de promoverem a fagocitose pelos macrófagos, e proteger o animal por longos períodos após o contato com o parasita (BROWN e PALMER, 1999).

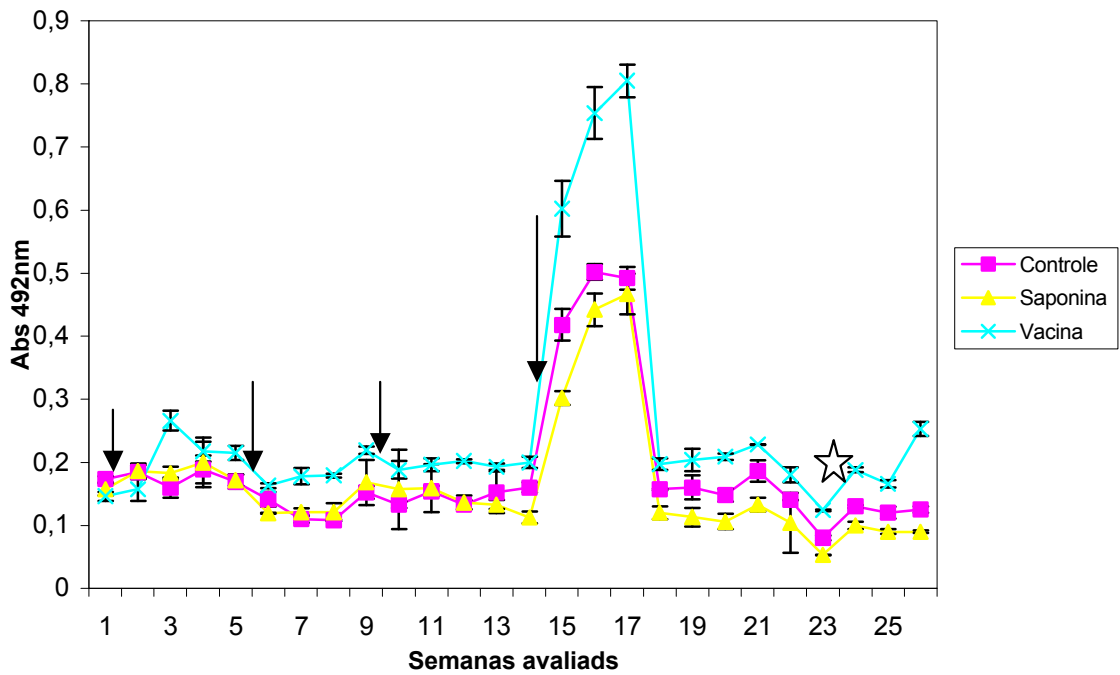
Neste estudo o nível de IgG1 apresentou-se aumentado após a primeira inoculação nos animais do grupo peptídeo, atingindo a resposta máxima na 2<sup>a</sup> semana após as inoculações, permanecendo elevado até a última data de coleta de soro do experimento (Figura 7).



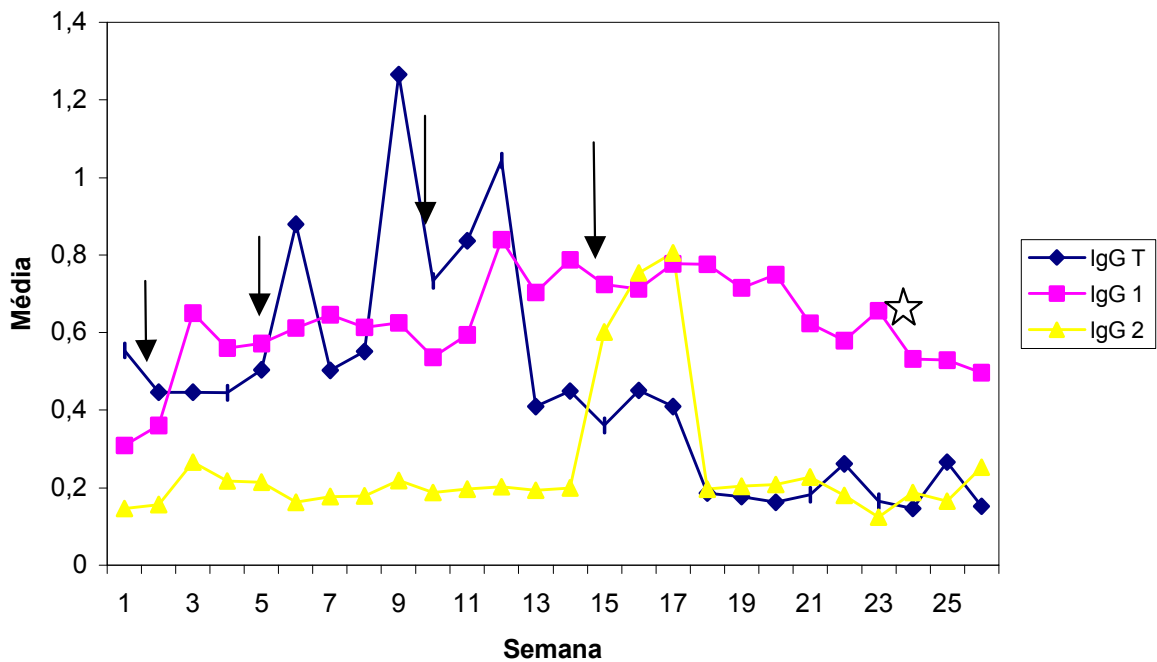
**Figura 7.** Cinética da produção de IgG1 em bovinos imunizados com SBbo 23290. Valores em médias das absorvâncias de IgG1 em animais imunizados; as barras em T representam os desvios padrões para mais e para menos. As setas indicam as inoculações e a estrela o desafio.

Mister, ressaltar que houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo peptídeo, tanto nos animais do grupo controle, como aqueles pertencentes ao grupo saponina em relação a resposta IgG1 bem como IgG2. Entretanto, para ambas as respostas de IgGs não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo saponina (Figura 8); tornando explícito o elevado potencial imunogênico desta vacina sintética SBbo 23290.

O nível de IgG2 permaneceu inferior ao de IgG1, durante grande parte do experimento, exceto entre a 14<sup>a</sup>/18<sup>a</sup> semanas logo após a quarta imunização (Figura 9). Possivelmente, deve-se ao perfil de citocinas estimuladas que são diretamente influenciadas pela imunidade adaptativa, a qual é dependente de linfócitos T auxiliares (Th), contribuindo na estimulação de linfócitos B a produzirem imunoglobulinas de alta afinidade (IgG1 e IgG2) e na ativação de macrófagos (BROWN, 1999; KUMARATILAKE e FERRANTE, 1992; FELL *et al.*, 1994).



**Figura 8.** Cinética de produção de IgG2 em bovinos imunizados com SBbo23290. Valores em médias das absorvâncias de IgG2 nos animais avaliados.



**Figura 9.** Cinética da produção de IgGs e isótipos IgG1, IgG2 em bovinos imunizados com SBbo 23290. Valores em médias das absorvâncias de IgG total, IgG1 e IgG2 antígenos- específicas em animais imunizados.

Com o intuito de caracterizar a resposta imune humoral quando o teste de ELISA foi realizado com anticorpos isotípos específicos (IgG1 e IgG2) foi constatada a predominância (estatisticamente diferente) tanto de IgG1 quanto de IgG2 em relação aos grupos controle. Entretanto os níveis de IgG1 prevaleceram após a imunização com o SBbo23290; Com relação à cinética, os níveis de ambas seguiram normalmente em relação às imunoglobulinas totais (Figura 9). Em trabalhos realizados por Brown (1999), com *Anaplasma marginale* mostrou a expressão dos dois tipos de IgG devido a co-expressão das citocinas.

Experimentos *in vivo* comprovaram as funções efetoras dos macrófagos ativadas e dos linfócitos TCD4+ na imunidade protetora contra *B. bovis*. A administração de soro hiper-imune ou misturas equivalentes de IgG1 e IgG2, após quatro dias de infecção com *B. bovis*, reduziu significativamente os níveis de parasitemia em bovinos esplenectomizados (MAHONEY *et al.*, 1979); esses anticorpos *in vivo* agem como opsoninas para macrófagos ativados (MAHONEY, 1986).

Em bovinos tanto a IgG1, quanto a IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação a IgG1 (McGUIRE, 1979).

Neste trabalho a imunização com o peptídeo SBbo 23290 utilizando saponina como adjuvante, induziu um incrementado nível de IgG1 e reduzidos de IgG2 antígeno-específico; pactuando com obtidos por Freitas (2001). Segundo Valle *et al.* (2001), a saponina como adjuvante eleva a produção de IgG2 e induz a redução de IgG1; entretanto tal desempenho não foi manifestado nessa pesquisa.

De fato, como constado aqui, a diferença na relação IgG1/IgG2 foi tão alta demonstrando a predominância da IgG1 sobre a produção de IgG2, após o processo de imunização com o SBbo 23290; resultados semelhantes foram relatados por González *et al.* (2004) e Patarroyo *et al.* (2002), porém com outro imunogeno sintético, SBm7462, contudo utilizando o mesmo adjuvante.

Pertmer *et al.* (1996), consideram que a expressão de subclasses de imunoglobulinas, sem o mensuramento de citocinas pode não ser um indicador factível de reação tipo Th1 ou Th2, pois dependendo do antígeno pode haver expressão ou co-expressão de citocinas (GOFF *et al.*, 2002).

Mesmo que não tenha sido a finalidade deste trabalho, delinear o perfil das citocinas presentes no soro dos animais avaliados, as altas concentrações de IgG1 podem estar relacionadas com a produção de IL-4, suficiente para estimular a elevação da produção desta imunoglobulina, bem como a concentração de IgG2 pela produção de IFN- $\gamma$  ou ocorrendo a

co-expressão destas citocinas pela indução da resposta Th (Th0, Th1 e Th2). Segundo Brown *et al.* (1999), discutindo o papel das citocinas na infecção por hematozoários, afirma que a IL-4 induz o aumento da produção de IgG1 pelas células B reativas.

Trabalhos realizados por Estes e Brown (2002), sugerem que a resposta dominada pela produção de IgG1 é consistente com uma resposta Th2, uma vez que este isótipo se encontra associado à estimulação de clones dos linfócitos B por linfócitos Th2 e afirmam que a polarização de células TCD4 + Th 2 ocorre durante a ausência de níveis suficientes de citocinas polarizadas, IL-12 e IL-18. Esta mudança também é induzida pela IL-4, enquanto que o IFN- $\gamma$  estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995).

Sabe-se que clones de células Th produtoras de IFN- $\gamma$ , específica para RAP-1 de *B bigemina*, induzem elevação nos níveis de IgG2 produzidos por linfócitos B e que células Th0, capazes de co-expressar IL-4 e IFN- $\gamma$ , ativam sinais co-estimuladores necessários para o aumento da síntese de IgG1 e IgG2 por células B. Ainda é pouco conhecido o efeito inibidor de IL-4 sobre citocinas Th1, além da mesma ser produzida por clones células bovinas tipo Th0, Th1, Th2 (BROWN, 1999).

Como pode ser observado na figura 9 o nível de IgG2 elevou-se logo após as inoculações. Embora a concentração máxima tenha sido atingida na 17<sup>a</sup> semana, é notório o aumento pós-vacinal após a 4<sup>a</sup> inoculação; a produção de IgG2 foi proporcionalmente maior quando comparada a dosagem de IgG1 para o respectivo grupo neste intervalo.

O peptídeo sintético SBbo 23290 induziu elevados níveis de IgG e seus isótipos IgG1 e IgG2, ambos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controles.

Brown e Palmer (1999), quando postulam os mecanismos de proteção contra *B. bovis*, afirmam que o IFN- $\gamma$  atua estimulando a produção de IgG2. O rápido aumento nas concentrações de IgG2 e os níveis mais baixos de IgG1 sugerem uma elevação da produção de IFN- $\gamma$  *in vivo* quando comparada a outros períodos.

Estudos *in vitro*, demonstraram que linfócitos TCD4+ antígeno-específico são essenciais na indução da produção de IgG1 e IgG2 por linfócitos B. Desta forma, os níveis aumentados tanto de IgG1, quanto de IgG2 no presente experimento, indicam que houve ativação e seleção clones de células T CD4+ específicos contra antígenos de *B. bovis*, os quais mediarão a produção e secreção de imunoglobulinas por linfócitos B (BROWN e PALMER, 1999).

A IL-10 humana recombinante supera a proliferação de linfócitos T em bovinos e a produção de IFN- $\gamma$ , sendo esse efeito dependente de células apresentadoras de antígenos (APC), possivelmente macrófagos. Essa citocina tem importante papel na imunorregulação da infecção com *B. bovis* (CHITKO-McKOWN *et al*, 1995). Os polimorfismos para essa citocina foram identificados em bovinos (BEEVER *et al*, 1997).

A função das glicoproteínas expressas em superfície celular, pelo MHC são essenciais na identificação e regulamentação da imunidade adaptativa (GERMAIN, 1994), por apresentarem peptídeos sintéticos a linfócitos T.

O alto grau de polimorfismo do MHC (classe I e II) encontra-se associado a localização de seus genes, e relacionado a doenças autoimunes, doenças infecciosas e a resposta a imunizações (YOSHIKAWA *et al.*, 2002).

O MHC é fundamental na apresentação de antígenos por parte de APC, possibilitando a comunicação bioquímica entre células do sistema imune para o reconhecimento de antígenos próprios e não próprios (HUGHES e YAGER, 1998). Sendo assim, é provável que o fenótipo do MHC II influencie sua eficácia; fatores genéticos afetam a resposta na interação gênica do MHC desta classe, importantes mecanismos inatos no controle de elementos genéticos ligados a MHC (BALLINGLA *et al*, 2004).

Embora ainda pouco estudado, o polimorfismo do sistema imune bovino revela muitos aspectos sobre a interação patógeno-hospedeiro em nível molecular, ampliando o entendimento da apresentação das porções peptídicas pelo MHC, sendo de fundamental importância na montagem da resposta imune, visto que exerce influência direta na apresentação de epitópos às células TCD4+.

O impacto biológico num hospedeiro desse polimorfismo é tanto, que proporciona a predominância da imunidade humoral ou celular, conseqüentemente a resistência a um determinado patógeno. A proteção pela heterozigosidade do MHC, visa a proteção da população e não do indivíduo, visto que genes envolvidos no sistema imune do hospedeiro são os que mais rapidamente evoluem, sendo este o sistema fisiológico que apresenta o maior número de polimorfismo (HULL, 1998).

## 6. CONCLUSÕES

- A resposta imune humoral estimulada pelo SBbo23290 foi caracterizada pela predominância de anticorpos antígeno específico da classe IgG1.
- A intervenção vacinal realizada com o SBbo 23290, tendo como adjuvante a saponina, foi capaz de estimular o sistema imune dos bovinos imunizados.
- A proteção imune dos animais imunizados com o peptídeo sintético SBbo 23290 ocorreu de maneira efetiva, minimizando o impacto do parasito sobre o hospedeiro.
- A vacinação com peptídeo sintético 23290 em bovinos minimiza as perdas produtivas, inibindo os efeitos da infecção, além de evitar que os animais tornem-se portadores.

## 7. PERSPECTIVAS

- Testar o peptídeo sintético SBbo 23290 em bovinos com a dosagem de 1µg por animal.
- Analisar o mecanismo imunológico com ênfase na resposta celular dos animais inoculados com o imunógeno sintético SBbo 23290 e desafiados com amostra virulenta de *B. bovis*;
- Elaborar e testar uma vacina polivalente a base de peptídeos sintéticos, anti *B. bovis* e *Boophilus microplus*;
- Testar novos adjuvantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revienter Ltdap. p. 343-362, 2003.

AGUILAR-DELFIN, I.; HOMER, M.J.; WETTSTEIN, P.J.; PERSING, D.H. Innate resistance to Babesia infection is influenced by genetic background and gender. **Infect. Immun.**, p. 7955-7958, 2001.

AIKAWA, M. Human cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 39, n.1, p. 3-10, 1988.

AIKAWA, M., *et al.* The pathology of human cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, n.2, p. 30-37, 1990.

AIKAWA, M. *et al.* A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n.1, s. III, p. 297-301, 1992.

BALLINGALL, K.T.; LUYAI, A.; ROWLANDS, G.J.; SALES, J.; MUSOKE, A.J.; MORZARIA, S.P.; McKEEVER, D.J. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*2703 and DRB3\*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. **Inf. Immun.**, v. 72, p. 2738 – 2741, 2004.

BEEVER, J.E.; FISHER, S.R.; LEWIN, H.A. Polimorphism identification in the ACADM, AT3, IL-10, MYOG and TSHB genes of cattle. **Anim. genetics**, v.28, p. 373-374, 1997.

BERZOFSKY, J.A. *et al.* Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. Immunol Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. **Immunol. Rev.** 98, p. 9-52, 2004.

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

BOCK, R.E.; KINGSTONE, T.G.; DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

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

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

BROWN, W.C. *et al.* Characterization of helper T cell responses against rhoptry – associated protein 1 (RAP-1) of babesial parasites. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 271, p. 128-135, 1996.

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

BROWN, W.C, *et al.* Helper T-cell epitopes encoded by the *Babesia bigemina* rap-1 gene family in the constant and variant domains are conserved among parasite strains. **Infect. Immun.** v. 66, p. 1561-1569, 1999.

BUSHELL, G.; GARRONE, B.; GOODGER, B.; WRIGHT, I.; DALRYMPLE, B.P. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **Int. J. Parasitol.** v.21,n.5, p.609-611, 1991.

CAETANO, B.C. **Estudos de citoaderência “in vitro” de eritrócitos de bovinos inoculados com *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893) em células endoteliais de aorta bovina.** Viçosa: UFV, 2001, 76p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

CALLOW, L.L.; DALGLIESH, R.J.; DE VOS, A.J. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis – The longest field trial? *Int. J. Parasitol.*, v. 27, n.7, p. 747-767, 1997.

CALLOW, L.L.; MELLORS, L.T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepatent in splenectomised calves. *Austr. Vet. J.*, v. 43, p. 249-256, 1967.

CALLOW, L.L.; MELLOR, L.J.; MCGREGOR, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapide passage in splenectomised calves. *Int. J. Parasitol.*, v. 9, p. 333-338, 1979.

CHITKO-McKOWN, C.G., *et al.* Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin 2 receptor p55 chain and interferon-gamma, but not interleukin-2 or interleukin 4, by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatic*. *J. Interferon Cytok. Res.*, v.15, p.915-922, 1995.

CONRAD, P.A.; KJEMTRUP, A.M. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasit.*, n. 30, p. 1323-1337, 2000.

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

DE VOS, A.J.; BOCK, R.C. Vaccination against bovine babesiosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, n. 916, p. 540-545, 2000.

DELISI, C.; BERZOFSKY, J.A. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, p. 7048-7052, 1985.

DIMMOCK C.K.; BELL K. Haemolytic disease of the newborn in calves. **Aust. Vet. J.**, v. 46, p. 44-47, 1970.

ELLIS, S. The cattle major histocompatibility complex: is it unique? **Vet. Immun. Immunopathol.** v. 102, p. 1-8, 2004

EAST, I.J. *et al.* Vaccination against *Babesia bovis* T cells from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p. 1537-1545, 1997.

ESTES, D.M. *et al.* Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cell. Immunol.**, v. 163, p. 268-279, 1995.

ESTES, D.M. e BROWN, W.C. Type 1 and Type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 90, p.1-10, 2002.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution-1. The State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.95, p. 453-470, 2000.

FELL, A.H.; CURRIER, J.; GOOD, M.F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth *in vitro* by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from non-exposed donors. **Parasite immunol.**, v.16, p. 579-586, 1994.

FIGUEIREDO, E.A.P. Pecuária e agroecologia no Brasil. **Cad. Ciências e Tecnol.**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 235-265, 2002.

FIGUEROA, J.V.; BUENING, G.M. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. **Parasitology**, n. 100, p. 161-175, 1991.

FREITAS, C.M.B. **Resposta imune induzida por *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893): reconhecimento e ativação “ex vivo” de peptídeos sintéticos e eventos celulares em linfonodos bovinos.** Viçosa: UFV, 2001. 91 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

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

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **Int. J. Parasitol.**, v.20 p 525-535, 1990.

GERMAIN, R.N. MHC- dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell.**, v. 76, p. 287-299, 1994.

GOFF, W.L., *et al.* IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- $\gamma$  and TNF $\alpha$ -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Vet Immunol. Immunopathol.**, v.84, n3-4, p. 237-251, 2002.

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

GRAU, G.E. *et al.* Tumor necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. **Immunol. Rev.**, v. 112, p. 4970, 1989.

HERNÁNDEZ, M.X.S. **Fisiopatologia da *Babesia bovis*: moléculas de adesão expressadas em células endoteliais (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-SELECTINA e TROMBOSPONDINA)**. Viçosa: UFV, 2002. 96p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.

HOMER, M.J.; DELFIN, J.A.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol.**, n. 3, v. 13, p. 451-469.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 13, p. 451-469, 2000.

HUGHES, A.L.; YEAGER, M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Ann. Rev.Genetics**, v.32, p.415-435, 1998.

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

JOHNSON, W.C. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesicidal in vitro. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 23, p. 136-147, 1996.

KESSLER, R.H. *et al.* Tristeza parasitária dos bovinos. In: EMBRAPA. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Brasília, 2000.

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

LESLIE, D.S.; VINCENT, M.S.; SPADA, F.M.; DAS, H.; SUGITA, M.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. **Exp. Med**, v. 196, n.12, p. 1575-1584, 2002.

LEVINE, N.D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973. 406 p.

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

MADRUGA, C.R. Triste fim. **Revista Produtor Parmalat**, p. 13-16, jan. 2003.

MADRUGA, C.R.; ARAUJO, F.R.; MARQUES, A.P.C.; CARVALHO, C.M.E.; CUSINATO, F.Q.; CROCCI, A.J.; KESSLER, R.H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 4, p. 167-170, 2000.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: WELLS, E.A. ed. **Workshop on Hemoparasites (anaplasmosis and babesiosis)**. Cali, Colombia, CIAT. p. 49-62, 1975.

MAHONEY, D.F. In: MORRISON, W.I. **The ruminant immune system in health and disease**. Cambridge University Press, p. 539-545, 1986.

MAHONEY, D.F.; KERR, J.D.; GOODGER, B.V.; WRIGHT, I.G. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (Syn. *Babesia argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **Int. J. Parasitol.**, v. 9, p. 297-306, 1979.

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

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G. *Babesia argentina* immunization of cattle with a killed antigen against infection with heterologous strain. **Vet. Parasitol.**, v. 2, p. 273-282, 1976.

McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M., KRIER, P.J. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 1-24.

McELWAIN, T.F.; PERRYMAN, L.E.; MUSOKE, A.J.; McGUIRE, T.C. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 47, p. 213-222, 1991.

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

McGUIRE, T.C., *et al.* Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, v.371, p. 508-511, 1994.

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

MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I – the synthesis of a tetra peptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 21-49, 1963.

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

MONTENEGRO-JAMES, S.; GUILLEN, A.T.; MA, S.J.; TAPANG, C.; ABDELGAWAD, A.; TORO, M.; RISTIC, M. Use of dot Enzyme-Linkend immunosorbent assay with isolates *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **Am. J. Vet. Res.**; v. 51, p.1518-1521, 1990.

NARI, A. Methods currently used for the control of one-host tick: their validity and proposals for future control strategies. **Parasitology**, v. 32, p. 133-143, 1990.

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

NEW, D.L.; QUIM, J.B.; QUERESHI, M.Z.; SIGLER, S.J. Vertically transmitted babesiosis. **J. Pediat.**, n. 131, p. 163-164, 1997.

ORINDA, G.O.; GALE, K.R.; WRIGHT, I.G.; PARRODI, F. Bovine babesiosis: failure to induce interferon gamma production in response to *Babesia bovis* antigens in cattle. **Int. J. Parasitol.**, v. 22, n. 3, p. 395-398, 1992.

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

PALMER, G.H. *et al.* Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface exposed epitopes. **Infect. Immunol.**, v. 59, p. 3340-3342, 1991.

PATARROYO, J.H. Seminário nacional sobre parasitoses dos bovinos. **Anais...** Campo Grande – EMBRAPA/CNPGC, p.299, 1979.

PATARROYO, J.H. *Babesia Bovis* (BABES, 1888). **Caracterização, identificação e purificação de exoantigenos obtidos de culturas “in vitro”**. Vacinação experimental em bovinos. B.H: UFMG, 1991. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

PATARROYO, J.H. Vacinas sintéticas. **Rev. UFV e Parcerias**, n. 2, p. 19-20, out. 2000.

PATARROYO, J.H.; GONZÁLEZ, C.Z.L. Resposta imune a vacinas sintéticas anti *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 113, supl. 1, p. 129-134, 2004.

PATARROYO, J.H.; PRATES, A.A.; TAVARES, C.A.P.; MAFRA, C.L.; VARGAS, M.V. Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.59, p. 189-199, 1995a.

PATARROYO, J.H.; MAFRA, C.L.; SEIXAS, P.B.; SAMMARCO, P.; PRATES, A.A.; GUZMAN, F.; PEREIRA, R.W. Peptídeos sintéticos como vacinas para o controle de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinaria., 9, 1995, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBPV, 95p., 1995b.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.V; BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.11, p. 301-308, 1982.

PATARROYO, J.H.S. *et al.* Mapeamento de epítomos T reativos da proteína Bbo 60 (RAP-1) de *Babesia bovis*. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinaria., 9, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: [s.n.]. p. 197, 1999.

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

PERTMER, T.M.; ROBERTS, T.R.; HAYNES, J.R. Influenza virus nucleoprotein specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. **Virology.**, v.70, n.9, p. 6119 – 6125, 1996.

POESTER, F.P. Brucelose animal. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 2, 1997, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 1997. p. 54-59.

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

PORTELLA, R.W.D. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógenos no controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887).** Viçosa: UFV, 2000. 87 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

PURNEL, R.E. Vaccines against piroplasms. In: TAYLOR, ERA, MULLER, BLACKWELL (Eds.). **Symposia of the British Society for Parasitology.** Oxford: Scientific Publications, 1980. v. 18, p. 25-26.

RAMIREZ-CRUZ, G.T.; ALPIZAR, J.L.D.; SIERRA, E.M. Revisión: la inmunización contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* como método de control de la babesiosis bovina. **Rev. Biomed.**, v. 8, p. 240-246, 1997.

RISTIC, M.; KREIER, J.P. **Babesiosis.** New York: Academic Press, 1981. 589p.

RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Flórida: CRC Press, 1988. 255 p.

RISTIC, M.; LEWIS, G.E. *Babesia* in man and wild and laboratory – adapted mammals. In: KREIER, J.P. **Parasitic protozoa.** New York: Academic Press, 1977. p. 53-76.

RODRIGUEZ, N. Infección Experimental por *Babesia spp* en bovinos. En: 1 er. Taller Internacional sobre diagnóstico y control de anaplasmosis y babesiosis en rumiantes. UADY. FMVZ. Yucatán, México, 1992: 3-13.

SAM-YELLOWE, T.Y. Rhoptry organelles of apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitol. Today.** v. 12, p. 308-315, 1996.

SCHETTERS, T.P.M.; MONTENEGRO, J. Vaccines against babesiosis using soluble parasite antigens. **Parasitol. Today,** v. 11, n. 12, p. 456-462, 1995.

SHODA, L.K.M., *et al.* *Babesia bovis* stimulated macrophages express interleukin-1b, interleukin-12, *Tumor necrosis* factor alpha and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5139-5145, 2000.

SILVA, N.R.S. Tristeza parasitária bovina: babesiose e anaplasnose. **Hora Vet.**, v.1, p. 28-36, 1981.

SISTEMA de Análise Estatística e Genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa - M.G., 1999.

SKUCE, P.J.; MALLON, T.R.; TAYLOR, S.M. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 77, p. 99-102, 1996.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation of nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bull. Bur. Anim. Ind.** U.S. Dep. Agri., v. 1, p. 1, 1893.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C.R.; CUNHA, N.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bigenina* em bovinos na mesorregião Norte-Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 26-30, jan./mar. 2000.

SPOUGE, J.L.; GUY, H.R.; CORNETTE, J.L.; MARGALIT, H.; CEASE, K.; BERZOFISKY, J.A.; DELISI, C. Strong conformation determines processing requirements for T-cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 81, p. 6831-6835, 1984.

STICH, R.W., *et al.* *Babesia bovis*: common protein fractions recognized by oligoclonal *Babesia bovis* – specific CD4<sup>+</sup> Tcell lines from genetically diverse cattle. **Exp. Parasitol.**, v. 91, p. 40-51, 1991.

STICH, R.W., *et al.* Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4130-4136, 1998.

SUAREZ, C.E., *et al.* Characterisation of the gene encoding a 60 kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 46, p. 45-52, 1991.

SUAREZ, C.E., *et al.* Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry – associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3511-3517, 1993.

TIMMS, P. Development of babesial vaccines. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, p. 73-79, 1989.

TIMMS, P; BARRY, D.Y. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. **Res. Vet. Sci.**, v. 45, p. 266-269, 1988.

TIMMS, P.; DALGLIESH, R.J.; BARRY, D.N.; DIMMOCK, C.K.; RODWELL, B.J. *Babesia bovis*: Comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. **Aust. Vet. J.**, v.60, p. 75-77, 1983.

TIMMS, P.; STEWARD, N.P. Immune responses of cattle following vaccination with living and non-living *Babesia bovis* antigens. **Vet. Parasitol.**, v.16, n. 3-4, p. 243-251, 1984.

TIZZARD, I.R. **Veterinary Immunology**, 2th ed, Saunders WBCo, 482p., 2000.

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

VALEIRÓN, C.R. Autoanticuerpos contra globulos rojos em Hemoparasitosis. *Gazeta de Ciências Veterinárias*, ano 4, n. 1, p. 17-35, 1998.

VALLE, M.R.; MONTERO, C; MACHADO, H; JOGLAR, H. The evaluation of yeast derivatives as adjuvant of the immune response to the Bm86 antigen in cattle. **BMC Biotechnol.** 1:3, 2001.b

VIEIRA, D.; MENDONÇA, C.L.; KAHAYAGAMA, A.; MADRUGA, C.R.; BICUDO, P.L.; SCHENKI, M.A. e KESSLER, R. Avaliações da parasitemia, hematócrito e níveis enzimáticos de bezerros nelore (*Bos indicus*), inoculados com isolados de *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne,1893), das regiões sul, sudeste, centro-oeste, nordeste e norte do Brasil. **Ciê. Anim. Bras.**, ano 1, n.2 , p. 127 – 135, 2000.

ZAUGG, L.J. Babesiose. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais.** Ed. Manole, v.2, p.1080-1084, 1993.

WRIGHT, I.G. Biochemical characteristic of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: KREIER, J.P.; RISTIC, M. (eds) **Babesiosis.** New York Academic Press, p. 171-206, 1981.

WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the hemoparasite *Babesia sp* and *Anaplasma sp* in domestic animals. **Rev. Sci. Teach. off Int. Eppiz.**, p. 345-356, 1990.

WRIGHT, I.G.; GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man.** Boca Raton: CRC Press, p. 99-118, 1988.

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

WRIGHT, I.G. *et al.* The development of a recombinant *Babesia vaccine.* **Vet. Parasitol.**, v. 44, p. 3-13, 1992.

YOSHIKAWA, T.; SUZUKI, Y.; NOMOTO, A.; SATA, T.; KURATA, A.; TAMURA, S. Antibody responses and protection against influenza virus infect in different congenic strains of mice immunized intranasally with adjuvant combined A/Beijing/256/95 (H1N1) virus, hemagglutinin or neuraminidase. **Vaccine**, v. 21, p. 60-66, 2002.