

MAYRA XIOMARA HERNÁNDEZ SANABRIA

**FISIOPATOLOGIA DA *Babesia bovis*: MOLÉCULAS DE
ADESÃO EXPRESSADAS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS
(ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-SELECTINA E
TROMBOSPONDINA)**

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
2002

*A Dios, a mi familia y a mis amigos.
Todos los que ayudaron en mi camino.
Dedico este trabajo.*

AGRADECIMENTO

A Deus, pelas infinitas graças recebidas.

A meus pais, Ofélia e Gustavo, minhas irmãs Johanna e Diana e minhas avós Rosita e Mita, pelo amor, o imenso apoio e o incentivo.

Aos meus professores Marlene Isabel Vargas Viloria e Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo, pela valiosa orientação, pelo carinho e amizade em todo este tempo e por ser mais que meus professores, uma família para mim.

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

Ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Instituto de Biologia Aplicado à Agricultura (BIOAGRO) por contribuírem na formação científica.

À Universidad Del Tolima, pela formação dada.

A Leandro pelo grande carinho e o apoio que foi mais além das fronteiras.

Aos meus queridos amigos da Colômbia que ainda estão aqui Alba, Ximena, Irma, Gloria, Maria Fernanda, Claudia Carmen, Catalina, Luis, Ramon e Fabio e aos que já foram embora Leonardo, Claudia, Juan Carlos, Teresa e Fernando, pelo companheirismo e a amizade.

Aos meus colegas de mestrado Daniela, Policarpo, Marcelo, pela amizade e a ajuda em todo momento.

A Sidimar pela colaboração e participação na coleta de material no início do experimento e a Marcinho pela paciência para coletar o sangue no transcurso.

Aline e a Marcinho pela assessoria técnica, nos momentos de dificuldade.

A meus colegas de laboratório, Ana Paula e Bruno pela ajuda e a convivência agradável.

A Bráulia e a Ricardo pela amizade e grande colaboração.

A minhas companheiras de república Mayra, Márcia, Thais e Luciana que fizeram mais agradável minha estadia nesta cidade.

A Olinto pelo auxílio imprescindível na realização dos cortes por congelamento.

Aos funcionários Cláudio e Adão, do Laboratório de Histopatologia Veterinária, pelo preparo dos cortes histológicos.

A todo o pessoal do estábulo pela ajuda.

A José Carlos e Cauzinho por toda a colaboração e cuidados no trato com os animais no isolamento.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

MAYRA XIOMARA HERNÁNDEZ SANABRIA, filha de Gustavo Hernández Ávila e Ofélia Sanabria de Hernández, nascida em 4 de março de 1978, na cidade de Ibagué-Tolima-Colômbia.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidad del Tolima em 1994, concluindo sua graduação no ano 2000.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2000.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Fisiopatologia da babesiose bovina.....	6
2.2 Moléculas envolvidas na adesão.....	11
2.2.1 Moléculas expressas na superfície das hemácias parasitadas.....	11
2.2.2 Moléculas de adesão das células endoteliais.....	13
2.2.2.1 Moléculas de adesão estudadas neste trabalho.....	15
2.2.3 Citoaderência.....	19
2.2.4 Estudos de citoaderência <i>in vitro</i>	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Animais.....	25
4.2 Amostra de <i>Babesia bovis</i>	25
4.3 Inoculação dos animais	26
4.4 Obtenção das células endoteliais	26
4.5 Confirmação das características de célula endotelial	27
4.6 Anticorpos usados.....	28
4.7 Estimulo da adesão.....	29
4.8 Delineamento experimental.....	29
4.9 Testes de adesão de eritrócitos em células endoteliais.....	30
4.9.1 Cinética de adesão.....	30
4.9.2 Testes de adesão em células estimuladas.....	31
4.10 Imunohistoquímica em cultura de células endoteliais para identificação de moléculas de adesão <i>in vitro</i>	33
4.11 Imunohistoquímica para identificação de moléculas de adesão <i>in situ</i>	34
4.12 Imunohistoquímica para identificação de antígenos de	

<i>Babesia bovis</i>	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Estabelecimento dos cultivos de células endoteliais.....	38
5.2 Comprovação da natureza endotelial das BUVECS.....	40
5.3 Cinética de adesão de eritrócitos em células não estimuladas	42
5.3.1 Avaliação clínica	47
5.4 Testes de adesão de eritrócitos em BUVECS estimuladas.....	49
5.5 Imunohistoquímica para identificação de moléculas de adesão <i>in vitro</i>	52
5.6 Expressão de moléculas de adesão <i>in situ</i>	59
5.7 Imunohistoquímica para detecção de antígenos de <i>B. bovis</i>	67
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÕES.....	83
7.1 Perspectivas futuras.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDS – Síndrome similar à síndrome respiratória aguda
BAECs – Células Endoteliais de Aorta Bovina
BUVECs – Células Endoteliais de Veia Umbilical Bovina
BbovUFV1 – amostra de *Babesia bovis* UFV1
CAMs – Moléculas de adesão
CSA – Sulfato A de Condroitina
CD – “Cluster of Differentiation”
Dil-Ac-LDL–1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Médium
EDTA – Acido Etileno diamino tetracético
ELAM-1– Molécula-1 de adesão endotelial leucocitária ou CD62-E
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
HPR – Proteína Rica em Histidina
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN- γ – Interferon Gamma
IgG – Imunoglobulina G
IL-1 – Interleucina 1
LFA-1 – Antígeno de Função Leucocitária 1
LPS – Lipopolissacarídeos
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
ON – Óxido Nítrico

PAP – Peroxidase anti-peroxidase

PBMC – Células Mononucleares Periféricas Bovinas

PECAM-1 – Molécula de Adesão Plaqueta- Célula Endotelial 1

PfEMP1 – Proteína de Membrana Eritrocitária 1 do *Plasmodium falciparum*

PMNN – Polimorfonucleares neutrófilos

rbTNF- α – TNF- α recombinante

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TSP – Trombospondina

VCAM – Molécula Vascular de Adesão Celular

VESA 1 – Antígeno Variável de Superfície Eritrocitária 1 da *Babesia bovis*

VLA-4 – Antígeno Leucocitário Tardio 4

RESUMO

HERNÁNDEZ SANABRIA, Mayra M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2002. **Fisiopatologia da *Babesia bovis*: moléculas de adesão expressadas em células endoteliais (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina)**. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Conselheiros: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e João Carlos Pereira da Silva.

Foram isoladas células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs) com a finalidade de determinar a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina na fisiopatologia de *B. bovis* num estudo *in vitro*. Posteriormente esta expressão foi confirmada, num estudo *in situ*, em tecidos (cérebro, pulmão e rim) de animais que morreram após inoculação com amostra patogênica de *Babesia bovis* (BbovUFV1 7^a passagem). Eritrócitos dos animais infectados foram testados quanto à capacidade de aderir em BUVECs determinando a cinética de adesão. Os mesmos testes de adesão foram realizados em BUVECs estimuladas com plasma de animais infectados com *B. bovis* e sobrenadante de cultura de PBMC bovino estimulado com peptídeo sintético proveniente da RAP-1 de *B. bovis* contendo citocinas quantificadas (IFN- γ , TNF- α e IL-12). Houve aumento significativo na adesão de eritrócitos de animais inoculados em BUVECs estimuladas com plasma e sobrenadante de PBMC. Entretanto, adesão foi observada somente para eritrócitos não parasitados, sugerindo que antígenos livres de *B. bovis* no soro marcam eritrócitos não parasitados, ou ainda uma possível expressão de uma isoforma de VESA-1 não aderente. Aderência não foi observada nos testes

com amostras dos animais negativos. As células estimuladas com plasma de animais infectados e com sobrenadante de PBMC mostraram imunomarcção positiva muito mais intensa de ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina que as células que não receberam estímulo. Igualmente no estudo *in situ* foi observado aumento na expressão de ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina em tecidos como cérebro, pulmão e rim dos bovinos infectados com *B. bovis* em comparação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que as interleucinas, liberadas na fase aguda da babesiose, estimulam a expressão das moléculas de adesão relacionadas à fisiopatologia da babesiose causada por *B. bovis*, fato demonstrado *in vitro* pela expressão das moléculas em BUVECs e a citoaderência de eritrócitos. Estes achados demonstram similaridades na fisiopatologia de *B. bovis* e do *Plasmodium falciparum*.

ABSTRACT

HERNÁNDEZ SANABRIA, Mayra M.S., Universidade Federal de Viçosa, September of 2002. **Physiopathology of *Babesia bovis*: adhesion molecules expressed on endothelial cells (ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectin and thrombospondin)**. Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Counselors: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and João Carlos Pereira da Silva.

Endothelial cells from bovine umbilical vein (BUVECs) were isolated with the purpose of determining the expression of ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectin and thrombospondin in the physiopathology of Babesiosis caused by *B. bovis*. Later, this expression was confirmed by *in situ* study, using tissue samples (brain, lung and kidney) of animals that died after inoculation with a pathogenic strain of *B. bovis* (BbovUFV1 7th passage). Erythrocytes of infected animals were tested in order to observe capacity of binding to BUVECs and its adhesion kinetics. The same adhesion tests were made on BUVECs stimulated with plasma of animals infected with *B. bovis* and culture supernatant of bovine PBMC, stimulated with the synthetic peptide RAP-1 of *B. bovis* containing quantified cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-12). There was a significant increase in the adhesion of erythrocytes of animals inoculated in BUVECs stimulated with plasma and supernatant of PBMC. However, adhesion was observed only on non-parasitised erythrocytes, suggesting that free antigens of *B. bovis* in the serum can prime erythrocytes non-parasitised, or still a possible expression of an isoform of VESA-1 non adherent. Adherence was not observed in the tests with samples of the negative animals. Cells stimulated with infected animals

plasma and with supernatant of PBMC showed stronger expression of ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectine and thrombospondin, than cells that didn't receive stimuli. In the same way, it was observed strong expression of ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectine and thrombospondin in tissue samples of brain, lung and kidney in bovines infected with *B. bovis*, when comparing to the control group. These results suggest that Interleukins, liberated in the acute phase of Babesiosis, stimulate the expression of adhesion molecules related to the physiopathology of Babesiosis caused by *B. bovis*, as demonstrated by the expression of molecules in BUVECs and erythrocytes cytoadhesion. These data demonstrate physiopathological similarities between *B. bovis* and *Plasmodium falciparum*.

1. INTRODUÇÃO

A babesiose bovina, também conhecida como piroplasmose, é causada nas Américas por duas espécies de hematozoários, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* que estão amplamente distribuídas entre 40°N e 32°S do Equador. Em condições naturais, estes hematozoários são transmitidos pelo carrapato *Boophilus microplus*. Em oito países de América Latina esta doença causa perdas econômicas anuais estimadas em 1,5 bilhões de dólares (REY VALEIRÓN, 1998).

Nos países de clima tropical e subtropical a babesiose constitui fator limitante para o desenvolvimento da pecuária, devido aos sérios problemas que produz, tais como: alta taxa de mortalidade e morbidade, perdas na produção de carne e leite, elevados custos de medidas profiláticas e de controle da doença.

Ocasionalmente, *Babesia bovis* pode também ser transmitida ao homem por meio dos carrapatos infectados e produzir a morte, principalmente em pessoas esplenectomizadas (RISTIC & LEWIS, 1977)

Dentro das diferentes alterações fisiopatológicas causadas por *B. bovis*, estão as modificações na membrana dos eritrócitos, expressão de proteínas de superfície que medeiam a adesão dos eritrócitos nas células endoteliais dos

capilares seguidos de seqüestro de hemácias parasitadas e não parasitadas, nos capilares dos órgãos internos, obstrução vascular, anoxia tecidual e lesões graves com perda de função dos órgãos.

A inter-relação hospedeiro-parasita de *Babesia bovis* e *Plasmodium falciparum* é provavelmente regulada por mecanismos semelhantes. Nos dois tipos de infecção, ocorre desordem circulatória generalizada com ativação do sistema de coagulação, liberação de peptídeos vaso-ativos, consumo de fatores do complemento, hipotensão, vasodilatação e hemólise terminal. As duas doenças estão caracterizadas por baixa parasitemia, usualmente um por cento ou menos, e febre alta. A lesão mais característica é o seqüestro de eritrócitos nos leitos capilares, especialmente no cérebro (WRIGHT *et al.*, 1989; REY VALEIRÓN, 1998).

O estudo da dinâmica do processo de citoaderência, bem como a caracterização das moléculas expressas pelo parasita e seus ligantes, abrem uma nova perspectiva para o desenvolvimento de formas de controle e prevenção da babesiose bovina. Pode-se produzir peptídeos baseados na estrutura dos antígenos responsáveis pela adesão, que competem pelos receptores endoteliais, evitem a adesão de eritrócitos e impeçam o desenvolvimento de lesões associadas à adesão. Alternativamente, existe a possibilidade de identificar epítomos imunogênicos conservados entre as isoformas de uma proteína ligante às moléculas de adesão e, a partir daí, desenvolver vacinas capazes de induzir anticorpos bloqueadores eficazes.

Estudos realizados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/ DVT – BIOAGRO/UFV, demonstraram a adesão *ex vivo* de eritrócitos de animais inoculados com amostras virulentas de *B. bovis*, provenientes de diferentes regiões geográficas do país, em células endoteliais de aorta bovina.

Estudos sobre a expressão de moléculas de adesão tais como ICAM-1, PECAM-1, VCAM, E-selectina e trombospondina em bovinos infectados experimentalmente com *B. bovis*, é um passo para estabelecer as bases de futuras pesquisas sobre o papel destas moléculas em outras doenças específicas.

Por outro lado, é necessário conhecer o papel das moléculas de adesão na fisiopatologia da babesiose bovina causada por *B. bovis*, com o intuito de se obter alternativas de controle e tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A babesiose é uma doença infecciosa produzida por um parasita intraeritrocitário do gênero *Babesia*, que pode afetar mamíferos domésticos e silvestres. A gravidade do quadro clínico e os níveis de mortalidade dependem da espécie, da amostra do parasita e do grau de imunidade dos hospedeiros (RISTIC & KREIER, 1981). Ocorre em países tropicais e subtropicais localizados em regiões a 32°S e 40°N de latitude. Essa distribuição é definida pela ecologia dos vetores, que encontram plenas condições de desenvolvimento neste tipo de clima. Assim, a babesiose pode ser identificada em grande parte da África, sul da Europa, sul da Ásia, América Central e do Sul e ilhas do Caribe (KUTTLER, 1988).

Os agentes causadores da babesiose são classificados dentro do subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Piroplasmorida, família Babesiidae e gênero *Babesia*. As espécies de babesia que afetam bovinos são *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. ovata*, *B. jakimovi*, *B. occultans* e *B. major* (KUTTLER, 1988). No Brasil, foram identificadas apenas as duas primeiras, sendo a mais patogênica a *B. bovis* (PATARROYO *et al.*, 1982).

A *B. bigemina* é uma espécie considerada menos patogênica, normalmente associada à anemia não complicada. Já a *B. bovis* é altamente patogênica, capaz de causar complicações inflamatórias generalizadas e obstrução da microcirculação por eritrócitos parasitados em órgãos como cérebro e pulmões, levando à disfunção dos mesmos (MAHONEY, 1977).

As perdas econômicas causadas pela babesiose são difíceis de calcular. Elas são determinadas por muitos fatores, alguns dos quais são facilmente quantificáveis, enquanto outros passam despercebidos pelo produtor (RISTIC & KREIER, 1981). A mortalidade de animais é a consequência mais evidente da doença. Os maiores índices ocorrem entre animais *Bos taurus*, principalmente entre os não imunes recém introduzidos em áreas endêmicas. 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). Os prejuízos econômicos causados pelo complexo carrapato e doenças por ele transmitidas, no Brasil, foram avaliados em mais de um bilhão de dólares por ano (HORN & ARTECHE, 1985).

A transmissão da *B. bovis* aos bovinos se dá pela picada de carrapatos da família Ixodidae. Em geral, a transmissão de *B. bovis* em uma área está associada a um único vetor, mas a associação pode mudar de uma região para outra. Assim, na Austrália e na América do Sul a *B. bovis* é transmitida pelo *Boophilus microplus*, na África pelo *Boophilus annulatus* e na Europa pelo *Rhipicephalus bursa* (FRIEDHOFF, 1988).

O ciclo de vida da *B. bovis* começa com a inoculação na corrente sangüínea das formas infectantes: os esporozoítos, presentes na saliva dos carrapatos infectados. Os esporozoítos penetram nas hemácias e se diferenciam em trofozoítos, que se multiplicam assexuadamente pelo processo de divisão binária simples ou múltipla. A divisão dos trofozoítos dá origem a dois merozoítos que saem para infectar outras hemácias. O ciclo se repete, com a diferenciação dos merozoítos em trofozoítos e divisão, a cada oito horas. Após alguns ciclos de replicação, parte dos merozoítos pode se desenvolver a gametócitos masculinos ou femininos que continuarão o ciclo da *B. bovis* no carrapato (MELHORN & SCHEIN, 1984).

Os merozoítos podem ser arredondados ou piriformes, com 1 a 2,5µm de diâmetro e se apresentam únicos ou em pares dentro da hemácia. A análise da ultraestrutura mostra que o merozoíto é circundado por uma película formada de duas membranas e uma camada de microtúbulos. Numa das extremidades da célula encontra-se o complexo apical formado de diversas organelas especializadas: as roptrias, micronemas e anel polar (RUDZINSKA, 1981). Os merozoítos livres apresentam ainda uma capa formada de fibrilas protéicas perpendiculares à membrana plasmática. Essa capa e as organelas do complexo apical são importantes no processo de invasão da célula hospedeira (IGARASHI *et al.*, 1988).

A penetração do merozoíto no eritrócito se dá inicialmente com a fixação do mesmo sobre a hemácia. Esta é uma interação extremamente específica e a *B. bovis* não invade outro tipo celular. Isto implica que existe(m) receptor(es) no eritrócito que reconhece(m) molécula(s) complementar(es) no parasita, provavelmente presentes na capa externa do merozoíto (BUSHELL *et al.*, 1991).

Logo após a ligação, há uma reorientação do merozoíto sobre a superfície do eritrócito, de maneira que o complexo apical entra em contato com a membrana plasmática. O conteúdo das roptrias e micronemas é liberado sobre a membrana eritrocitária, induzindo à formação de um vacúolo e internalização do merozoíto. No interior da hemácia hospedeira, a membrana do vacúolo é destruída e o merozoíto fica em contato com o citoplasma (JACK & WARD, 1981).

2.1 Fisiopatologia da babesiose bovina

A fisiopatologia da babesiose produzida pela *B. bovis* é muito similar à da malária provocada pelo *P. falciparum*. Em ambas infecções, a proliferação dos patógenos no organismo é acompanhada de três eventos responsáveis pelo desenvolvimento de lesões: a) destruição de hemácias; b) liberação de mediadores químicos farmacologicamente ativos que produzem alterações circulatórias e c) seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação (WRIGHT, *et al.*, 1988). O grau de lesão provocada depende da amostra de *B.*

bovis e *P. falciparum* e da susceptibilidade do hospedeiro (WRIGHT & GOODGER, 1988).

A anemia manifestada na babesiose e na malária é resultado direto da ruptura dos eritrócitos pela saída de merozoítos. Na babesiose, o aumento da atividade fagocitária do sistema monocítico-fagocitário do baço e do fígado, para retirada de células parasitadas da circulação, também eleva a taxa de retirada de eritrócitos normais e contribui para a anemia (MAHONEY, 1977).

A *B. bovis* produz esterases capazes de converter a pré calicreína plasmática em calicreína ativada (WRIGHT & GOODGER, 1973). Esta última desencadeia a cascata de produção de bradicinina. A calicreína e a bradicinina são potentes vasodilatadores e causam estase sangüínea e hipotensão (WRIGHT & KERR, 1977). Além disto, elas atuam em conjunto na ativação da coagulação pela via do fator de Hageman. Ao contrário do que inicialmente se pensava, a ativação da coagulação não leva à formação de trombos, mas a um profundo distúrbio no metabolismo do fibrinogênio, representado pelo acúmulo de intermediários solúveis da conversão de fibrinogênio em fibrina. Os mais importantes são monômeros de fibrina ou fibrina complexada com fibrinogênio (WRIGHT, 1981). No sangue, estes complexos podem aumentar a viscosidade do plasma e agravar os problemas de circulação iniciados pela calicreína/bradicinina (WRIGHT & GOODGER, 1988).

Outros mediadores também citados como causadores de distúrbios circulatórios na babesiose são as aminas biogênicas: histamina e 5-hidroxitriptamina (WRIGHT, 1978) e as anafilotoxinas C5a e C3a. As duas últimas são liberadas na via alternativa do complemento, desencadeada por proteases da *B. bovis* (WRIGHT & GOODGER, 1988).

A vasodilatação provocada por mediadores liberados na fase aguda da malária e da babesiose e as alterações de membrana, com redução na deformabilidade dos eritrócitos parasitados, favorecem a adesão na medida em que diminuem a velocidade do fluxo sangüíneo nos leitos vasculares e aumentam a interação entre a superfície dos eritrócitos parasitados e células endoteliais (SCHETTERS & EILING, 2000).

A consequência patológica da adesão é a obstrução da microcirculação por eritrócitos parasitados. Segundo WRIGHT *et al.* (1989) a anoxia tecidual resultante da obstrução vascular leva a necrose e liberação local de fatores

pró-inflamatórios que induzem a quimiotaxia e diapedese de leucócitos. Os neutrófilos infiltrados desgranulam enzimas proteolíticas, intensificando as lesões iniciadas pela anoxia. Macrófagos também são atraídos aos sítios inflamatórios e secretam fator de necrose tumoral - α (TNF α), interferon gama (IFN γ) e interleucina 1 (IL-1), que estimulam o endotélio a expressar moléculas de adesão envolvidas na infiltração leucocitária, potencializando o processo de infiltração destas células.

Na malária, foi identificado um mediador – o glicofosfatidilinositol (GPI) – que tem sido apontado como responsável pela ativação da resposta inflamatória sistêmica (SCHOFIELD *et al.*, 1996). O GPI atua sobre macrófagos e células endoteliais induzindo a síntese de IL-1, IFN- γ e TNF- α . Estas substâncias são responsáveis pela febre, desequilíbrios metabólicos e caquexia associada à malária. Elas também induzem a liberação de óxido nítrico que leva a vasodilatação periférica, estase sangüínea e lesão tecidual (CLARK & SCHOFIELD, 2000). Acredita-se que as severas anormalidades orgânicas que acontecem durante a infecção aguda com *B. bovis*, similares às observadas durante a malária experimental, são mediadas em parte por citocinas inflamatórias, incluindo IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (ON). Clones de linfócitos T CD4⁺ estimulados com sobrenadante de cultura de *B. bovis* que continha IFN- γ e TNF- α , induziram a produção de ON em macrófagos bovinos. Também foi relatado que macrófagos bovinos produziram ON depois da exposição *in vitro* a merozoítos ou membrana de merozoítos de *B. bovis* e a uma fração lipídica de eritrócitos infectados com *B. bovis*, mas não completamente dependente de IFN- γ (STICH *et al.*, 1998; SHODA *et al.*, 2000).

Pesquisas realizadas por SHODA *et al.* (2000) relataram que macrófagos ativados derivados de monócitos estimulados com *B. bovis*, expressam níveis elevados de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , IL-12 e TNF- α , que são importantes para o estímulo da imunidade inata e adaptativa contra protozoários. Foi demonstrado *in vitro* que a produção do ON por macrófagos bovinos em resposta a eritrócitos infectados com *B. bovis* reduz a viabilidade do parasita. Porém, esta produção de ON pelos macrófagos foi só parcialmente responsável pela inibição do crescimento da *B. bovis*, sugerindo que fatores adicionais contribuem para a inibição da replicação do parasita.

Estes achados demonstram que *B. bovis* induz uma resposta imune inata capaz de controlar a replicação do parasita e que poderia resultar na sobrevivência do hospedeiro e na persistência do parasita. GOFF *et al.* (2002) encontraram que INF- γ e TNF- α são co-estimulantes da expressão de ON induzido em monócitos bovinos estimulados com merozoítos de *B. bovis*, e esta expressão pode ser inibida por IL-4 e IL-10.

Um evento muito importante na fisiopatologia da babesiose e da malária é o seqüestro de eritrócitos parasitados no interior dos capilares e vênulas pós-capilares, que resulta da adesão entre a membrana dos eritrócitos parasitados e das células endoteliais. Isto ocorre porque os parasitas produzem modificações estruturais e antigênicas na superfície eritrocitária que se constituem em sítios de ligação para receptores expressos em células endoteliais (AIKAWA, 1988; AIKAWA *et al.*, 1990 e 1992; PONGPONRATN *et al.*, 1991; MACPHERSON *et al.*, 1985; SCHETTERS & ELING, 2000). No entanto, os mecanismos usados pela *B. bovis* para induzir o seqüestro de eritrócitos parasitados e não parasitados, não tem sido bem esclarecido (ALLRED *et al.*, 2000).

Na malária causada por *P. falciparum*, o desenvolvimento do trofozoíto induz a reorganização de partículas protéicas dentro da bicamada lipídica da membrana eritrocitária e a formação de projeções superficiais cônicas denominadas de “knobs” eritrocitários. Estruturas correspondentes foram observadas em hemácias parasitadas com trofozoítos de *B. bovis*, tendo porém um formato de projeções espiculares. Estas protrusões constituem os pontos onde a membrana do eritrócito entra em contato com a superfície da célula endotelial e onde provavelmente ocorre a interação entre as moléculas de adesão (AIKAWA *et al.*, 1985). Proteínas do *P. falciparum*, como a Proteína de Membrana Eritrocitária 1 (PfEMP1), são inseridas na superfície dos “knobs” eritrocitários e se ligam a receptores endoteliais como ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular 1), VCAM-1 (Molécula Vascular de Adesão Celular 1) e CD36 (HOWARD *et al.*, 1988; SCHRAVENDIJK *et al.*, 1991). Nas projeções espiculares dos eritrócitos parasitados com *B. bovis* foi identificada a proteína VESA 1 (Antígeno Variável de Superfície Eritrocitária 1) que se acredita ser responsável pela adesão, apesar de ainda não serem conhecidos seus ligantes endoteliais (O’CONNOR & ALLRED, 2000).

Alterações na composição lipídica da membrana do eritrócito também podem favorecer a adesão. Hemácias parasitadas com *B. bovis* e *P. falciparum* apresentam aumento da concentração total de lipídeos, especialmente fosfatidilcolina, e exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (FLORIN-CHRISTENSEN *et al.*, 2000). A peroxidação destes lipídeos torna a superfície da hemácia susceptível à ligação de proteínas, inclusive antígenos livres de *B. bovis* e *P. falciparum*, que por sua vez poderiam se ligar a receptores endoteliais (WRIGHT *et al.*, 1989).

Testes de adesão *ex vivo* desenvolvidos por CAETANO (2001) demonstraram o aumento da adesão de eritrócitos não parasitados, provenientes de animais inoculados com amostra patogênica de *B. bovis* (BbovUFV1, 7^a passagem), em células endoteliais de aorta bovina. A adesão pode ter resultado de modificação da superfície dos eritrócitos por antígenos de *B. bovis* adsorvidos do plasma que se ligaram a receptores específicos presentes na superfície das células endoteliais.

Na malária, além da adesão ao endotélio dos eritrócitos parasitados, também se observa a agregação de eritrócitos não parasitados em torno de eritrócitos parasitados. A agregação de eritrócitos forma estruturas chamadas de rosetas, que pelo seu tamanho, ficam retidas nos pequenos vasos. Na roseta, a proximidade dos eritrócitos permite que os merozoítos passem diretamente de uma hemácia a outra, facilitando a proliferação destes parasitas (WAHLGREN *et al.*, 1989). Esta adesão é mediada pela mesma proteína (PfEMP1) que provoca a adesão dos eritrócitos parasitados em células endoteliais (HANDUNNETTI *et al.*, 1992; ROWE *et al.*, 1997). Na babesiose, WRIGHT (1972) observou que a ligação de fibrina à superfície das hemácias e à superfície endotelial pode levar ao estabelecimento de “pontes” de fibrina, proporcionando a adesão de eritrócitos parasitados e não parasitados. Já, trabalhos realizados por SCHETTERS & EILING (2000), indicam que a liberação em grande quantidade de monômeros de fibrina pode levar à mesma agregação, visto que a fibrina tem afinidade pela superfície dos eritrócitos.

O seqüestro de eritrócitos na malária e na babesiose é mais acentuado nas vênulas e capilares do sistema nervoso central - especialmente do encéfalo -. As lesões resultantes levam ao desenvolvimento de sinais e sintomas nervosos, caracterizando os quadros de babesiose e malária

cerebral, fatais na maioria dos casos (AIKAWA *et al.*, 1992). A participação de leucócitos no desenvolvimento das lesões neurológicas parece ter menor importância, visto que estas células são raramente observadas em estudos histopatológicos de cérebros de pacientes afetados de babesiose ou malária cerebral (AIKAWA, 1988; MACPHERSON *et al.*, 1985).

Outros órgãos que apresentam acúmulo de eritrócitos na microcirculação são coração, rim, pulmão e mucosa intestinal. Nestes órgãos, a porcentagem de vasos obstruídos é menor que no cérebro, porém a infiltração leucocitária é mais extensa. Na malária e na babesiose, ocorre uma síndrome similar à síndrome respiratória aguda (ARDS), na qual há seqüestro de eritrócitos e neutrófilos nos capilares pulmonares e edema alveolar, trazendo sérias alterações respiratórias, que são possivelmente as maiores causas de morte na babesiose bovina (WRIGHT *et al.*, 1989).

2. 2 Moléculas envolvidas na adesão

2. 2. 1 Moléculas expressas na superfície das hemácias parasitadas

O *P. falciparum* expressa um grupo de proteínas de alto peso molecular (200-350 kDa) que são inseridas nos “knobs” da membrana eritrocitária. Quatro proteínas já foram identificadas: as Proteínas Ricas em Histidina 1 e 2 (HRP1 e HRP2) e as Proteínas de Membrana Eritrocitária 1 e 2 (PfEMP1 e PfEMP2). As HRP e PfEMP2 participam da formação dos “knobs” e a PfEMP1 é a responsável pelo processo de citoaderência (AIKAWA, 1988).

Existe pouca informação a respeito das proteínas envolvidas no processo de adesão causada por *B. bovis*. ALLRED *et al.* (1993 e 1994) apontaram a presença de proteínas produzidas por merozoítos de *B. bovis* e expressas na superfície de eritrócitos parasitados, levantando a possibilidade das mesmas estarem envolvidas no processo de adesão eritrocitária. Em 1997, O’COONOR *et al.* descreveram características de tais proteínas, denominando-as VESA 1 (Antígenos Variáveis de Superfície Eritrocitária). Essas moléculas são funcionalmente relacionadas com as proteínas PfEMP1 do *P. falciparum*.

A molécula VESA 1 constitui um conjunto de proteínas diméricas, cuja estrutura apresenta regiões de variabilidade. As duas cadeias (VESA 1a e

VESA 1b) têm pesos diferentes e estão ligadas covalentemente entre si, mas não se definiu ainda como elas ficam ancoradas na membrana do eritrócito (O'CONNOR *et al.*, 1997). Estudos de imunoeltronmicroscopia mostraram que os antígenos VESA 1 estão localizados na superfície das protruções espiculares da membrana (O'CONNOR & ALLRED, 2000). Esta localização é consistente com o possível envolvimento de VESA 1 na adesão e seqüestro de hemácias, porém não existe evidência direta deste papel.

Em 1999, O'CONNOR *et al.*, mostraram que clones de *B. bovis* positivos para VESA 1 são capazes de produzir adesão de eritrócitos em células endoteliais de capilares de cérebro de bovino *in vitro*. Usando uma variação deste mesmo modelo experimental, O'CONNOR & ALLRED (2000) conseguiram demonstrar que vários soros capazes de bloquear e reverter a adesão também podem ser usados para precipitar VESA 1 da superfície de eritrócitos parasitados. Todos esses achados abrem a possibilidade de VESA 1 ser uma molécula de adesão.

A *B. bovis* produz exoantígenos solúveis que se ligam à membrana de hemácias. Estes exoantígenos também foram identificados, por meio de imunofluorescência, nas células endoteliais de cortes histológicos de cérebro de animais acometidos de babesiose cerebral. A afinidade pela superfície tanto de eritrócitos como de células endoteliais indica que os exoantígenos podem servir de “ponte” entre os eritrócitos e o endotélio e provocar adesão (RISTIC & KAKOMA, 1988)

CAETANO (2001) demonstrou com testes de hemaglutinação, a presença de antígenos livres de *B. bovis* 12 dias após a inoculação dos animais com amostra patogênica BbovUFV1 7^a passagem, coincidindo com o desenvolvimento de parasitemia. Os antígenos livres também foram demonstrados por imunofluorescência indireta em esfregaços de sangue periférico dos animais inoculados, detectando a presença de eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-BbovUFV1, indicando que antígenos livres de *B. bovis* podem se ligar à superfície eritrocitária.

2. 2. 2 Moléculas de adesão das células endoteliais

As moléculas de adesão são membros de uma família de proteínas associadas à membrana que participam na interação célula - célula e migração celular em condições fisiológicas e patológicas, incluindo desenvolvimento normal, doenças inflamatórias, desordens autoimunes e tumores malignos (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

Diversas moléculas presentes em células endoteliais foram demonstradas como capazes de sustentar a adesão de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* em experimentos *in vitro*. As principais são a Trombospondina (TSP), CD36, E-selectina, Sulfato A de condroitina (CSA), CD31, ICAM-1 e P-selectina. Algumas linhagens de *P. falciparum* também são capazes de se ligar a VCAM-1 (XIAO *et al.*, 1996; ALLRED, 1995; FUSAI *et al.*, 2000; VALIYAVEETIL *et al.*, 2001). As moléculas de adesão CD36, ICAM e E-selectina têm sido encontradas em pacientes que morreram de malária cerebral (OCKENHOUSE *et al.*, 1992; GARETH *et al.*, 1994).

As moléculas de adesão também têm um papel importante na fisiopatologia de outras doenças como no caso da gastrite induzida pelo *Helicobacter pylori*, onde foi demonstrada a participação destas moléculas na saída de leucócitos ao espaço extravascular. Na sequência de eventos do extravasamento de leucócitos, E-selectina participa no rolamento dos leucócitos; VCAM-1 e ICAM-1, na adesão e transmigração. Quando os neutrófilos são ativados por um estrato líquido de *H. pylori*, a molécula CD11b/CD18 (Mac-1) é expressa sobre a membrana celular dos neutrófilos por vários minutos, conferindo aos neutrófilos a capacidade de se aderir fortemente nas células endoteliais humanas com expressão de ICAM-1. Foi também demonstrado que *H. pylori* estimula diretamente a expressão de ICAM-1 sobre células epiteliais gástricas, produzindo injúria da mucosa gástrica óxido mediada (NAITO & YOSHICAWA, 2002).

Em lesões arterioscleróticas já foi demonstrada a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM e E-selectina sobre as células endoteliais afetadas nestas patologias. As moléculas de adesão (CAMs) são mediadores inflamatórios vasculares específicos expressas pelo endotélio ativado, podendo-se fazer predição prematura de doenças arteriais

coronarianas ou síndromes coronarianas agudas no caso do enfarte agudo do miocárdio, com a medição dos níveis de CAMs solúveis, pois após a expressão da molécula de adesão a porção extracelular das CAMs é clivada enzimaticamente, ficando no soro e fazendo possível sua medição (YAMAMOTO *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2002). CAMs também têm sido demonstradas em placas arterioscleróticas e implicadas na iniciação e desenvolvimento da arteriosclerose em pacientes com diabetes mellitus. Nesse estudo foi indicado o envolvimento de ICAM-1 solúvel em pacientes diabéticos que desenvolveram doenças macro-vasculares, convertendo a avaliação dos CAMs numa potencial forma de prevenir doenças macro-vasculares neste tipo de pacientes (JUDE *et al.*, 2002).

Em neoplasias, a função molecular e celular das moléculas de adesão tem um impacto clínico no desenvolvimento de metástase das células neoplásicas. No câncer de próstata, um dos fatos de maior relevância no desenvolvimento e progressão desta patologia é o aparecimento de anormalidades na adesão celular no epitélio da próstata e nas células cancerígenas. Estas anormalidades se estendem até as estruturas de adesão intercelular e as moléculas de adesão - principalmente da E-caderina e a catenina - da matriz extracelular. Também se tem encontrado formas solúveis de muitas outras moléculas de adesão como a β 1-integrina, VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 e CD-44 envolvidas nesta patologia (MASON *et al.*, 2002).

Estudos em animais domésticos demonstraram que em cães, o TNF- α pode induzir *in vivo* a expressão de P e E-selectina na pele, indicando que estas selectinas estão envolvidas na transmigração de leucócitos na dermatite canina (TREMBLAY *et al.*, 2002).

Os ovinos têm sido empregados como modelos experimentais para facilitar os estudos *in vivo* do papel das moléculas de adesão na regulação e no desenvolvimento pré-tímico e intra-tímico de linfócitos T (SHAO *et al.*, 2001).

Estudos recentes em bovinos têm demonstrado o papel das moléculas de adesão em algumas patologias como no caso das doenças respiratórias, em que as moléculas de adesão participam na migração de neutrófilos ao tecido pulmonar. Em infecções experimentais com *Mannheimia haemolytica*, apresentou-se um marcado e rápido influxo de neutrófilos no lúmen bronco-alveolar, embora, em doenças induzidas por *Herpesvirus bovinum* apresentou-se

um retardado influxo de neutrófilos. Pesquisas indicam que na cascata inflamatória destas doenças a L, P e E-selectinas atuam na fase de rolamento dos neutrófilos na parede vascular, ICAM-1 medeia a fase de adesão e PECAM-1 a diapedese (SOETHOUT *et al.*, 2002). Pesquisas com mamite, experimentalmente induzida com polissacarídeos, indicaram que a molécula de adesão CD33 pode estar envolvida no processo de extravasamento para o leite de células polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) e que as enzimas contidas nos PMNN podem ser parcialmente usadas neste processo (PRIN-MATIEU *et al.*, 2002).

2.2.2.1 Moléculas de adesão estudadas neste trabalho

E-selectina – também chamada molécula-1 de adesão endotelial leucocitária ou ELAM-1 (CD62-E) – é uma proteína N-glicosilada de ~100 kDa, e é uma das principais moléculas de adesão responsável pela regulação dos primeiros processos na cascata de adesão, ligação e rolamento (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001). E-selectina é uma glicoproteína induzível, da família das selectinas, que tem na sua estrutura um domínio tipo C que liga carboidratos, o qual usa para mediar adesão de leucócitos no endotélio. Esta molécula de adesão é a primeira a ser expressa sobre células endoteliais que têm sido estimuladas com diferentes tipos de imunomoduladores como lipopolissacarídeos (LPS) e TNF- α (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001), mediando a ligação de PMNs e algumas sub-populações de linfócitos no endotélio *in vitro* (GRABER *et al.*, 1990). JUTILA (1996) e WALCHECK *et al.* (1993), relataram o papel da E-selectina bovina na regulação da adesão de células $\gamma\delta$ em modelos *in vitro* utilizando células endoteliais humanas e bovinas. Outra forma de E-selectina que pode ter uma função em certas doenças é a forma solúvel, detectada no plasma de pacientes com certos tipos de câncer (BENEKLI *et al.*, 1998), em infecções severas (KAYAL *et al.*, 1998) e em desordens como na doença de Graves (WENISCH *et al.*, 1994), assim como no sobrenadante de células endoteliais humanas estimuladas (OHNO *et al.*, 1997). Em animais domésticos a E-selectina solúvel tem sido pouco descrita (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001).

A trombospondina (TSP) é uma família de glicoproteínas formada por cinco membros geneticamente distintos: TSP1-4 e TSP5/COMP (Cartilagem Oligomeric Matrix Protein). *In vitro*, as células endoteliais expressam somente TSP-1 de 450 kDa, que está composta de três subunidades ligadas entre si por enlaces dissulfeto, cada uma possuindo muitos sítios de ligação celular com diferentes afinidades para receptores de superfície celular como proteoglicanos, sulfatídeos, integrinas ou CD36. Pode-se associar, por exemplo, à glicoproteína de superfície das plaquetas, células endoteliais, ao colágeno, à heparina e à fibronectina. TSP está presente na matriz extracelular de uma grande variedade de tecidos e também é produzida e secretada no plasma por plaquetas, macrófagos e células endoteliais (LAHAV, 1993). TSP1 é uma proteína multifuncional, que também interage com diferentes proteínas plasmáticas (fibrinogênio e plasminogênio) e matriz protéica (colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos). Uma das funções da TSP é mediar aglutinação e adesão plaquetária na ativação da coagulação e inflamação. Representa aproximadamente 25% da proteína contida nas plaquetas e é liberada em lugares de agregação e ativação plaquetária, sugerindo que esta proteína tem um papel importante na hemostase. A TSP da matriz participa na regulação da adesão celular, migração, proliferação e diferenciação e está envolvida em processos fisiopatológicos como a inflamação, rolamento, cicatrização, angiogênese e metástase. *In vitro*, TSP1 é requerida para a adesão ao substrato de células endoteliais em culturas primárias (LOGANADANE *et al.*, 1997). Na malária, a ligação da TSP com a PfEMP1 é capaz de provocar imobilização de eritrócitos parasitados, porém esta interação tem baixa afinidade e pouca duração (COOKE *et al.*, 1994). Tem sido encontrado em parasitas apicomplexos proteínas contendo uma ou mais cópias de TSP1 humana, as quais são componentes importantes da maquinaria de locomoção e invasão deste filo de parasitas. Proteínas deste tipo têm sido identificadas em *Eimeria tenella*, *E. máxima*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* e em todas as espécies de plasmodium analisadas (NAITZA *et al.*, 1998).

A Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1) ou CD54, é uma glicoproteína de 76 – 115 kDa, com cinco domínios extracelulares, que faz parte da superfamília das imunoglobulinas (DIETRICH, 2002). Esta molécula

está expressa constitutivamente em células endoteliais e monócitos e pode ser induzida ou sobre-regulada em linfócitos B e T, células endoteliais, células epiteliais e timócitos (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001). Estudos *in vitro* revelaram que ICAM-1 foi induzida com 1L-1 α , 1L-1 β , TNF- α , TNF- β , IFN- γ , sobre múltiplos tipos de células incluindo células hematopoiéticas e fibroblastos (ROTHLEIN *et al.*, 1991). Esta molécula tem uma função importante no começo da cascata de adesão ligando neutrófilos ao endotélio. ICAM-1 se liga à integrina LFA-1 (Antígeno de função Leucocitária 1), Mac-1 ou CD43, da superfície de leucócitos, para permitir a infiltração dos mesmos através do endotélio em sítios de inflamação e de resposta imune (DIETRICH, 2002., CARLOS & HARLAN, 1994). ICAM-1 também é conhecida como uma das rotas trans-celulares de entrada de patógenos específicos dentro do sistema nervoso central (DIETRICH, 2002). A detecção de altos níveis de ICAM-1 solúvel tem sido relatada e associada com metástase no fígado em câncer da vesícula biliar, pâncreas, gastrintestinal e de colo uterino (MASON *et al.*, 2002). Baixos níveis de expressão desta molécula foram descritos sobre células secretoras em pacientes com endometriose e associada com o aparecimento desta patologia (PREFUMO *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrada a ligação entre a proteína PfEMP1 de *P. falciparum* e ICAM-1, CD36, Sulfato A de condroitina (CSA) e P-selectina (SENEZUK *et al.*, 2001). A molécula PfEMP1 se liga no primeiro domínio N-terminal IgG-like de ICAM-1. Foi descrita em ICAM-1 uma mutação na região que codifica este primeiro domínio, a qual está presente em alta frequência dentro da população africana (CRAIG *et al.*, 2000) e tem sido associada com susceptibilidade à malária cerebral no Kênia (DIETRICH, 2002). A afinidade de ICAM-1 pela PfEMP1 é menor que a de CD36 e TSP. Sob condições de fluxo - nas quais existem forças contrárias às de fixação de hemácias - tal ligação de baixa afinidade promove adesão com rolamento. ICAM-1 diminui a velocidade de passagem das hemácias, facilitando a interação de CD36 e TSP com seus ligantes (COOKE *et al.*, 1994).

A molécula vascular de adesão celular (VCAM) é uma proteína de 110 kDa, identificada como CD106. Pertence à superfamília das imunoglobulinas e é uma molécula de adesão induzível, expressa em altos níveis sobre células endoteliais vasculares estimuladas com citocinas, em sítios de inflamação e

infecção (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001; VERMONT-DESROCHES, 1995). Está constitutivamente expressa também sobre as células dendríticas foliculares e interfoliculares dos linfonodos, mioblastos e alguns macrófagos em tecido normal (LOBB *et al.*, 1991). É uma molécula importante na migração leucocitária, servindo como ligante para a integrina leucocitária $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 ou CD49d/CD29), mediando adesão de monócitos e linfócitos circulantes em endotélio ativado. Alguns estudos indicam que esta molécula pode compensar a adesão na falta de interação entre ICAM/LFA-1. VCAM está presente numa grande variedade de eventos inflamatórios e também sobre a cápsula sinovial e mesotélio durante inflamação crônica (VAN KAMPEN & MALLARD, 2001; BEVILACQUA, 1993).

Foram encontradas altas concentrações de VCAM-1 solúvel no soro de pacientes com endometriose em fase IV, podendo ser usado este achado para o desenvolvimento de marcadores bioquímicos para serem utilizados no diagnóstico da fase da doença (BARRIER & SHARPE-TIMMS, 2002). Elevados níveis de VCAM-1 solúvel também têm sido reportados em pacientes com câncer gástrico e foram associados com baixa sobrevivência em comparação com pacientes com níveis sorológicos normais. Além disto, níveis elevados de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis foram encontrados em pacientes com câncer de colon e associados ao desenvolvimento desta doença da forma local e metastásica (MASON *et al.*, 2002).

Nos animais domésticos, no caso dos suínos, VCAM é induzida por LPS, TNF- α e IL-1 α *in vitro*, existindo diferenças na expressão comparada com a VCAM humana. Em células endoteliais de cordão umbilical ovino, a cinética de expressão de VCAM foi similar à humana (GROOBY *et al.*, 1997), no entanto, a cinética de expressão de VCAM em bovinos tem sido pouco estudada.

A molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1 (PECAM-1), também conhecida como CD31, é uma glicoproteína de transmembrana de 130 a 140-kDA que pertence à superfamília das imunoglobulinas, é expressa sobre a superfície de plaquetas, monócitos, neutrófilos e linfócitos T. CD31 é constituinte das junções intercelulares endoteliais (SENEZUK *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002). Esta molécula é encontrada em grande quantidade em células endoteliais e é pouco expressa em plaquetas e leucócitos. Em

processos inflamatórios, tem um papel importante na cascata de adesão entre células endoteliais e polimorfonucleares, monócitos e linfócitos. Num modelo de injúria por complexos imunes, a aplicação de anti PECAM-1 representou a diminuição de 75% do seqüestro de neutrófilos no pulmão (VALPORCIYAN *et al.*, 1993). O polimorfismo genético, ligado à raça, apresentado no domínio extracelular de PECAM-1 pode estar implicado na susceptibilidade à malária cerebral (KIKUCHI *et al.*, 2001).

2.2.3 Citoaderência em *B. bovis*

A literatura é restrita quanto à indicação de moléculas endoteliais que poderiam atuar como mediadores de adesão de eritrócitos parasitados com *B. bovis*. Experimentos de adesão *in vitro* mostraram que hemácias infectadas por *B. bovis* aderem a superfícies tratadas com trombospondina, laminina (PARRODI *et al.*, 1989) e heparina (GOODGER *et al.*, 1987). Os autores não indicam qual a natureza do antígeno eritrocitário que atua como ligante.

WRIGHT *et al.* (1989) também apontam a trombospondina, em conjunto com a fibronectina, como mediador de adesão. Segundo estes autores, a trombospondina e fibronectina se ligam a monômeros de fibrina, os quais são formados em grande quantidade durante a fase aguda da babesiose. Estes monômeros têm afinidade pela superfície dos eritrócitos e assim podem mediar a ligação com a fibronectina e trombospondina presentes na membrana da célula endotelial.

Não existem relatos de que CD36, trombospondina ou ICAM-1 possam servir como ligantes de VESA-1. No entanto, ALLRED *et al.* (2000) identificaram, em uma das cadeias de VESA-1 (VESA 1a), uma seqüência de aminoácidos muito similar ao sítio de ligação da PfEMP1 em CD36.

No trabalho desenvolvido por CAETANO (2001), ficou demonstrada a presença de antígenos livres de *B. bovis* em amostras de soro coletadas dos animais a partir de 12 dias após a inoculação com BbovUFV1 patogênica, coincidindo com o desenvolvimento de parasitemia. É possível que as células endoteliais de aorta bovina expressem algum receptor que possa reconhecer tais antígenos nos eritrócitos sensibilizados e mediar a adesão. A ocorrência de adesão de eritrócitos não parasitados, provenientes de animais inoculados, em

células endoteliais de aorta bovina é indicativo de que antígenos de *B. bovis*, presentes nos eritrócitos, estabeleceriam interações específicas com receptores presentes apenas em células endoteliais bovinas. A natureza do(s) exoantígeno(s) e do(s) receptor(es) que possa(m) ter participado da adesão das hemácias não parasitadas permanece sem esclarecimento.

A citoaderência se constitui numa vantagem adaptativa para *B. bovis* e para o *P. falciparum*, sendo um dos mecanismos que permitem aos parasitas escapar do reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (ALLRED, 1995 e 1998).

Entre as vias de controle da infecção por *B. bovis* e *P. falciparum* está a eliminação de eritrócitos parasitados feita normalmente pelas células NK. A hemácia, porém, é destituída de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) e por isso não apresenta antígenos a linfócitos T (ALLRED, 1995).

Foi proposto também que os eritrócitos parasitados poderiam ser eliminados por fagocitose pelos macrófagos. Neste caso, as células infectadas seriam opsonizadas por anticorpos específicos (IgG1 e IgG2) contra antígenos de *B. bovis* (BROWN & PALMER, 1999).

O bloqueio dos sítios de interação das moléculas de adesão na superfície eritrocitária por meio de anticorpos específicos poderia inibir a citoaderência, diminuindo o desenvolvimento de lesões e sinais clínicos da malária e babesiose (ALLRED, 1998). Isto é confirmado por estudos que mostram que humanos imunes, vivendo em áreas endêmicas de malária, possuem anticorpos capazes de reconhecer a superfície de eritrócitos parasitados e que a ocorrência de tais anticorpos está relacionada à proteção contra a doença (MARSH *et al.*, 1989). Além do mais, a proteção contra a doença pode ser transferida passivamente de um indivíduo imune para um não imune através do soro ou imunoglobulina de um indivíduo imune (SABCHAREON *et al.*, 1991). A presença de anticorpos contra eritrócitos parasitados também está correlacionada com a proteção contra babesiose bovina (MAHONEY *et al.*, 1979). Trabalhos realizados por O'CONNOR & ALLRED (2000) demonstraram que no soro de animais inoculados com o clone MO7 de uma amostra patogênica de *B. bovis*, existem anticorpos (IgG) específicos para VESA 1 capazes de bloquear e até mesmo reverter a adesão de eritrócitos parasitados *in vitro*.

No entanto, a presença de tais anticorpos não impede que animais infectados com *B. bovis* ou humanos parasitados com *P. falciparum* desenvolvam infecções crônicas, o que indica que existem mecanismos que permitem aos dois hemoparasitas escaparem da resposta mediada por anticorpos. Dentre eles, a variação antigênica clonal é o principal (ALLRED, 1998).

Foi demonstrado que a proteína dimérica VESA 1 é a responsável pela variação antigênica clonal em populações de *B. bovis* (ALLRED *et al.*, 1994). Recentemente o gene *ves1α*, que codifica o peptídeo VESA 1a, foi caracterizado, inúmeras cópias do mesmo gene estão presentes em todos os cromossomos da *B. bovis*, mas apenas uma cópia é expressa por vez dentro de uma população clonada (derivada de um único indivíduo). Há indícios que a variação na expressão de VESA 1a ocorre devido ao aparecimento, na população, de indivíduos que sofreram modificações da cópia de *ves1α* expressada, talvez por meio de conversão gênica. Isto difere muito da regulação dos genes *var* do *P. falciparum*, no qual o maior mecanismo é a troca *in situ* dos genes expressos (ALLRED *et al.*, 2000).

Com a variação antigênica, a resposta de anticorpos contra uma estrutura de membrana e todos os mecanismos dela dependentes apresenta eficácia limitada. A cada mudança nos antígenos de superfície expressos pela população, uma nova resposta imune deve ser ativada. Dessa maneira, a *B. bovis* e o *P. falciparum* escapam da eliminação completa (ALLRED, 1998).

O fato da variação antigênica e capacidade de adesão estarem ligadas às mesmas moléculas cria um paradoxo. A variação antigênica pode aumentar a diversidade das moléculas de adesão e permitir a evasão à resposta imune humoral. Por outro lado, a mesma variação é limitada pelo fato de que alterações na seqüência de aminoácidos das proteínas mediadoras de adesão, não podem alterar sua capacidade de se ligar aos receptores endoteliais (BIGGS *et al.*, 1992). Assim, as seqüências de aminoácidos das proteínas envolvidas na ligação com os receptores e manutenção da estrutura espacial dos sítios de ligação devem ser conservadas (BARUCH *et al.*, 1997).

2.2.4 Estudos de citoaderência *in vitro*

O principal interesse no estudo da adesão é criar mecanismos que possam bloquear a citoaderência e impedir as lesões por ela causadas. Para isso, uma das estratégias traçadas é a imunização dos indivíduos contra as moléculas responsáveis pela citoaderência, de maneira a induzir a produção de anticorpos bloqueadores. O desenvolvimento de vacinas, no entanto, depara-se com o problema da diversidade antigênica das moléculas de adesão entre os diferentes isolados dos parasitas e na variação antigênica clonal destas proteínas dentro de um mesmo isolado. A obtenção de uma vacina eficiente depende da identificação de epítomos funcionais (envolvidos na adesão) conservados e que tenham capacidade imunogênica (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

Os modelos *in vitro*, usados para elucidar as interações entre eritrócitos infectados e células endoteliais, envolvem o uso de linhagens de células endoteliais isoladas de diversos órgãos ou células transfectadas com genes de receptores de superfície de células endoteliais. Os eritrócitos provenientes de cultivos *in vitro* dos parasitas são colocados sobre as células para indução da adesão. Modificações na metodologia, como bloqueio de moléculas de superfície conhecidas antes da adição de células parasitadas, permitem caracterizar as interações ao nível molecular e definir ligantes que medeiam a adesão (GAY *et al.*, 1995).

No estudo com *P. falciparum* foram identificadas várias linhagens celulares capazes de sustentar a adesão *in vitro*, incluindo células endoteliais de veia umbilical humana, com alta expressão de ICAM-1 (UDEINYA *et al.*, 1981); de capilares cerebrais e microvasculatura dérmica humana (JOHNSON *et al.*, 1993., PRUDHOMME *et al.*, 1999); células endoteliais de pulmão humano (MUANZA *et al.*, 1996); células de melanoma amelanótico CD32r, com alta expressão de CD36 (SCHIMIDT *et al.*, 1982); células CHO transfectadas com genes de ICAM-1 e CD36 (HASLER *et al.*, 1993; MUANZA *et al.*, 1996) e células endoteliais de microvasculatura cerebral de macacos *Saimiri* (GAY *et al.*, 1995; FUSAI *et al.*, 2000). Foi o uso destes modelos que permitiu identificar a TSP, ICAM-1 e CD36 como mediadores de adesão de eritrócitos parasitados (PASLOSKE & HOWARD, 1994).

VAN KAMPEN & MALLARD (2001) tem estudado a regulação da expressão de moléculas de adesão como a E-selectina em células endoteliais de aorta bovina (BAEC), estimuladas com TNF- α recombinante (rbTNF- α) e LPS. Outros trabalhos realizados pelos mesmos autores têm estudado a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em BAECs, utilizando anticorpos humanos anti VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina demonstrando reatividade cruzada para as mesmas moléculas de adesão em bovinos.

Para estudos com *B. bovis* não há uma quantidade comparável de modelos. O'CONNOR *et al.* (1999) demonstraram que células endoteliais de microvasculatura cerebral de bovinos são capazes de promover a adesão de eritrócitos parasitados *in vitro*. No entanto, a aplicação desta linhagem é recente e ainda não foram definidos os receptores que promovem a interação.

KILGER (1999) desenvolveu um modelo de adesão em que se utilizam células endoteliais de aorta bovina. Neste estudo, o autor observou maior número de eritrócitos aderidos provenientes de sangue de animais inoculados com amostras de *B. bovis* em comparação com eritrócitos de animais não inoculados.

CAETANO (2001) avaliou o desenvolvimento de adesão de eritrócitos de bovinos em BAEC, mediante a inoculação dos animais com várias amostras patogênicas de *B. bovis*, encontrando adesão de eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-*B. bovis*, indicando que antígenos livres de *B. bovis* podem se ligar à superfície de eritrócitos não parasitados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM, PECAM-1 E-selectina e trombospondina) na fisiopatologia de *Babesia bovis* através da expressão em células endoteliais *in vitro* e *in situ*.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar células endoteliais a partir de veia umbilical bovina para estabelecer um modelo experimental *in vitro*.
- Identificar as moléculas de adesão ICAM-1, PECAM-1, VCAM, E-selectina e Trombospondina, expressas pelas células endoteliais de veia umbilical que mediam o seqüestro dos eritrócitos infectados com *Babesia bovis*.
- Identificar por métodos imunohistoquímicos as moléculas de adesão em células endoteliais de capilares de tecidos, coletados de animais infectados com *Babesia bovis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram empregados oito animais *Bos taurus* da raça Jérsei, machos com 24 meses de idade, negativos sorológica e parasitologicamente para hematozoários. Todos os animais foram mantidos em condições de isolamento a prova de artrópodes e outros vetores de hemoparasitas, no Departamento de Medicina Veterinária da UFV.

4.2 Amostra de *Babesia bovis*

Foi utilizada a amostra de *Babesia bovis* (BbovUFV1 7^a passagem), patogênica. Esta amostra foi isolada na Zona da Mata, na microrregião de Viçosa – MG, reproduzida por passagens em bezerros esplenectomizados, congelada em sangue total diluído v/v em PBS (Na₂HPO₄ 6,4mM, KH₂PO₄ 10mM, NaCl 73mM) pH 7,6 acrescida de 22% de DMSO e mantida em nitrogênio líquida, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do DVT – BIOAGRO/UFV.

4.3 Inoculação dos animais

Sete animais foram inoculados por via intravenosa com a amostra patogênica de *B. bovis* (BbovUFV1 7^a passagem) em uma dose de $6,6 \times 10^7$ parasitas e um animal foi mantido como controle negativo. Cinco destes animais inoculados foram utilizados no experimento da cinética de adesão, e dois na identificação das moléculas de adesão *in situ*, os quais morreram 14 e 15 dias pós-inoculação respectivamente. Após necropsia, foram coletadas amostras de tecido (cérebro, rim e pulmão), para processamento imunohistoquímico. Os animais utilizados no experimento da cinética de adesão, foram farmacologicamente tratados contra a infecção 17 dias após inoculação.

4.4 Obtenção das células endoteliais

A obtenção das células endoteliais a partir da veia umbilical bovina denominadas BUVECs, foi realizada de acordo com protocolo descrito por FRESHNEY (1994), e modificado por KILGER (1999), onde foi substituída a solução salina tamponada contendo 0,5% de soro-albumina bovina (PBSA), por Solução de Sais Balanceados de Hank (HBSS): (KCl 5.4mM, KH₂PO₄ 0.44mM, NaCl 137mM, NaHCO₃ 4.2mM, Na₂HPO₄, 0.34mM e D-Glucose 5,6mM) para lavagem da luz da veia umbilical e das células recém extraídas.

Um segmento de cordão umbilical bovino, de aproximadamente 40 centímetros, foi obtido imediatamente após o parto, sendo suas extremidades ligadas com fio de algodão estéril. Após lavagem externa com álcool a 70%, o fio de algodão foi substituído por pinças hemostáticas estéreis e a veia umbilical foi preenchida com solução HBSS estéril. O material foi transportado ao laboratório – num tempo máximo de 15 minutos – submerso em solução de HBSS e mantido em banho de gelo. O isolamento das células foi feito em capela de fluxo laminar vertical. O lume da veia umbilical foi lavado por meio de injeções repetidas de HBSS aquecido a 37°C. Após a lavagem, a veia umbilical foi preenchida com 10 ml de uma solução de Colagenase Tipo II (Gibco®) a 0,25% em PBS contendo 0,5% de soro albumina bovina. Após 10 minutos de

digestão a temperatura ambiente, retirou-se a solução de collagenase contendo células endoteliais e novamente lavou-se o lume do vaso com HBSS sendo novamente preenchido com a mesma quantidade de collagenase 0,25%. Este procedimento foi repetido três vezes. As alíquotas foram imediatamente centrifugadas a 300g durante 5 minutos a 4°C e o sedimento obtido era lavado duas vezes por centrifugação em DMEM completo (com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1% antibiótico/antimicótico), a 300g durante 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em DMEM completo com 1% de fator de crescimento endotelial (PAESEL + LOREI®) e semeadas em garrafa para cultura de 75 cm e colocadas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e novas subculturas foram realizadas quando as células endoteliais formavam uma monocamada confluyente. Após a retirada do sobrenadante, a monocamada foi lavada com PBS pH 7.2 (Na₂HPO₄ x 7H₂O 2,9mM, NaCl 154mM, KH₂PO₄ 1mM) e em seguida colocou-se 1 ml de solução de PBS contendo 0,2% de EDTA e 0,5% de tripsina, durante 30 segundos a 37°C. Após o desprendimento das células, a tripsina foi inativada com 10 ml de uma solução de PBS pH 7.2 acrescido com 5% de soro fetal bovino, e centrifugadas, durante 5 minutos a 300g e 4°C. Logo em seguida o sedimento foi ressuspensado em meio DMEM completo. As células foram semeadas em garrafas de cultura de 25cm³ numa concentração de 3,5x10⁴/ml de DMEM completo.

4.5 Confirmação das características de célula endotelial

Para confirmar que as células isoladas eram endoteliais e que não havia contaminação com outros tipos celulares, monocamadas de HUVECs foram incubadas com 10 µg/ml de lipoproteína acetilada de baixa densidade marcada com 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil-Ac-LDL; Biomedical Technologies, Stoughton, Mass) por 4 horas. Depois, as células foram lavadas durante 5 minutos com PBS pH 7,2 (Na₂HPO₄ x 7H₂O 2,9mM, NaCl 154mM, KH₂PO₄ 1mM), fixadas com PBS pH 7,2 contendo 3% de formaldeído por 20 minutos a temperatura ambiente, secadas e montadas

em lâmina. As células foram examinadas em microscópio de fluorescência com excitação de 545nm e observadas as emissões em >590 nm.

4.6 Anticorpos usados

Os anticorpos antimoléculas de adesão usados neste experimento são mostrados no Quadro 1. Todos os anticorpos foram diluídos numa concentração de 1:80 em solução de PBS pH 7,2 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,9mM, NaCl 154mM, KH_2PO_4 1mM). Os antígenos de *B. bovis* foram identificados usando anticorpo de coelho policlonal monoespecífico (IgG de coelho anti-*B. bovis*) produzido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (LBCH) BIOAGRO-UFV.

Quadro 1 – Pannel de anticorpos monoclonais utilizados*

Anticorpos		Clone	Origem	Espécies com reatividade conhecida
Anti ICAM-1 (CD54)	Anticorpo monoclonal de camundongo IgG1/ κ	15.2	Hibridoma de esplenócitos BALB/c e células de mieloma de camundongo p3-NS-1/Ag4-1 (NS1)	Humano
Anti VCAM (CD106)	Anticorpo monoclonal de camundongo IgG1/ κ	B-K9	Hibridoma de esplenócitos BALB/c e células de mieloma X63/Ag. 8-653	Humano
Anti PECAM-1 (CD31)	Anticorpo monoclonal de camundongo IgG1/ κ	JC/70A	Hibridoma de esplenócitos BALB/c e células de mieloma p3-NS-1/Ag4-1 (NS1)	Humano
Anti E-selectina (CD62E)	Anticorpo policlonal de coelho			Humano, bovino, ovino
Anti Trombospondina (TSP)	Anticorpo monoclonal de camundongo IgG1	A6.1	Hibridoma de esplenócitos BALB/c e células de mieloma SP2/Ag14	Humano, ovino

* Neo Markers ®

4.7 Estimulo da adesão

Foram empregados plasma e sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas bovinas (PBMC) para estimular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. O plasma utilizado era procedente dos animais infectados com amostra patogênica BbovUFV1 7^a passagem, 14 dias após a inoculação e o sobrenadante era proveniente de cultura de PBMC coletado em pesquisas anteriores e armazenado a -70° C no LBCH / BIOAGRO-UFV. As culturas de PBMC foram estimuladas com 2µg/ml do peptídeo sintético 23290, o qual é baseado na estrutura da proteína RAP-1 da *B. bovis* com o intuito de avaliar a capacidade imunogênica do mesmo através da produção e secreção de IFN-γ, TNF-α e IL-12. Dosaram-se no sobrenadante os níveis de citocinas produzidas e secretadas através de teste de ELISA (AFONSO & SCOTT, 1993). Os sobrenadantes continham: 500 pg/ml de IFNγ, 2200 pg/ml de TNFα e 875 pg/ml de IL-12 (BATISTA, 2001).

4.8 Delineamento experimental

O trabalho foi dividido em quatro experimentos: a) cinética de adesão em BUVECs de eritrócitos de animais inoculados b) testes de adesão de eritrócitos dos animais inoculados em BUVECs estimuladas com plasma e com sobrenadante de cultura de PBMC; c) identificação das moléculas de adesão expressas em BUVECs estimuladas com plasma de animais inoculados e com sobrenadante de cultura de PBMC; d) identificação das moléculas de adesão expressas em tecidos (cérebro, pulmão e rim) de animais que morreram após a infecção com amostra patogênica.

Para o primeiro experimento se utilizaram cinco animais (B1, B2, B3, B4, B5), os quais foram inoculados com a amostra patogênica de *B. bovis*, e um animal (denominado B6) foi mantido como controle negativo. Os animais foram monitorados para detecção do desenvolvimento de sinais de babesiose aguda. A partir de um dia antes da inoculação e a cada 48 horas, durante 16 dias pós-inoculação, procedia-se à medição da temperatura retal e coletas de sangue venoso para fazer os teste de adesão, mensuração do hematócrito e confecção de esfregaços destinados aos exames parasitológicos e obtenção do plasma

que era posteriormente estocado a -20°C até o momento do uso. Os exames para mensuração da parasitemia foram realizados por FIGUEIREDO (2002) usando a técnica de hidroetidina. As amostras de sangue foram colhidas em sistema de coleta a vácuo com EDTA (VacumII[®], Labnew Indústria e Comércio, LTDA).

4.9 Testes de adesão de eritrócitos em células endoteliais

Os testes de adesão foram realizados segundo o protocolo de UDEINYA *et al.* (1981). Esta técnica foi desenvolvida para observar adesão de eritrócitos parasitados por *P. falciparum*, com as seguintes modificações introduzidas por KILGER (1999) e CAETANO (2001): uso de eritrócitos coletados a partir de sangue venoso dos bovinos infectados em lugar de eritrócitos mantidos em cultura *in vitro*; modificações na composição do tampão de adesão, com acréscimo de HEPES a 25mM, acréscimo de cálcio e magnésio a 1mM e substituição de soro fetal bovino a 20% por soroalbumina bovina fração V (Sigma[®]) a 1%; uso de solução salina tamponada pH 7,2 (PBS) no lugar de Solução de Sais Balanceados de Hank (HBSS) para lavagem das lamínulas na etapa final do teste.

4.9.1 Cinética de adesão

Para realizar a cinética de adesão semearam-se células endoteliais sobre lamínulas de vidro redondas, com 14mm de diâmetro, em placa de 24 poços utilizando DMEM completo (com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1% antibiótico/antimicótico). Após formação da monocamada, o DMEM era trocado por tampão de adesão pH 7,2 (RPMI 1640, HEPES 25mM, Soroalbumina bovina 1%, CaCl_2 1mM e MgCl_2 1mM) e as células incubadas durante 60 minutos a 37°C e 5% CO_2 . Sangue total dos animais inoculados e do controle era centrifugado a 300g durante 5 minutos. O plasma e a camada de leucócitos eram descartados e os eritrócitos lavados uma vez em PBS pH 7,2 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,9mM, NaCl 154mM, KH_2PO_4 1mM) acrescido de CaCl_2 e MgCl_2 1mM, a 300g durante 5 minutos, ressuspendidos em tampão de adesão a uma concentração de 1% e colocados

sobre a monocamada de células endoteliais. Seguia-se incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 90 minutos. As lamínulas eram lavadas sob agitação por três vezes, durante 5 minutos cada vez, em PBS pH 7,2 sem Ca⁺² e Mg⁺², coradas com corante panóptico (Instant Prov[®], Newprov, Produtos para Laboratório, LTDA) de acordo com instrução do fabricante e fixadas sobre lâminas com resina (Entellan[®], MERCK). Em microscópio óptico, num aumento de 1000x, contou-se o número de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais em cada lamínula. As amostras de sangue dos animais inoculados e do controle coletadas por vez, eram testadas em duplicata. O resultado dos testes foi expresso como média de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais. As médias de adesão eritrocitária obtidas nos ensaios foram comparadas, entre os animais inoculados e o controle por meio de teste “t” de Student.

4.9.2 Testes de adesão em células estimuladas

Neste experimento cultivaram-se células endoteliais em meio DMEM completo (com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1% antibiótico/antimicótico), sobre lamínulas redondas, 14mm de diâmetro, em placas de 24 poços. Após a formação da monocamada, o DMEM era trocado pelo meio contendo a substância estimulante dependendo do tratamento (Quadro 2).

Quadro 2 – Tratamentos utilizados no estímulo de BUVECs

	Tratamento	Tempo de estímulo (h)	Quantidade
1	Plasma de animal infectado com <i>B. bovis</i> + Tampão de adesão sem Ca^{+2} e Mg^{+2}	2	10 µl de plasma / 1.5 ml de Tampão
2	Plasma de animal infectado com <i>B. bovis</i> + Tampão de adesão com Ca^{+2} e Mg^{+2}	2	10 µl de plasma / 1.5 ml de tampão
3	Sobrenadante de PBMC (citocinas) + DMEM	2	200 µl de sobrenadante / 1.5 ml de DMEM
4	Tampão de adesão com Ca^{+2} e Mg^{+2}	2	1.5 ml
5	Tampão de adesão sem Ca^{+2} e Mg^{+2}	2	1.5 ml
6	DMEM	2	1.5 ml

* BUVECs, células endoteliais de veia umbilical bovina

Após o estímulo das células endoteliais se colocavam os eritrócitos dos animais inoculados e do controle e continuava-se com o mesmo protocolo descrito na cinética de adesão no **item 4.9.1**. Eritrócitos de animais não infectados com *B. bovis* foram utilizados como controle negativo. Em microscópio óptico, num aumento de 1000x, contou-se o número de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais em cada lamínula. As amostras de sangue de animais inoculados e do controle eram testadas em duplicata. O resultado dos testes foi expresso em média de eritrócitos aderidos em 1000 células endoteliais. Para saber a significância dos tratamentos, as medias dos valores de adesão para cada tratamento foram comparadas entre tratamentos por meio de uma regressão linear múltipla utilizando o software estatístico Bioestat 2.0[®].

4.10 Imunohistoquímica em cultura de células endoteliais para identificação de moléculas de adesão *in vitro*.

Monocamadas confluentes de BUVECs cultivadas sobre lamínulas de vidro redondas, 14mm de diâmetro, em placa de 24 poços eram estimuladas com plasma de animais infectados com *B. bovis* e sobrenadante de PBMC correspondendo aos tratamentos 1 e 3 (Quadro 2). Células sem estímulo foram usadas como controle negativo, tratamento 6. A identificação das moléculas de adesão foi realizada segundo o protocolo de PRUDHOMME (1996), com algumas modificações feitas no presente trabalho, tais como: mudança da solução PBS-0,1% BSA por PBS pH 7,2 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,9 mM, NaCl 154mM, KH_2PO_4 1mM), uso de anti-IgG de camundongo biotinilada por IgG de coelho anti-IgG de camundongo ou IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase e utilização do DAB como revelador.

As células endoteliais, após estímulo, foram lavadas com PBS pH 7,2 durante 5 minutos, fixadas com solução de paraformaldeído ao 4% durante 20 minutos e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez. As células eram incubadas com PBS-glicina 0,1 M durante 10 minutos para bloquear os radicais aldeídos e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez. A monocamada era incubada em solução de H_2O_2 30 V a 3,5% em PBS pH 7,2 durante 20 minutos para bloquear a peroxidase

endógena e após 3 lavagens com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez, se bloquearam as ligações inespecíficas das células usando PBS com 10% de soro eqüino durante 30 minutos seguido de 2 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,5. As células eram incubadas durante toda a noite a 4° C em câmara úmida, com os anticorpos monoclonais antimoléculas de adesão ICAM-1 (CD54), VCAM (CD106), PECAM-1 (CD-31), E-selectina (CD 62-E) e trombospondina (TSP) diluídos 1:80 em PBS pH 7,2. Após 3 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,2 a monocamada era incubada durante 50 minutos a 37° C em câmara úmida com 150 µl de IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma®) diluída 1:200 em PBS para os anticorpos monoclonais anti ICAM-1, VCAM, PECAM-1 e trombospondina; IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase (Sigma®) diluída 1:300 para a E-selectina. Depois de 2 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,2 realizava-se a revelação com 150 µl de cromógeno (diaminobenzidina DAB, Sigma® 0,025% e 0,2% de H₂O₂ 30 V em PBS), durante 7 minutos no escuro seguida de 2 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,2 e contra-coloração com Hematoxilina de Harris 1:3 por 3 minutos. Finalmente, as células eram lavadas com água destilada deionizada durante 5 minutos, secadas, montadas com Entellam® sobre lâmina de vidro e observadas no microscópio óptico.

A intensidade de expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais foi avaliada da seguinte maneira: (-) ausência de expressão, (+) expressão pouco intensa, (+ +) expressão medianamente intensa, (+ + +) expressão intensa e (+ + + +) expressão muito intensa.

4.11 Imunohistoquímica para identificação de moléculas de adesão *in situ*

A identificação das moléculas de adesão foi realizada utilizando a técnica de imunoperoxidase indireta (Ipx) segundo o protocolo de PRUDHOMME (1996) com algumas modificações como descrito no **item 4.10**.

Foram tomadas amostras de tecido (cérebro, pulmão e rim) dos animais inoculados que vieram a óbito (**item 4.3**). A coleta das amostras foi realizada de acordo com protocolo descrito por GARETH *et al.* (1994). Onde o material coletado e até 20 minutos após a morte do animal era embebido em nitrogênio

líquido durante 30 minutos e estocado a -70°C até o momento do uso. Amostras de tecidos para controle negativo foram coletados de animais abatidos para consumo na região de Viçosa - MG. As amostras eram incluídas em Tissu Freezing Medium[®] (Leica Instruments GmbH) cortadas em criostato a -31°C , em secções de 6 μm e colocadas em lamina de vidro tratada com Polipep de alta viscosidade (Sigma[®]) 0,1%. As lâminas eram deixadas para secar a -31°C durante toda a noite e estocadas a -20°C até o momento do uso.

As secções de tecido foram fixadas com solução de paraformaldeído ao 4% durante 20 minutos e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez. As lâminas eram incubadas com PBS-glicina 0,1 M durante 10 minutos para bloquear os radicais aldeídos e lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez. As amostras de tecido eram incubadas em solução de H_2O_2 30V a 3,5% em PBS pH 7,2 durante 20 minutos para bloquear a peroxidase endógena e após 3 lavagens com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez, eram bloqueadas as ligações inespecíficas das amostras com PBS 10% de soro eqüino durante 30 minutos e lavadas 2 vezes com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada vez. As lâminas eram incubadas com os anticorpos monoclonais antimoléculas de adesão ICAM-1 (CD54), VCAM (CD106), PECAM-1 (CD-31), E-selectina (CD 62-E) e trombospondina (TSP) diluídos 1:80 em PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS de 5 minutos cada vez, o material era incubado com IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma[®]) diluída 1:200 em PBS pH 7,2 para os anticorpos monoclonais anti ICAM-1, VCAM, PECAM-1 e trombospondina; IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase (Sigma[®]) diluída 1:300 para a E-selectina, durante 50 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois de 2 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,2 realizava-se a revelação com cromógeno (diaminobenzidina DAB, Sigma[®] 0,025% e 0,2% de H_2O_2 30V em PBS pH 7,2) durante 7 minutos no escuro, seguindo-se 2 lavagens de 5 minutos com PBS pH 7,2 e contra-coloração com Hematoxilina de Harris 1:3 por 3 minutos. Finalmente, as lâminas eram lavadas com água destilada deionizada durante 5 minutos, secadas, montadas com Entellam[®] e

lamínula de vidro e observadas no microscópio óptico binocular (Nikon ECLIPSE E600).

A intensidade de expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais foi avaliada da seguinte maneira: (-) ausência de expressão, (+) expressão pouco intensa, (+ +) expressão medianamente intensa, (+ + +) expressão intensa e (+ + + +) expressão muito intensa.

4.12 Imunohistoquímica para detecção de antígenos de *Babesia bovis*

Os fragmentos de tecido fixaram-se em formol tamponado pH 7,2 durante 48 horas. Após fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 24 horas em cada solução. Posteriormente, foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast Plus[®] (Sigma[®]).

Cortes histológicos seriados de 5µm de espessura foram feitos em micrótomo de rotação SPENCER (American Optical Company).

Para detecção de antígenos de *B. bovis* utilizou-se a técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase – PAP (PROPHET *et al.*, 1992). O meio de inclusão foi retirado por duas passagens em xilol de 30 minutos cada, sendo hidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) trocando-se de solução a cada 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 (1,48g de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,43g de fosfato de sódio monobásico anidro, 7,2g de cloreto de sódio e água deionizada q.s.p. 1000ml). Em seguida, cobriram-se os cortes com soro normal caprino diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubou-se em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, enxugou-se o excesso de soro e sem deixar secar os cortes colocou-se anticorpo primário específico (IgG de coelho anti-*Babesia bovis*), diluído 1:20 em PBS pH 7,4; os cortes foram incubados durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho) produzido pelo LBCH / BIOAGRO-UFV, diluído 1:10 em PBS 7,4. Após

incubação em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C, os cortes foram lavados três vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 e posteriormente cobertos com o complexo PAP produzido em coelho (SIGMA®), diluído 1:200 de acordo com especificação do fabricante e imediatamente incubados em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C. Os cortes foram lavados novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e foram imediatamente colocados em solução reveladora recém preparada [25mg de diaminobenzidina (DAB), 200µl de H₂O₂ (30V) em 100ml de PBS pH 7,4] durante 5 minutos. Finalmente os cortes foram lavados durante 5 minutos em PBS pH 7,4 e contracorados com Hematoxilina de Harris 1:10 em PBS pH 7,4 durante 20 segundos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan entre lâmina e lamínula.

5. RESULTADOS

5.1 Estabelecimento dos cultivos primários de células endoteliais

A metodologia utilizada para extração de células endoteliais a partir de veia umbilical bovina, permitiu cultivos formados por células poligonais pavimentosas, que proliferaram ativamente formando monocamadas confluentes (Figura 1).

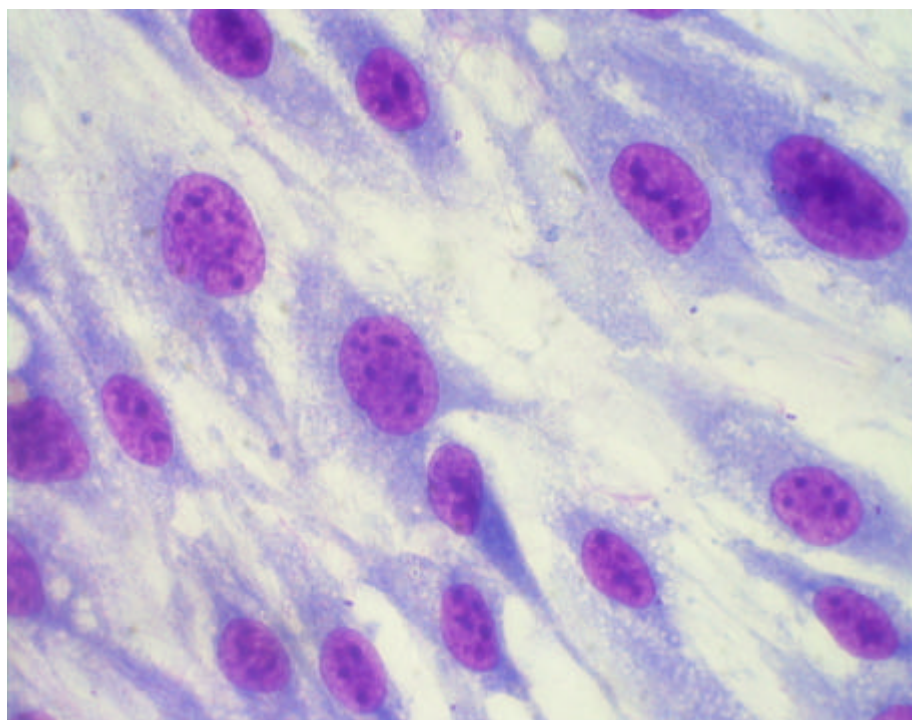


Figura 1 – Monocamada de células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs), Instant Prov[®], 1000x.

5.2 Comprovação da natureza endotelial das BUVECs

A natureza endotelial das BUVECs foi confirmada pela capacidade de degradar e acumular a lipoproteína acetilada de baixa densidade marcada com 1, 1'- dioctadecyl - 3,3,3',3' - tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil-Ac-LDL) que atua como marcador específico de células endoteliais. Depois de cinco passagens, as culturas apresentaram-se essencialmente livres de células contaminantes, indicado pela uniforme habilidade para reter o Dil-Ac-LDL. O resultado foi típico de células endoteliais, mostrando fluorescência localizada no citoplasma e na parede celular, mas não no núcleo (Figura 2 A e B).

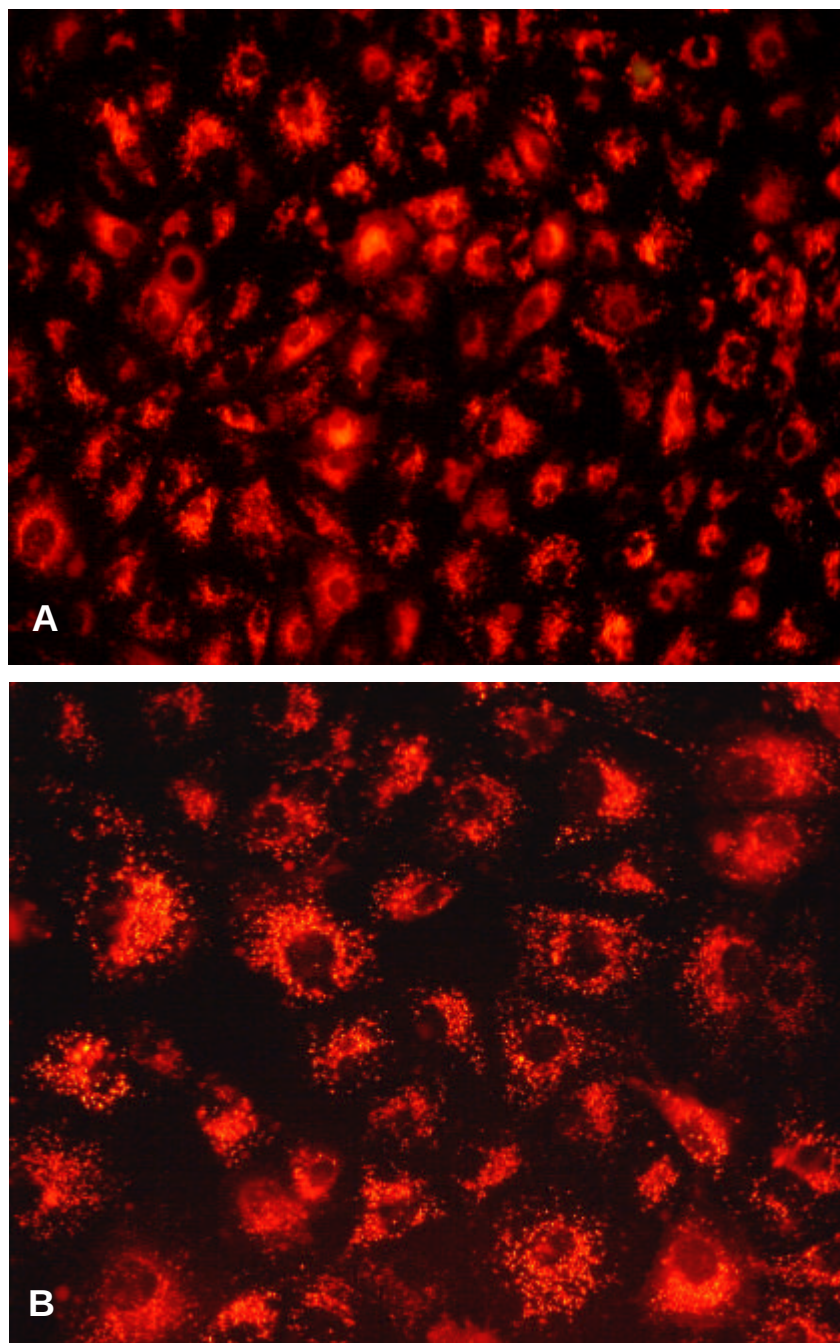


Figura 2 – Células endoteliais de veia umbilical bovina marcadas com Dil-Ac-LDL. 200 x (A) e 400x (B).

5.3 Cinética de adesão de eritrócitos em células endoteliais não estimuladas

Conforme mostrado no Quadro 3, observa-se que os valores das médias de eritrócitos aderidos são muito variáveis em todos os animais a partir do segundo dia pós-inoculação até o fim do experimento. Ainda, constatou-se que embora houve aumento das médias de adesão de eritrócitos, a partir do 6^o dia pós-inoculação em todos os animais, não houve diferença significativa entre as médias de adesão nos diversos dias da amostragem de cada animal.

A figura 3 (A e B) mostra a cinética de adesão no decorrer do experimento. Observa-se que a partir do dia 2 pós-inoculação aumentam os níveis de adesão até chegar ao fastígio no dia 8, a partir do qual começam a diminuir os níveis até o dia 12, quando se inicia uma nova elevação da adesão, permanecendo constante até o último dia do estudo.

Somente eritrócitos não parasitados foram detectados como aderentes às BUVECs (Figura 4 A e B).

Nos testes com sangue do animal controle (B6) não houve aumento da média de eritrócitos aderidos em BUVECs, entretanto observa-se adesão de polimorfonucleares principalmente de neutrófilos (Figura 5).

Quadro 3 – Cinética de adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com *B. bovis* (amostra BbovUFV1 7^a passagem) aderidos em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs).

Dia pós-inoculação	Médias de eritrócitos aderidos em 1000 BUVECs					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0	0	0	1.5	0	1	0
2	27.5	15.5	32	20.5	1.5	0
4	49	30.5	40	40	36.5	1.5
6	90.5 ^a	68 ^a	64 ^a	80.5 ^a	65 ^a	0 ^a
8	114.5 ^a	89 ^a	81 ^a	89 ^a	40.5 ^a	2 ^a
10	81 ^a	89.5 ^a	83 ^a	68.5 ^a	44 ^a	0 ^a
12	66.5 ^a	75.5 ^a	87 ^a	69.5 ^a	46 ^a	1 ^a
14	97 ^a	89.5 ^a	71 ^a	70.5 ^a	59.5 ^a	0 ^a
16	94 ^a	89.5 ^a	78 ^a	72 ^a	63 ^a	1.5 ^a

B1, B2, B3, B4 e B5, animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem
B6, animal controle.

As médias foram calculadas entre duplicatas de um mesmo teste.

^a, Indica médias estatisticamente iguais entre os dias pelo teste t com P<0,01

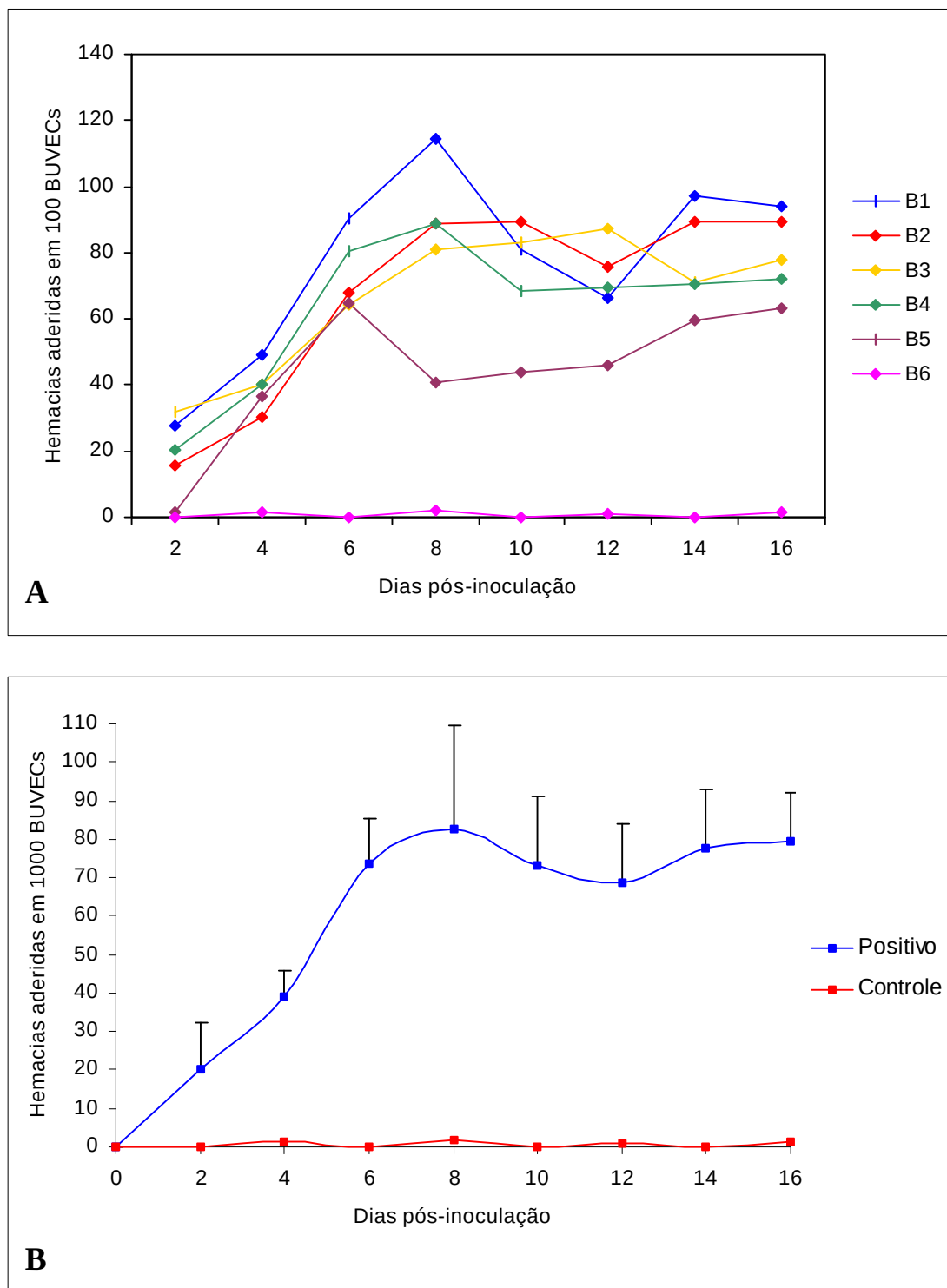


Figura 3 – A. Cinética de adesão de eritrócitos de animais inoculados com *B. bovis* (amostra BbovUFV1 7^a passagem) aderidos em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs); B. Cinética de adesão expressa em médias de eritrócitos de animais inoculados com *B. bovis* (amostra BbovUFV1 7^a passagem) aderidos em células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs).

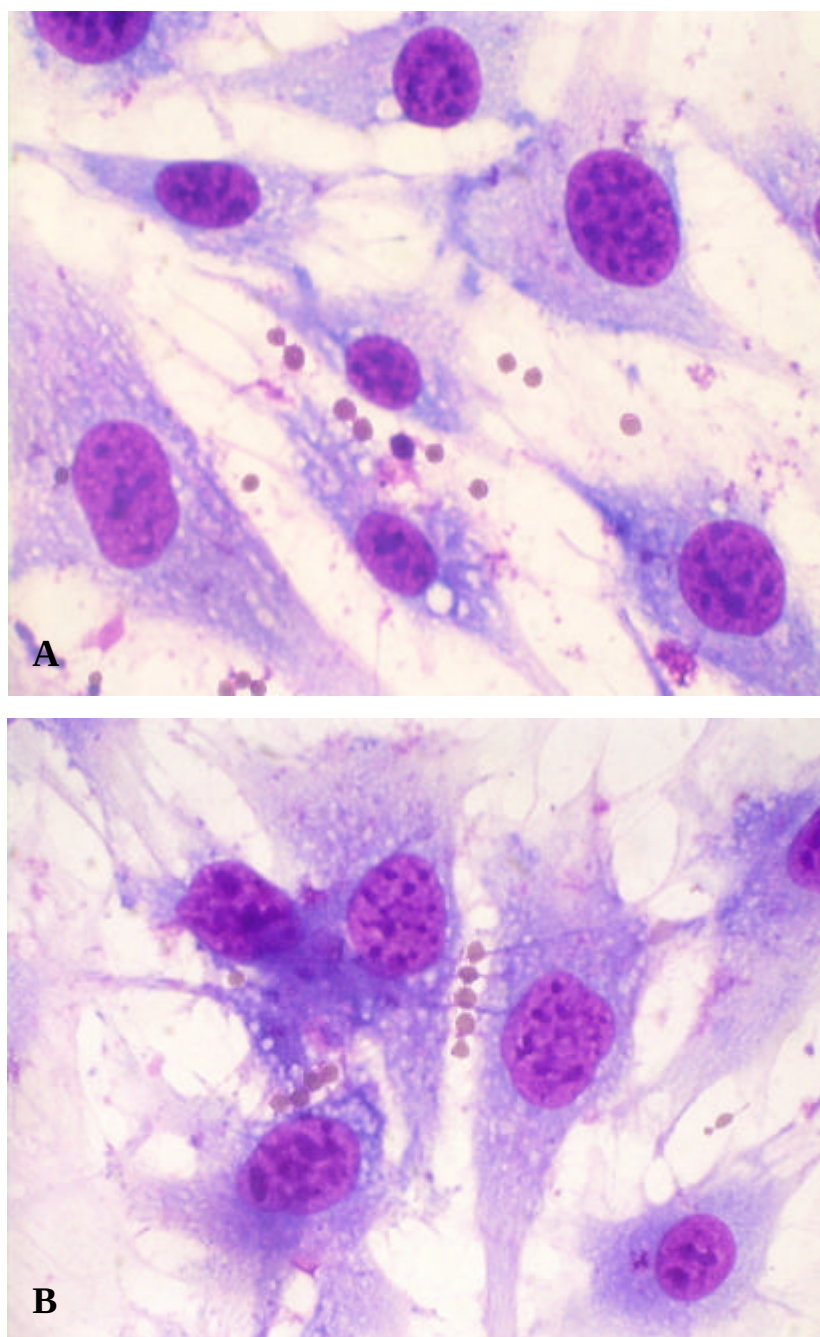


Figura 4 – Adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com amostra de *B. bovis* (BbovUFV1 7^a passagem) em BUVECs (A e B). Instant Prov[®], 1000x. A seta indica a ligação entre eritrócito e célula endotelial.

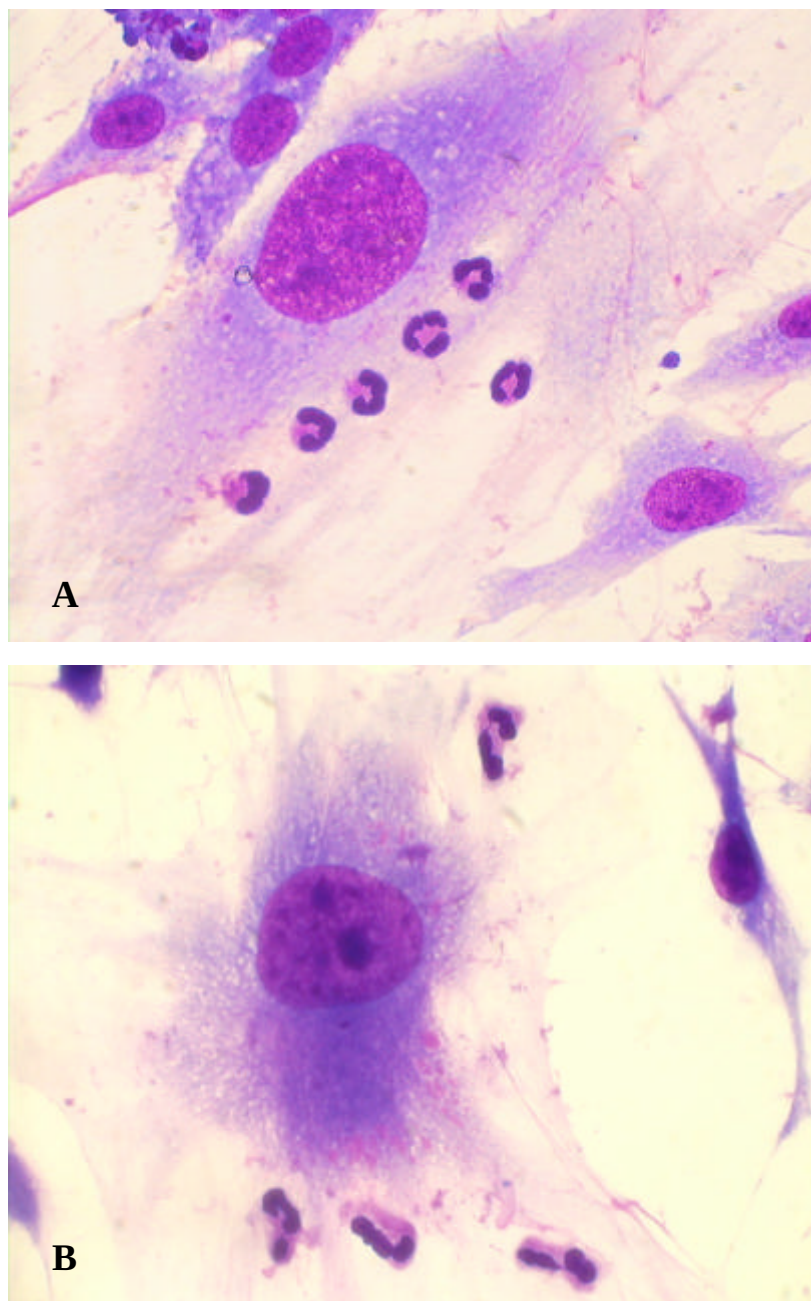


Figura 5 – Adesão de leucócitos em HUVECs (A e B), Instant Prov[®], 1000x .

5.3.1 Avaliação clínica

Aos 10 dias pós-inoculação, observaram-se eritrócitos parasitados com merozoítos de *B. bovis* nos animais B1, B2, B3, B4 e B5 (Quadro 4).

O aparecimento de sinais clínicos de babesiose aguda, caracterizados por aumento de temperatura retal (igual ou superior a 39°C), redução do volume globular (igual ou superior a 30%), ocorreu aos 10 dias pós-inoculação no animal B3, e aos 12 dias pós-inoculação nos animais B1, B2, B4 e B5. O animal controle B6 não apresentou alterações nos parâmetros clínicos avaliados.

Quadro 4 – Parâmetros clínicos e laboratoriais de animais inoculados com *B. bovis* (amostra BbovUFV1 7^a passagem).

Animal	Parâmetro	DIAS PÓS-INOCULAÇÃO								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
B1	PCV%	24 -	24 -	23 -	23 -	22 -	20 +	20 +	15 +	15 +
	T(°C)	37.5	38.7	38.6	38.4	38.6	38.8	40.5	40.6	41.0
B2	PCV%	30	31	30	28	27	27	26	20	12
	P	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	T(°C)	37.6	37.6	38.9	38.6	38.3	38.2	39,7	40.8	41.2
B3	PCV%	31	31	30	28	25	20	22	20	20
	P	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	T(°C)	38	38.9	38.9	38.4	38.3	39.3	40,1	40.4	40.1
B4	PCV%	26	26	25	24	23	22	24	16	10
	P	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	T(°C)	37.9	38.4	38.6	38.7	38.4	38.8	40.2	40.5	40.7
B5	PCV%	28	27	26	26	27	27	27	24	14
	P	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	T(°C)	37.5	37.9	38.7	38.3	38.2	37.9	39.2	39.2	39.9
B6	PCV%	30	28	29	30	27	29	27	28	28
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T(°C)	37.7	38	38.5	37.9	38	37.5	38	38.5	38

B1, B2, B3, B4, B5, animais inoculados com amostra BbovUFV1 7^a passagem
B6, animal controle.

PCV, volume globular; P, parasitemia; T, temperatura em graus Celsius

5.4 Testes de adesão de eritrócitos em BUVECs estimuladas

Os testes de adesão de eritrócitos em monocamadas de BUVECs, previamente tratadas conforme descrito no Quadro 2 (**Item 4.9.2**), mostraram uma maior adesão de eritrócitos procedentes de animais infectados quando as BUVECs foram estimuladas com os tratamentos que empregavam plasma e sobrenadante de PBMC (tratamentos 1, 2 e 3), do que aquela observada nas células que não receberam estímulo (tratamentos 4, 5 e 6) onde, além da adesão de eritrócitos, também houve adesão de leucócitos, principalmente polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos) e alguns linfócitos.

A análise estatística mostra que há diferença significativa ($P < 0,05$) na adesão mediada pelo tratamento 3, enquanto que os tratamentos 4, 5 e 6 não induziram adesão estatisticamente significativa. Já os tratamentos 1 e 2 apresentaram diferença significativa ($P < 0,10$) (Quadro 5, Figura 6, A, B, C).

Os testes de adesão realizados com eritrócitos do controle negativo, mostraram adesão somente de leucócitos, principalmente neutrófilos (Figura 5).

Quadro 5. Testes de adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com *B. bovis* em BUVECs estimuladas com diferentes tratamentos.

Tratamento		Média de eritrócitos aderidos em 1000 BUVECs	
		Animal infectado com <i>B. bovis</i>	controle
1	Plasma de animal infectado com <i>B. bovis</i> + Tampão de adesão sem Ca^{+2} e Mg^{+2}	410*	0
2	Plasma de animal infectado com <i>B. bovis</i> + Tampão de adesão com Ca^{+2} e Mg^{+2}	408*	0
3	Sobrenadante de PBMC (citocinas) + DMEM	489**	0
4	Tampão de adesão com Ca^{+2} e Mg^{+2}	140 ^{N.S}	0
5	Tampão de adesão sem Ca^{+2} e Mg^{+2}	113 ^{N.S}	0
6	DMEM	244 ^{N.S}	0

BUVECs, células endoteliais de veia umbilical bovina.

* Diferença significativa ($P < 0,10$)

** Diferença significativo ($P < 0,05$)

^{N.S} Diferença não significativo

As médias foram calculadas entre duplicatas de um mesmo teste.

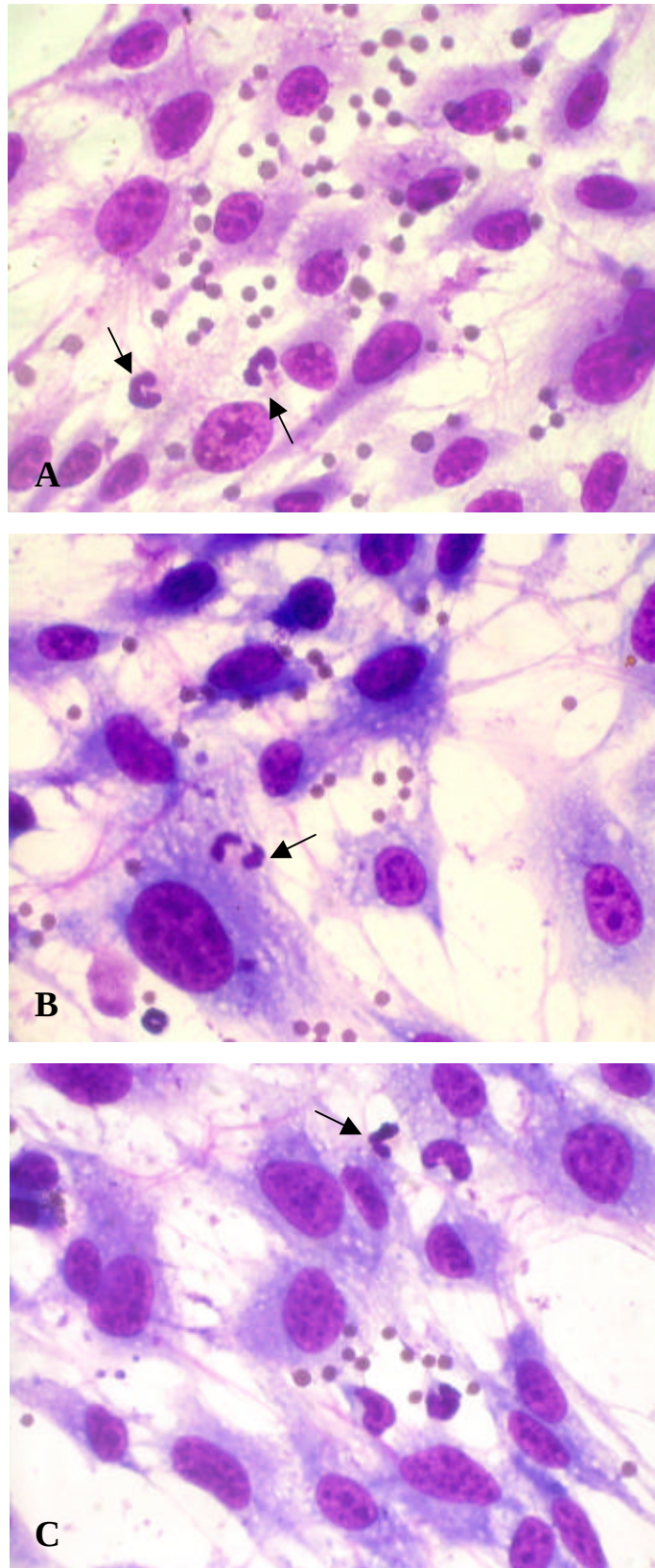


Figura 6 – Adesão de eritrócitos de animais inoculados com *B. bovis* em HUVECs estimuladas. A. Estímulo com sobrenadante de cultura de PBMC; B. Estímulo com plasma; C. Sem estímulo. As setas indicam adesão de PMN. Instant Prov[®]. 1000x.

5.5 Imunohistoquímica para identificação de moléculas de adesão *in vitro*

Os resultados da imunoperoxidase indireta utilizando anticorpos monoclonais contra ICAM-1, VCAM, PECAM-1 e trombospondina, e policlonal contra E-selectina apresentados no Quadro 6, mostram que a maioria das BUVECs tem imunomarcacão positiva para estas moléculas de adesão, observadas uniformemente na superfície celular. Entretanto, a imunomarcacão é mais intensa nas células estimuladas com plasma de animal infectado com *B.bovis* e com sobrenadante de cultura de PBMC contendo citocinas quando comparada à observada nas células não estimuladas.

Assim, ICAM-1 apresentou uma expressão intensa em BUVECs estimuladas com plasma e sobrenadante de PBMC. A expressão desta molécula em células endoteliais que receberam o tratamento controle foi pouco intensa (Figura 7 A, B, C).

Nas células endoteliais estimuladas com plasma e sobrenadante, VCAM teve uma expressão intensa. Nas células endoteliais do tratamento controle não houve expressão desta molécula (Figura 8 A, B e C).

PECAM-1 teve uma expressão intensa nas células endoteliais estimuladas com plasma de animal inoculado com *B. bovis* e apresentou uma expressão medianamente intensa nas BUVECs estimuladas com sobrenadante de PBMC. As células endoteliais do tratamento controle mostraram uma expressão pouco intensa (Figura 9 A, B e C).

A expressão de E-selectina, em células endoteliais estimuladas com plasma, foi muito intensa. Em células estimuladas com sobrenadante de cultura de PBMC, esta molécula mostrou expressão intensa se comparada com a expressão pouco intensa das células do tratamento controle (Figura 10 A, B e C).

A trombospondina teve uma expressão intensa na superfície das células estimuladas com plasma e uma expressão pouco intensa nas BUVECs estimuladas com sobrenadante de PBMC. As células do tratamento controle não apresentaram expressão desta molécula (Figura 11 A, B e C).

Quadro 6 - Intensidade da expressão de moléculas de adesão em BUVECs

<i>Antígeno</i>	<i>Tratamentos</i>		
	Plasma	Sobrenadante PBMC	DEMEN
ICAM-1	+++	+++	+
VCAM	+++	+++	-
PECAM-1	+++	++	+
E-selectina	++++	+++	+
TSP	+++	+	-

+ + + +, expressão muito intensa
 + + +, expressão intensa
 + +, expressão medianamente intensa
 +, expressão pouco intensa
 -, ausência de expressão

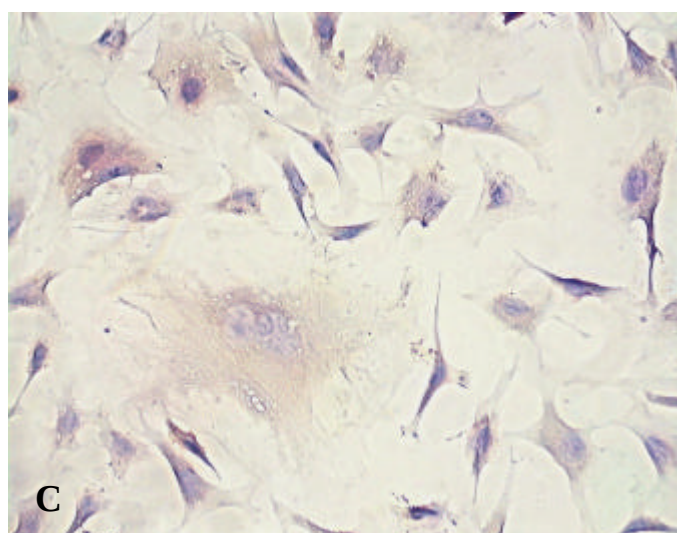
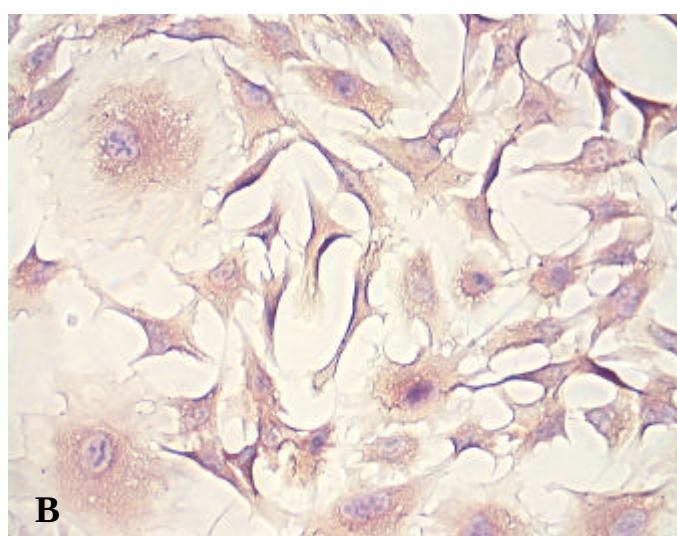
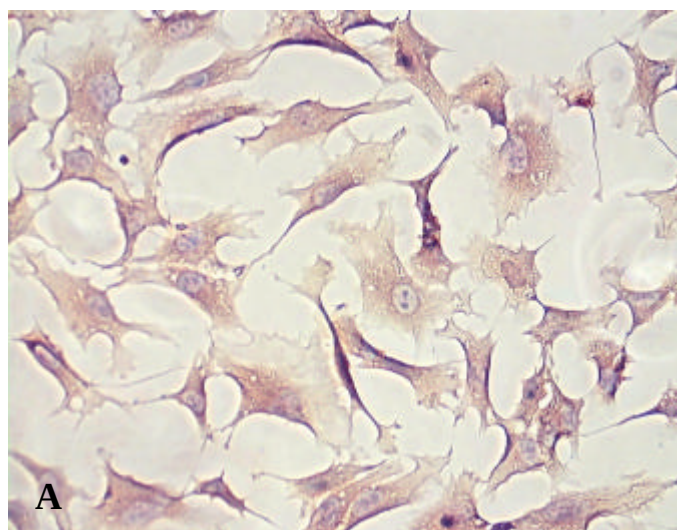


Figura 7 – Expressão de ICAM-1 em HUVECs. A. Células estimuladas com plasma; B. Células estimuladas com sobrenadante de PBMC; C. Células sem estímulo (DMEM). Peroxidase indireta, 400x.

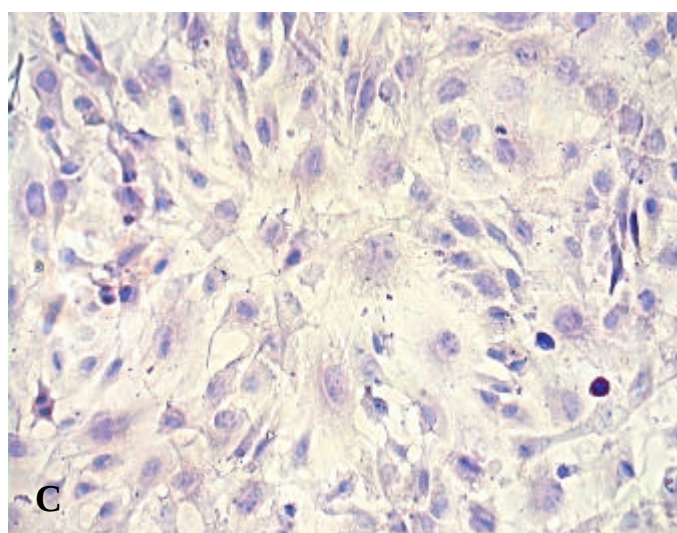
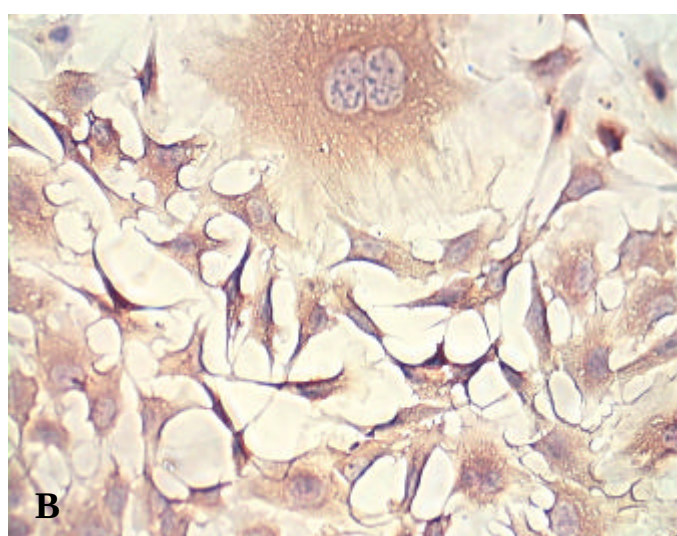
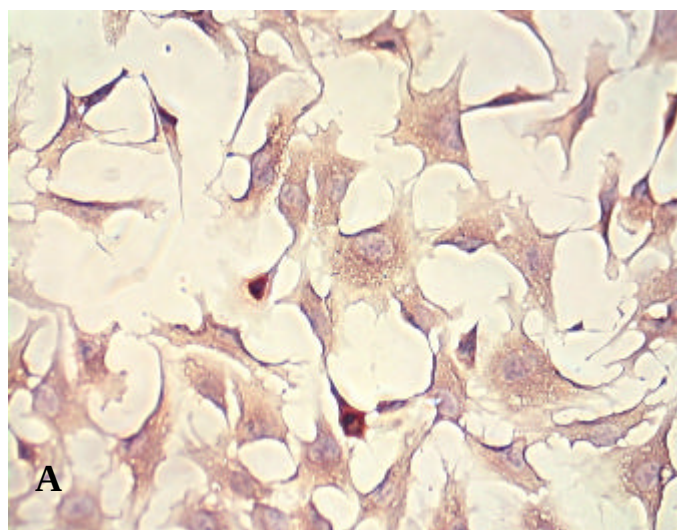


Figura 8 - Expressão de VCAM (CD106) em HUVECs. A. Células estimuladas com plasma; B. Células estimuladas com sobrenadante de PBMC; C. Células sem estímulo (DMEM). Peroxidase indireta, 400x.

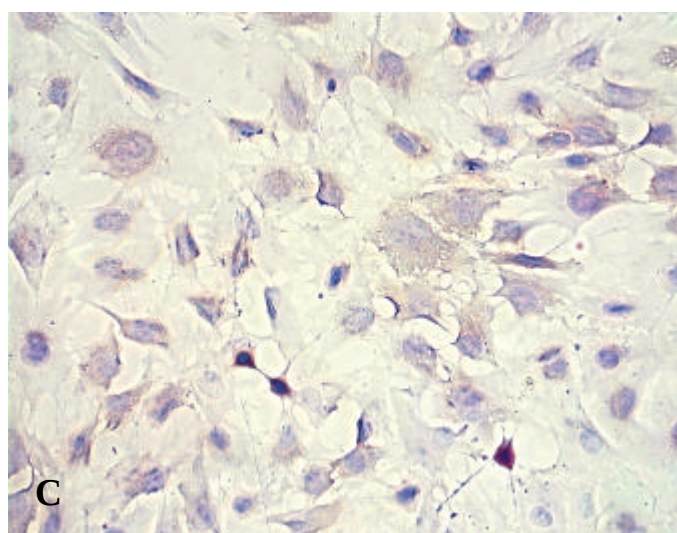
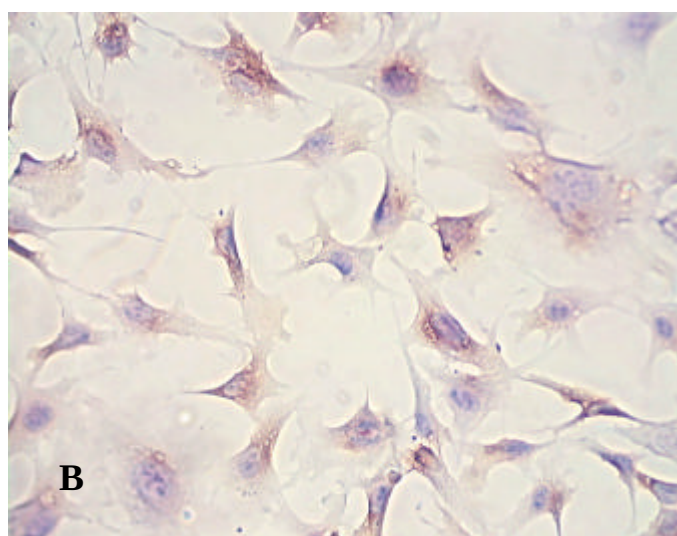
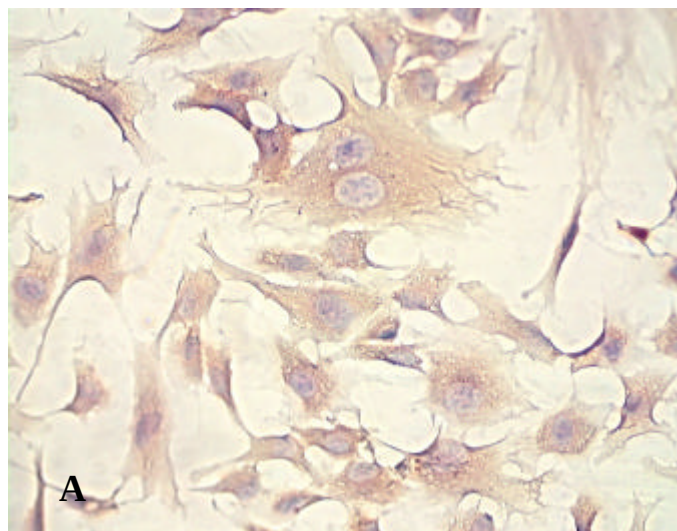


Figura 9 – Expressão de PECAM-1 (CD31) em HUVECs. A. Células estimuladas com plasma; B. Células estimuladas com sobrenadante de PBMC; C. Células sem estímulo (DMEM). Peroxidase indireta, 400x.

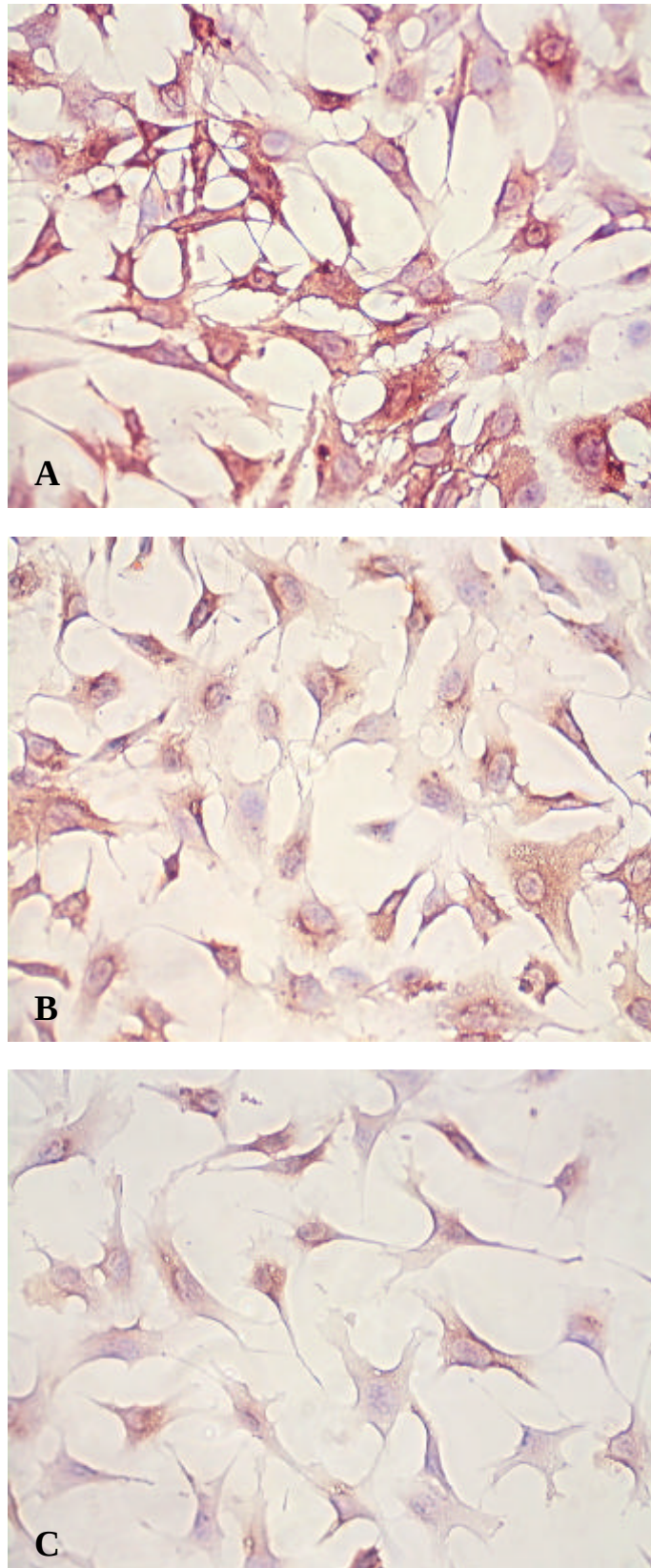


Figura 10 – Expressão de E- selectina (CD62 E) em HUVECs. A. Células estimuladas com plasma; B. Células estimuladas com sobrenadante de PBMC; C. Células sem estímulo (DMEM). Peroxidase indireta, 400x.

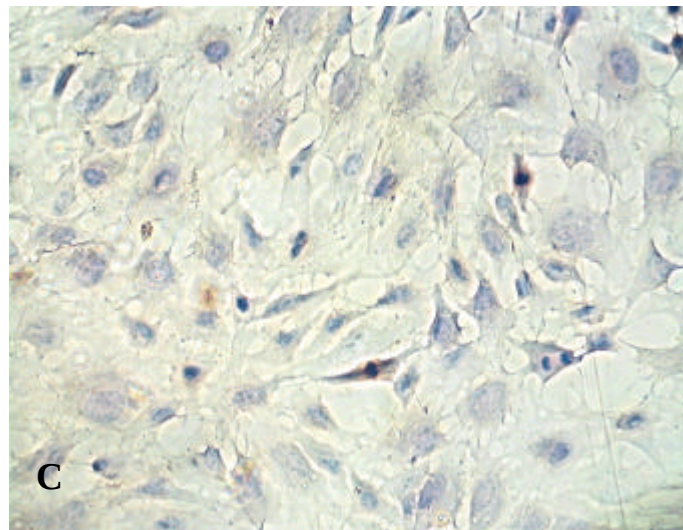
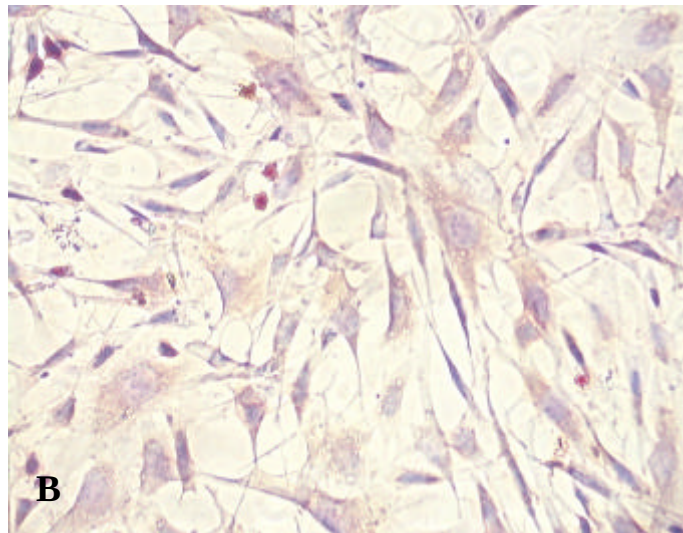
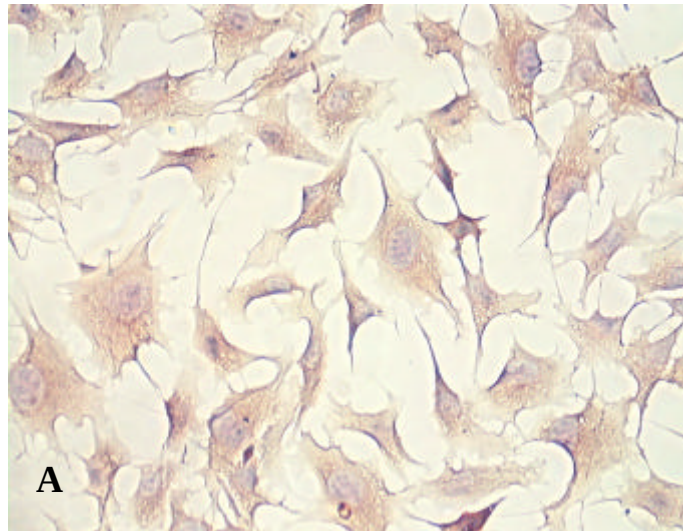


Figura 11 - Expressão de Trombospondina (TSP) em HUVECs. A. Células estimuladas com plasma; B. Células estimuladas com sobrenadante de PBMC; C. Células sem estímulo (DMEM). Peroxidase indireta, 400x.

5.6 Expressão de moléculas de adesão *in situ*

Os resultados da imunoperoxidase indireta realizada nas amostras de cérebro, pulmão e rim dos animais infectados, mostraram heterogeneidade na expressão das moléculas de adesão pesquisadas, variando apenas na intensidade de expressão (Quadro 7).

No cérebro dos animais inoculados com *B. bovis*, ICAM-1 teve uma expressão muito intensa no endotélio dos capilares cerebrais quando comparada a observada no endotélio cerebral do animal controle, em que não se observou expressão de esta molécula (Figura 12 A e B). No tecido pulmonar dos animais inoculados, esta molécula apresentou uma expressão intensa, em contraposição da ausência de expressão observada no pulmão controle (Figura 12 C e D). No tecido renal dos animais que morreram de babesiose, houve expressão intensa de ICAM-1, principalmente nos capilares glomerulares e intertubulares. O rim do animal controle não teve expressão desta molécula (Figura 12 E e F).

No cérebro dos animais positivos, houve expressão muito intensa de VCAM, distribuída nas células endoteliais dos vasos; não houve expressão desta molécula no cérebro controle (Figura 13 A e B). No tecido pulmonar dos animais positivos, VCAM teve uma expressão medianamente intensa com pouca expressão no pulmão controle (Figura 13 C e D). No rim dos animais positivos, VCAM foi expressa intensamente nos capilares glomerulares e intertubulares; no tecido renal usado como controle, esta molécula não teve expressão (Figura 13 E e F).

A expressão de PECAM-1 foi muito intensa nas células endoteliais do cérebro dos animais positivos, e houve ausência de expressão nos endotélios do cérebro controle (Figura 14 A e B). No pulmão, a expressão de PECAM-1 foi medianamente intensa, e pouco intensa no tecido pulmonar do animal controle (Figura 14 C e D). No rim, esta molécula teve expressão pouco intensa e houve ausência de expressão no rim do animal controle (Figura 14 E e F).

A E-selectina no cérebro dos animais positivos teve expressão muito intensa principalmente no endotélio vascular e no tecido ao redor dos vasos (Figura 15 A). No cérebro controle, a expressão foi pouco intensa (Figura 15 B). No pulmão dos animais inoculados, esta molécula expressou-se muito

intensamente em todo o tecido pulmonar, com expressão intensa no pulmão controle (Figura 15 C e D). No rim dos animais que morreram de babesiose, a E-selectina teve uma expressão medianamente intensa (Figura 15 E). E o rim controle, não teve expressão desta molécula (Figura 15 F).

A expressão de trombospondina no cérebro foi muito intensa nas células endoteliais que fazem parte da microcirculação cerebral. No endotélio dos vasos cerebrais do controle não se observou expressão de esta molécula (Figura 16 A e B). No pulmão dos animais infectados a TSP se expressou muito intensamente nos endotélios dos vasos deste tecido; e no pulmão do animal controle houve uma expressão medianamente intensa desta molécula (Figura 16 C e D). No rim dos animais inoculados observou-se uma expressão muito intensa de TSP nos capilares glomerulares e intertubulares; e no tecido renal do animal controle não se observou expressão desta molécula (Figura 16 E e F).

Quadro 7 – Intensidade da expressão de moléculas de adesão em diferentes tecidos

Antígeno	Tecidos					
	Cérebro		Pulmão		Rim	
	Infectado com <i>B. bovis</i>	controle	Infectado com <i>B. bovis</i>	controle	Infectado com <i>B. bovis</i>	controle
ICAM-1	++ ++	-	++ ++	++	++ ++	-
VCAM	++ ++	-	++	+	++ ++	-
PECAM-1	++ ++	-	++	+	+	-
E-selectina	++ ++	+	++ ++	++ ++	++	-
TSP	++ ++	-	++ ++	++	++ ++	+

++ ++, expressão muito intensa
 ++ ++, expressão intensa
 ++, expressão medianamente intensa
 +, expressão pouco intensa
 -, ausência de expressão

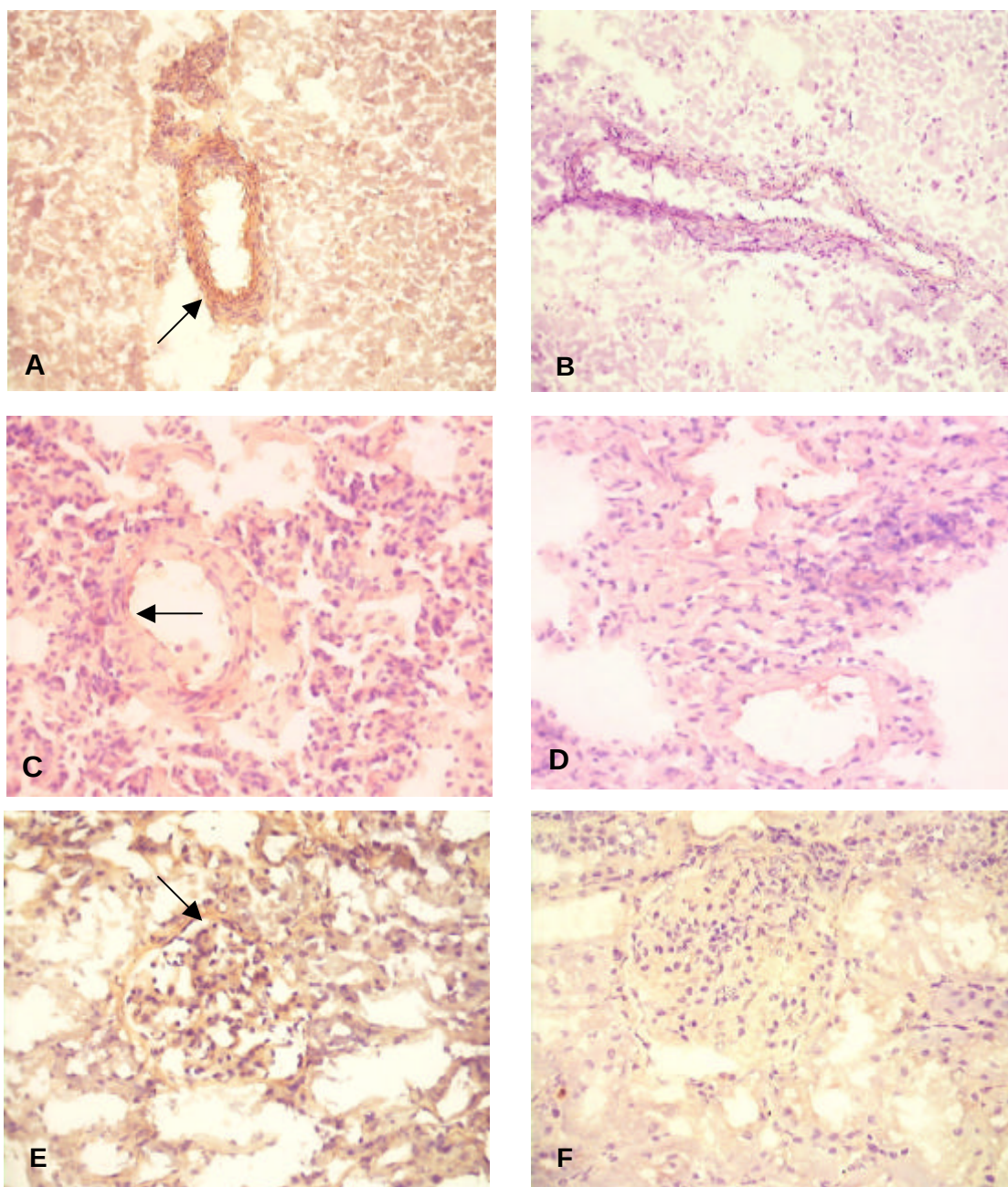


Figura 12 – Imunoperoxidase indireta. Expressão de ICAM-1 (CD54) em tecidos de animais infectados com *B. bovis*. A. forte reação positiva em vaso do cérebro, 200x; B, vaso controle, 200x; C, reação positiva em pulmão, 400x; D, pulmão controle, 400x; E, reação positiva em rim, 400x; F, rim controle, 400x. As setas indicam imunomarcção positiva..

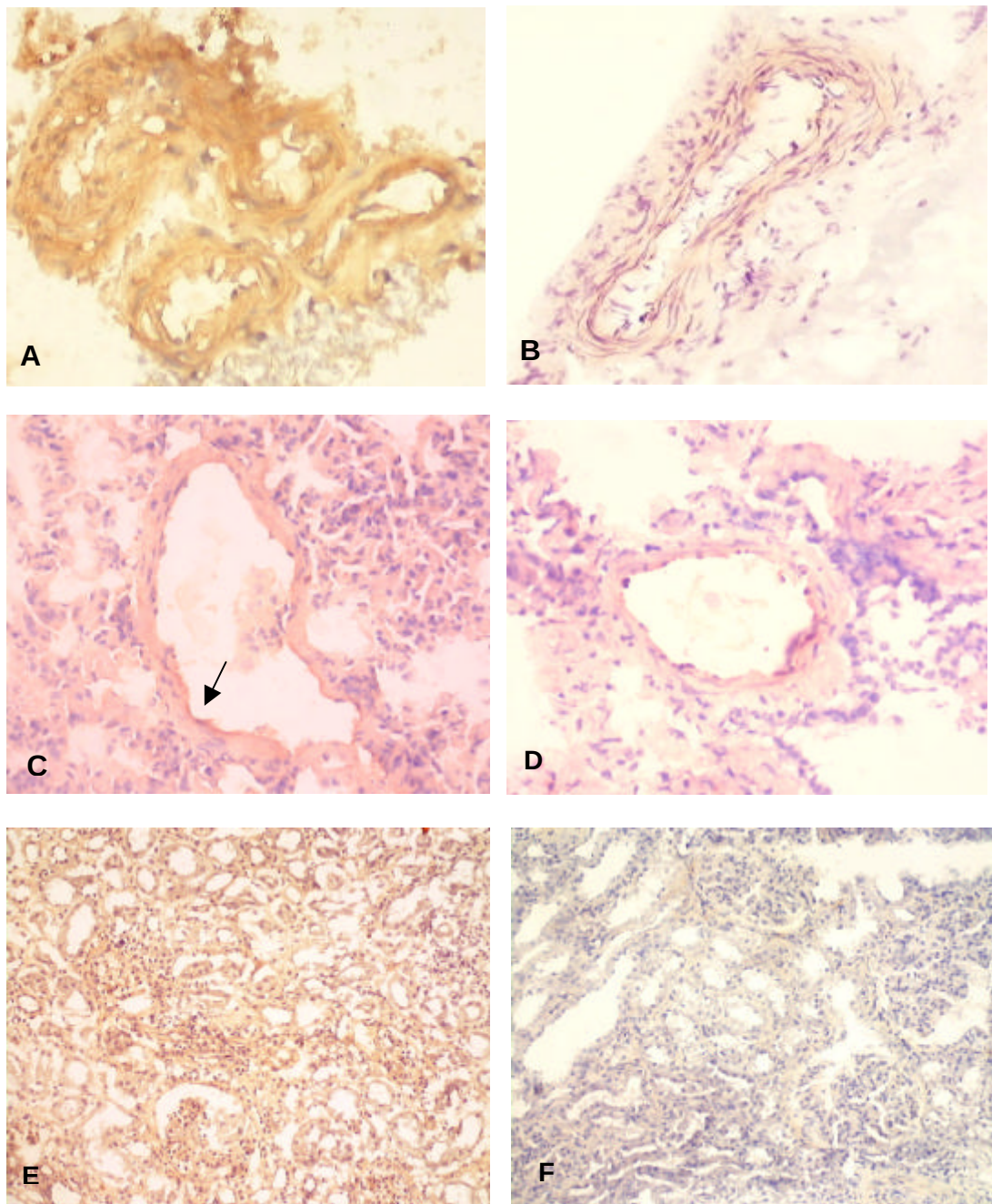


Figura 13 - Expressão de VCAM (CD106) em tecidos de animais infectados com *B. bovis*. A, forte reação positiva em vaso cerebral, 400x; B, vaso do cérebro controle, 400x; C, reação positiva em pulmão, 400x; D, pulmão controle, 400x; E, reação positiva em rim, 200x; F, rim controle, 200x. Imunoperoxidase indireta.

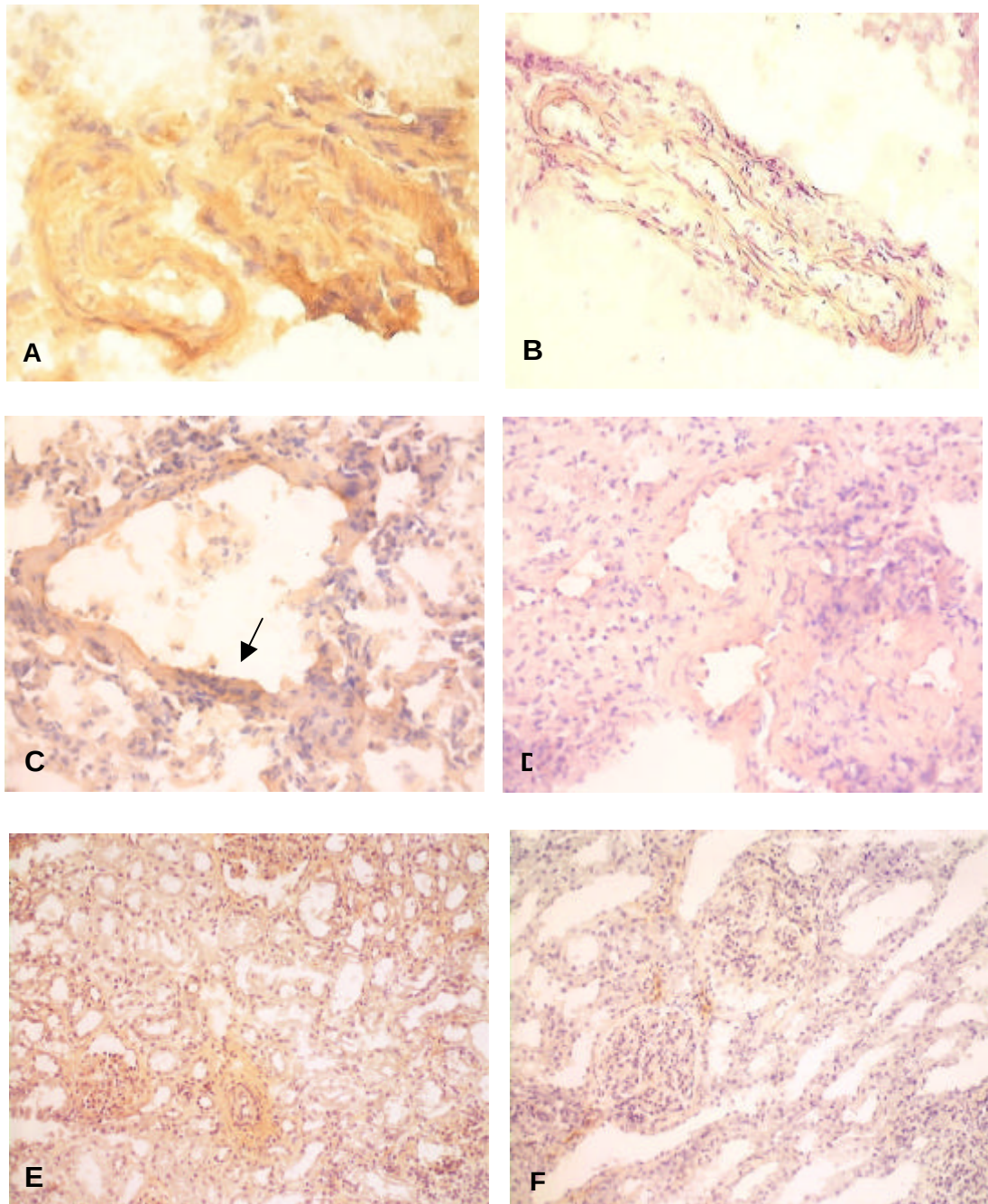


Figura 14 – Expressão de PECAM-1 (CD31) em tecidos de animais infectados com *B. bovis*. A, reação positiva em vaso do cérebro, 400x; B, vaso do cérebro controle, 400x; C, reação em pulmão positivo, 400x; D, pulmão controle, 400x; E, reação positiva em rim, 200x; F, rim controle, 200x. Imunoperoxidase indireta. A seta indica imunomarcção positiva.

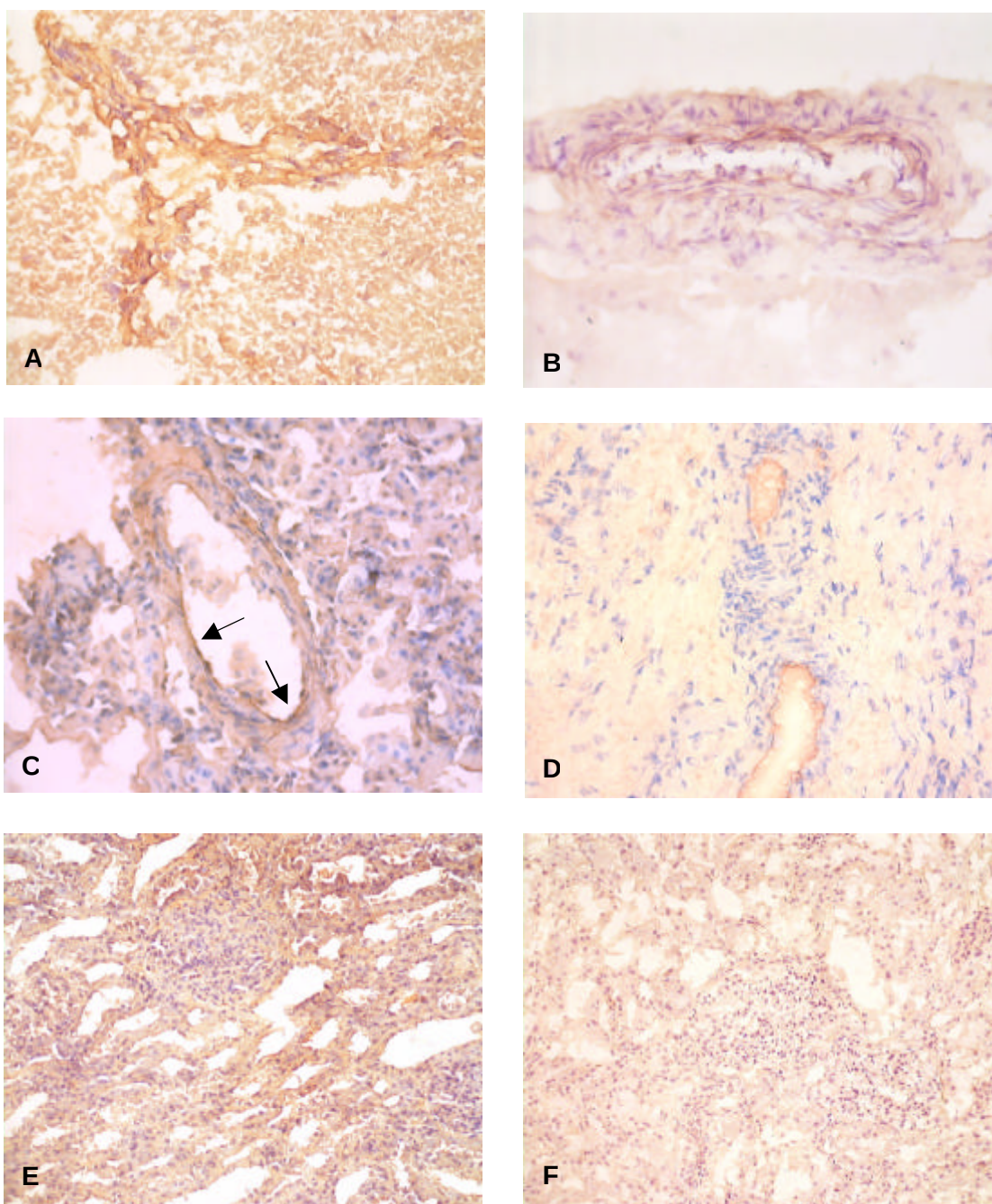


Figura 15 – Expressão de E-selectina (CD62E) em tecidos de animais infectados com *B. bovis*. A, reação positiva em vaso do cérebro, 400x; B, vaso do cérebro controle, 400x; C, reação em pulmão positivo, 400x; D, pulmão controle, 400x; E, reação positiva em rim, 200x; F, rim controle, 200x. Imunoperoxidase indireta. As setas indicam imunomarcacão positiva.

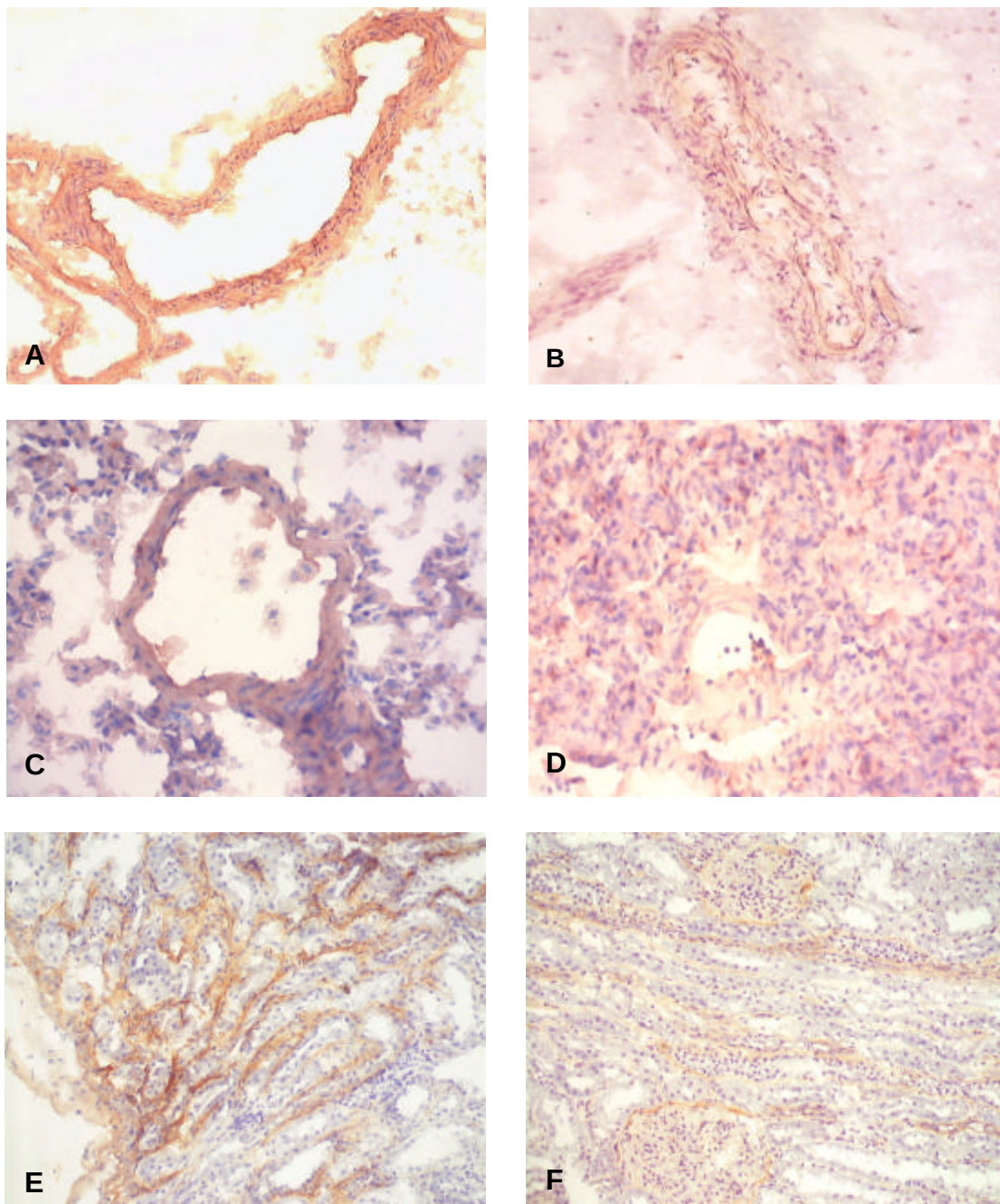


Figura 16 – Expressão de Trombospondina (TSP) em tecidos de animais infectados com *B. bovis*. A, reação positiva em vaso do cérebro, 400x; B, vaso do cérebro controle, 400x; C, reação positiva em pulmão, 400x; D, pulmão controle, 400x; E, reação positiva em rim, 200x; F, rim controle, 200x. Imunoperoxidase indireta.

5.7 Imunohistoquímica para detecção de antígenos de *B. bovis*

Ao exame dos fragmentos de tecidos, corados pelo método de PAP, dos animais que morreram 14 e 15 dias pós-inoculação com *B. bovis*, foi possível detectar, em cérebro e pulmão, reatividade positiva nas hemácias que ficaram aglutinadas na luz dos vasos e do tecido ao redor deles, o mesmo não foi observado no animal negativo (Figuras 17 e 18). Já no tecido renal observou-se reatividade positiva principalmente nos capilares glomerulares (Figura 19).

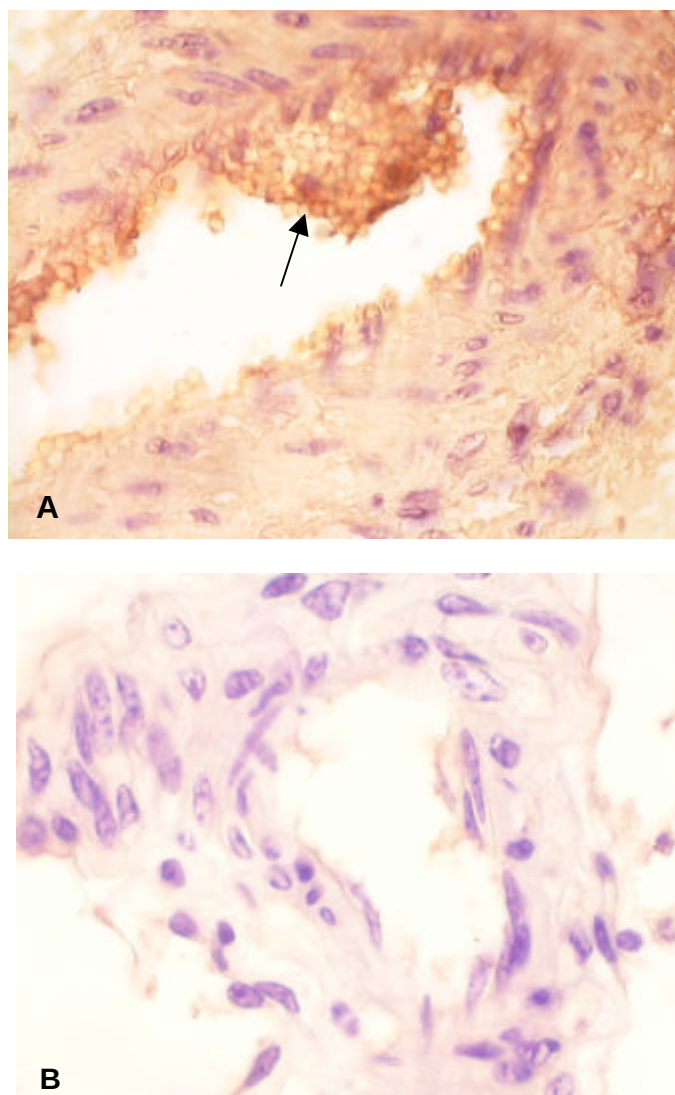


Figura 17 – Teste de PAP para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em microcirculação cerebral bovina. A. reatividade positiva em eritrócitos aderidos a células endoteliais (setas) de animal inoculado com *B. bovis*, 1000x; B. Ausência de reatividade positiva em vaso pulmonar do bovino negativo, 1000x.

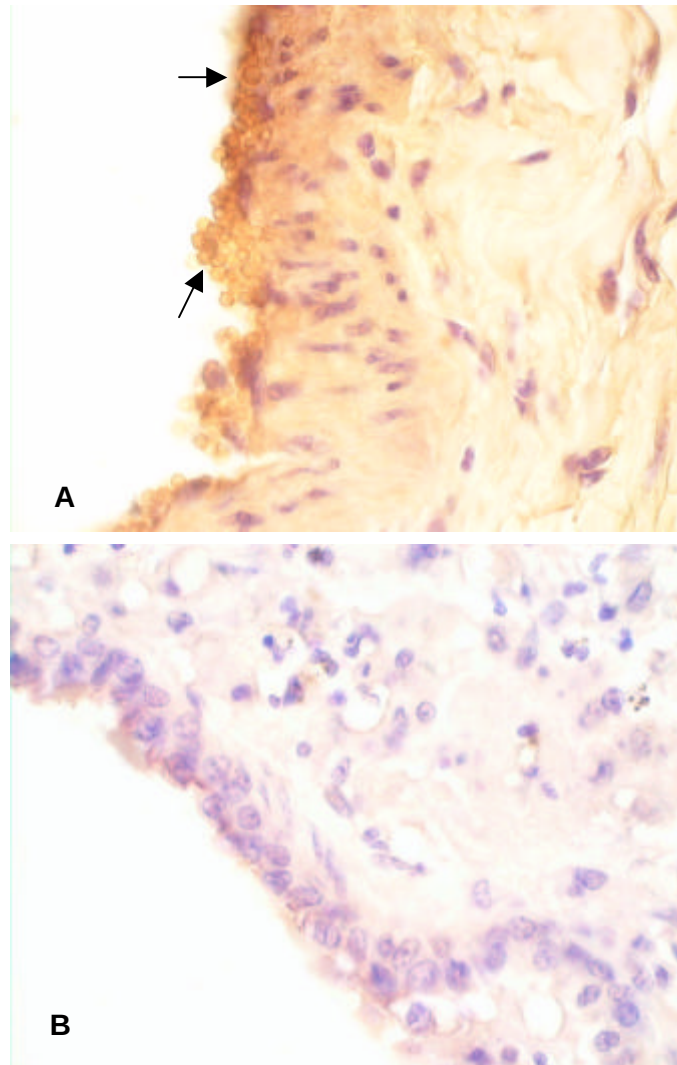


Figura 18 - Teste de PAP para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em microcirculação pulmonar bovina. A. reatividade positiva em eritrócitos aderidos a células endoteliais (setas) de animal inoculado com *B. bovis*, 1000x; B. Ausência de reatividade positiva em vaso pulmonar do bovino negativo, 1000x.

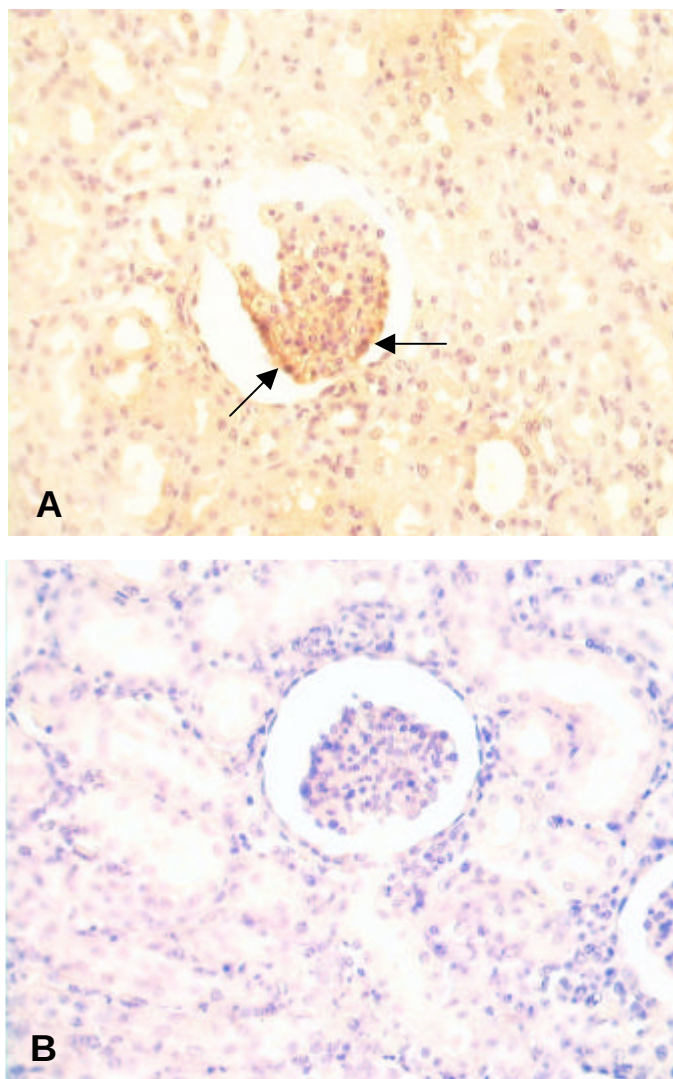


Figura 19 - Teste de PAP para detecção de antígenos de *Babesia bovis* em microcirculação renal. A, reatividade positiva em capilar glomerular de animal inoculado com *B. bovis* (setas), 1000x; B, Ausência de reatividade positiva em rim do bovino negativo, 1000x.

6. DISCUSSÃO

A citoaderência em *Babesia bovis* tem sido estudada usando vários tipos de células, tais como: células endoteliais de capilar cerebral bovino (O'CONNOR *et al.*, 1999) e células endoteliais de aorta bovina (CAETANO, 2001). As células endoteliais utilizadas neste estudo para aplicação em testes de adesão eritrocitária e identificação de moléculas de adesão, durante as varias passagens, sempre mantiveram as características morfológicas descritas por SPANEL-BOROWSKI & FENYVES (1994), isto é, formação de uma monocamada epitelial pavimentosa, com células poligonais. Ainda, segundo VOYTA *et al.* (1984), uma das características importantes das células endoteliais mantidas em cultura é a capacidade de degradar e acumular a lipoproteína acetilada de baixa densidade DIL-Ac-LDL, assim, tendo em conta os resultados apresentados e o anteriormente descrito pode-se afirmar que as células utilizadas na presente pesquisa são do tipo endotelial.

Os resultados dos testes de adesão *in vitro*, usados para determinar a cinética de adesão e a adesão em células endoteliais estimuladas, indicam que a ademsão observada é resultante da interação entre antígenos de *B. bovis* na superfície dos eritrócitos e receptores endoteliais complementares. Apesar das variações na composição de aminoácidos possam alterar a afinidade de ligação com receptores expressos nas células endoteliais, os resultados

obtidos mostram evidências de que os antígenos da BbovUFV1 patogênica apresentam afinidade pelos receptores das células endoteliais de veia umbilical bovina utilizadas nesta pesquisa.

A adesão observada neste trabalho foi só de eritrócitos não parasitados. Resultados semelhantes também foram observados por KILGER (1999) e PATARROYO *et al.* (1999) utilizando o mesmo modelo de adesão de eritrócitos, em células endoteliais de aorta bovina, embora, tenham observado que uma pequena porcentagem de eritrócitos (<10%) estava parasitada. Isto contrasta com os trabalhos de O'CONNOR *et al.* (1999) que, usando células endoteliais de cérebro bovino, observaram que a totalidade dos eritrócitos aderidos estavam parasitados com merozoítos de *B. bovis*.

O fato de a adesão dar-se somente com eritrócitos não parasitados sugere que no plasma de um animal em fase aguda de babesiose são encontradas proteínas liberadas, bem seja pelo parasita ou pela ruptura das hemácias, as quais são ou atuam como exoantígenos. Segundo GOODGER (1973 e 1976) e GOODGER *et al.* (1981), os exoantígenos de *B. bovis* constituem um grupo heterogêneo de proteínas que têm afinidade pela superfície eritrocitária. Muitos deles estão associados em complexos com algumas proteínas de fase aguda da infecção como haptoglobina, hemoglobina e fibrina ou com anticorpos, especialmente IgM. Assim, a adesão de eritrócitos não parasitados que foi observada pode ser resultado de modificação da superfície das hemácias pela adsorção de antígenos de *B. bovis*, os quais se ligariam a receptores específicos presentes na superfície das células endoteliais de veia umbilical bovina.

A adsorção destes antígenos citofílicos foi demonstrada nos trabalhos de CAETANO (2001), por testes de hemaglutinação, nos quais hemácias tanizadas provenientes de bovinos livres de *B. bovis* foram sencibilizadas com soro de animais a partir de 12 dias após a inoculação com BbovUFV1 patogênica, coincidindo com o desenvolvimento de parasitemia. Paralelamente, imunofluorescência indireta em esfregaços de sangue periférico dos animais inoculados mostrou a presença de eritrócitos não parasitados reativos a anticorpos anti-BbovUFV1.

A proteína VESA 1 é o antígeno de *B. bovis* que apresenta a variação mais marcante entre os diversos isolados, como demonstrado por ALLRED *et*

al. (1994). O'CONNOR & ALLRED (2000) também demonstraram que dependendo da isoforma de VESA 1 que se expresse, clones de *B. bovis* possuem ou não a capacidade de induzir a adesão de eritrócitos parasitados em células endoteliais de cérebro bovino. De maneira similar, a molécula de adesão PfEMP1 do *P. falciparum* apresenta variação na sua porção extracitoplasmática, naqueles domínios responsáveis pela ligação com os receptores endoteliais, afetando a capacidade de indução de adesão pelo *P. falciparum*, fato demonstrado por SU *et al.* (1995). Assim, é possível que a amostra BbovUFV1 7^a passagem patogênica induza à expressão, em eritrócitos parasitados, de uma isoforma de VESA 1 não aderente.

Um outro mecanismo que pode ter contribuído para a adesão é a ativação do sistema de coagulação por esterases liberadas pela *B. bovis* durante a fase aguda da doença. Segundo WRIGHT *et al.* (1988 e 1989), este fato facilita a adesão por desencadear a produção de monômeros solúveis de fibrina que têm afinidade pela superfície das hemácias. A fibrina pode-se ligar à trombospondina na superfície de células endoteliais e, portanto, promover a adesão eritrocitária.

Existem poucas evidências experimentais que confirmem esta hipótese. Entretanto, PARRODI *et al.* (1989) observaram que eritrócitos parasitados e não parasitados de animais inoculados com uma amostra patogênica de *B. bovis* aderiam em superfícies plásticas tratadas com trombospondina, mas não definiram qual a molécula da superfície eritrocitária atuava como ligante. Por outro lado, em um estudo de microscopia eletrônica sobre seqüestro de eritrócitos em capilares cerebrais de animais inoculados com amostras patogênicas de *B. bovis*, WRIGHT (1972) descreveu a formação de filamentos de fibrina que ligavam eritrócitos parasitados e não parasitados entre si e ao endotélio.

Em experimentos seqüenciais, ALLRED *et al.* (1993 e 1994), O'CONNOR *et al.* (1997) e O'CONNOR & ALLRED (2000) demonstraram que VESA 1 é sintetizada pelos merozoítos de *B. bovis* e inserida nas projeções espiculares da membrana do eritrócito parasitado. Apesar de não esclarecerem os mecanismos de transporte e inserção da mesma na bicamada lipídica, os pesquisadores descartaram a possibilidade desta proteína ser secretada e adsorvida inespecificamente na superfície de células. Em primeiro lugar, testes

de imunofluorescência com eritrócitos de cultivo de *B. bovis*, onde foram empregados anticorpos específicos para VESA 1 demonstraram a presença da molécula exclusivamente nas células parasitadas, demonstrando que VESA 1 está inserida na bicamada lipídica ou ancorada fortemente em ligações com fosfatidilinositol.

Concordando com o anteriormente exposto, e resumindo, a adesão encontrada neste trabalho pode ser devida a antígenos citofílicos localizadas em hemácias não parasitadas de animais infectados com *B. bovis*.

Na cinética de adesão dos eritrócitos provenientes dos animais infectados verificou-se variação nas médias de hemácias aderidas para cada animal. Isto pode ser explicado já que os bovinos utilizados neste experimento não eram isogênicos, o que leva a diferentes padrões da resposta imune que medeia o processo inflamatório.

O pico de adesão dos eritrócitos, coletados no 8º dia pós-inoculação, coincidiu com o pico de parasitemia que foi mensurado por FIGUEIREDO (2002) usando a técnica de hidroetidina. Uma explicação para esta maior adesão seria que o aumento da parasitemia levou a um aumento dos exoantígenos citofílicos liberados pela *B. bovis*, os quais se ligariam à superfície das hemácias levando ao aumento da sua adesão nas células endoteliais.

A queda nos níveis de adesão que foi observada a partir do dia 8 pós-inoculação, provavelmente tenha sido devido ao efeito inibidor da replicação parasitaria provocada pelo óxido nítrico (ON), já que a resolução da infecção aguda depende dos produtos derivados dos macrófagos ativados, como citocinas inflamatórias e ON, os quais são induzidos pela exposição a merozoítos ou à membrana de merozoítos de *B. bovis*, mas esta indução é dependente de IFN- γ e de TNF- α (STICH *et al.*, 1998; GOFF *et al.*, 2002). Além disto, os macrófagos ativados por parasitos inibem o crescimento deste durante a infecção aguda e contribuem para o desenvolvimento de uma resposta tipo Th1 (SHODA *et al.*, 2000). Por outro lado, análises *in vivo* das citocinas liberadas em resposta à *B. bovis* revelaram a importância de IL-12, IFN- γ e ON para a proteção contra esta doença, sugerindo que a imunidade protetora contra este agente está associada com o desenvolvimento de uma resposta tipo 1, envolvendo ON, a qual pode ser modulada por IL-4 ou IL-10 (GOFF *et*

al., 2002). Pesquisas realizadas por COURT *et al.* (2001) comprovaram que durante o pico de parasitemia e eliminação do parasito, em exposições primárias à *B. bovis*, a atividade fagocítica dos neutrófilos e a explosão oxidativa dos monócitos estão aumentadas. Uma outra explicação para a queda da adesão é que em animais não esplenectomizados esta pressão é exercida pelo sistema retículo-endotelial esplênico, que fagocita e elimina o agente ou as células parasitadas pelo mesmo (RISTIC & KAKOMA, 1988).

A adesão de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos e alguns monócitos que foi observada nas células estimuladas ou não, parece indicar que as células endoteliais utilizadas nesta pesquisa poderiam estar expressando constitutivamente alguma molécula de adesão. Acredita-se que essa adesão possa se dever a moléculas como a E-selectina, a qual é a primeira a ser induzida sobre células endoteliais após 1 a 2 horas de estímulo com diferentes tipos de imunomoduladores, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS) e TNF α (ABBAS, 1998; VAN KAMPEN & MALLARD, 2001), mediando assim a ligação *in vitro* de polimorfonucleares (PMNs) e algumas subpopulações de linfócitos (GRABER *et al.*, 1990., SHIMIZU *et al.*, 1991).

Já nos teste de adesão feitos neste estudo com eritrócitos provenientes de animais inoculados com *B. bovis* em células endoteliais estimuladas, houve maior adesão nos tratamentos com plasma e com sobrenadante de PBMC comparada com a adesão apresentada nas células sem estímulo. A maior adesão dos eritrócitos, provenientes dos animais infectados, indica que no plasma dos animais infectados com *B. bovis* há fatores que além de mediar a adesão de eritrócitos nas células endoteliais também as estimulam a incrementar a expressão de moléculas de adesão.

Não há estudos *in vivo* sobre as interleucinas liberadas na fase aguda da babesiose, mas pesquisas feitas em malária têm relatado os níveis de citocinas *in vivo* e *in vitro* durante e depois da infecção com *P. falciparum* em Gabon, sugerindo que no plasma, os níveis de IL-6 chegam ao pico máximo na fase aguda da doença e, a liberação de esta citocina *in vitro*, é elevada durante e depois da infecção. De fato se conclui uma implicação de citocinas tipo 2 e IFN γ , com particularmente altos níveis de IL-6 (AUBOUY *et al.*, 2002). Em trabalhos realizados por SHODA *et al.* (2000), constatou-se que monócitos derivados de macrófagos ativados com *B. bovis* expressavam altos níveis de

citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-12 e TNF- α . EAST *et al.* (1997) relataram altos níveis de IFN- γ e TNF- α , produzidas em culturas de células mononucleares de sangue periférico de bovinos vacinados em pico de parasitemia. Tudo isto indica que a infecção com a amostra patogênica de *B. bovis* (BbovUFV 7^a passagem), induz grande liberação de citocinas como IFN- γ e TNF- α que estimulam e aumentam a expressão de moléculas de adesão nos endotélios vasculares gerando adesão de eritrócitos no lúmen dos vasos, razão pela qual houve adesão dos eritrócitos provenientes dos animais infectados.

Também foi observado neste experimento que TNF- α , IL-12 e INF- γ presentes no sobrenadante de cultura de PBMC, usado para o estímulo das células endoteliais, incrementaram a expressão de moléculas de adesão em BUVECs. A semelhança do que foi constatado neste trabalho, vários estudos têm demonstrado o importante papel das citocinas como TNF- α e INF- γ na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, dentre eles, os realizados por BEVILACQUA (1993), que sugere que a expressão de ICAM-1 e VCAM pode estar regulada por muitos tipos de citocinas, incluindo TNF- α e outros imunomoduladores como os LPS.

Em outros animais como ovinos as UVECs apresentaram uma cinética de expressão de VCAM similar à da VCAM humana depois de 6 a 12 horas de estímulo com TNF alfa recombinante ovina (GROOBY *et al.*, 1997).

Estudos feitos por VAN KAMPEN & MALLARD *et al.* (2001) demonstraram que a estimulação de BAECs com fator de necrose tumoral- α recombinante (rbTNF- α) resultou na expressão de VCAM em menos de 5% da cultura, após uma hora pós-estimulação, seguido de um significativo incremento após 3 horas, o qual foi mantido até 48 horas quando então a proporção de células VCAM positivas decresceram significativamente. A estimulação com LPS de *Escherichia coli* induz um significativo incremento na expressão de ICAM-1 mRNA entre 1 e 12 horas após o estímulo, depois do que diminuem rapidamente até chegar a níveis basais. Os pesquisadores concluíram que diferentes estímulos produzem cinética de expressão similar de VCAM-1 em BAECs.

Neste trabalho o estímulo das BUVECs foi de duas horas, usando plasma ou sobrenadante de PBMC. Isto porque de acordo com os

pesquisadores, citados no parágrafo anterior, a cinética de expressão das diferentes moléculas varia. Ademais, experimentos prévios com o modelo aqui apresentado, determinaram que o tempo de estímulo era suficiente para expressão das moléculas.

Corroborando o antes exposto, quando as BUVECs foram estimuladas, durante 2 horas com plasma de animal infectado e PBMC contendo citocinas, houve uma expressão muito mais intensa de ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina quando comparada com o tratamento controle. Estes resultados são corroborados pelo trabalho de RAAB *et al.* (2002), no qual claramente é demonstrado que a combinação de citocinas como TNF- α , IL-1 ou IFN- γ adicionadas ao meio de incubação, podem modular de forma sinérgica ou antagônica, a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, CD-34, E e P-selectina em HUVECs.

O plasma utilizado neste experimento foi coletado de animais em fase aguda de babesiose, possivelmente contendo altos níveis de TNF- α estimulando a expressão de varias moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, igualmente, o sobrenadante de cultura de PBMC continha níveis quantificados desta citocina. No que tange ao plasma é necessário lembrar de que macrófagos derivados de monócitos ativados por *B. bovis*, expressam níveis elevados de citocinas inflamatórias como IL-12 e TNF- α , embora a indução de citocinas inflamatórias na babesiose, não tem sido bem estudada (SHODA *et al.*, 2000).

O porque usar monoclonais humanos neste trabalho tem como base as pesquisas de VAM KAMPER & MALLARD (2001) onde foi demonstrado que o anticorpo monoclonal anti VCAM-1 humano tem reatividade cruzada com VCAM-1 expressa em células endoteliais de aorta bovina (BAECs), mostrando uma cinética de expressão similar à humana. Os resultados do presente trabalho também mostram claramente que os anticorpos monoclonais humanos utilizados reconhecem moléculas como ICAM-1, PECAM-1 e trombospondina bovinas, sendo que esta última por informações do fabricante também reconhece trombospondina de origem ovina.

As moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM apresentaram uma expressão intensa em BUVECs quando estimuladas com plasma e sobrenadante de

PBMC, coincidindo com os resultados de trabalhos realizados por BEVILACQUA (1993), que indicaram que a expressão destas moléculas pode estar regulada por muitos tipos de citocinas incluindo o TNF- α e outros imunomoduladores. Outros estudos *in vitro* também revelaram que a expressão de ICAM-1 foi induzida com IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β e IFN- γ sobre múltiplos tipos de células em suínos, incluindo células hematopoiéticas e fibroblastos (ROTHLEIN *et al.*, 1991). VCAM é outra molécula que também tem sido induzida *in vitro* com TNF- α e IL-1 α (GROOBY *et al.*, 1997). Outros estudos em suínos mostram que os níveis de expressão *in vitro* de VCAM-1 foram altos após 9 horas de estímulo com LPS, TNF- α , e IL-1 α , ficando expressa até por 48 horas, e a expressão de VCAM-1 em HUVECs, estimuladas com LPS ou TNF- α foi prolongada só em células estimuladas com TNF- α , porém há diferenças na cinética de expressão de VCAM-1 humano e suíno (TSANG *et al.*, 1994)

Igualmente, PECAM-1 teve expressão intensa nas células endoteliais estimuladas com plasma procedente de animais infectados, embora apresentou uma expressão medianamente intensa quando as células foram estimuladas com sobrenadante de PBMC. Já as células endoteliais do tratamento controle mostraram uma expressão pouco intensa. Estas observações concordam com os resultados obtidos por MÜLLER *et al.* (2002), que evidenciaram expressão homogênea de PECAM-1 em culturas estimuladas e não estimuladas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e de células endoteliais de microvasculatura pulmonar humana (HPMEC). A presença pouco intensa nas HUVECs, pode ser explicada porque o PECAM-1 é constituinte das junções intercelulares endoteliais. A expressão intensa causada pelo plasma, pode ser devida à quantidade de citocinas pró e inflamatórias presentes e que as interleucinas no sobrenadante de PBMC deveriam atuar em sinergismo com outras moléculas para obter uma expressão maior.

Evidentemente, a heterogeneidade na resposta da célula endotelial varia com o tipo de citocina, a concentração e o tempo de exposição, um fator não muito bem reconhecido nem documentado (MANTOVANI *et al.*, 1997; PETZELBAUER *et al.*, 1993). Assim, a expressão de E-selectina em HUVECs

após a estimulação durante 2 horas com plasma e sobrenadante foi muito maior que a expressão das outras moléculas de adesão estudadas. Isto pode ser devido ao fato que a E-selectina é a primeira molécula de adesão a ser induzida após 1 a 2 horas de estímulo com TNF (ABBAS, 1998), coincidindo com o tempo de estímulo usado neste experimento. As células endoteliais não estimuladas também expressaram E-selectina, mas em baixa intensidade. Pesquisas feitas por BISCHOFF & BRASEL (1995) relataram que o mRNA da E-selectina pode ser sobre-regulado por TNF- α em monocamadas confluentes de células endoteliais bovinas.

A expressão intensa da trombospondina na superfície das células estimuladas com plasma e a expressão pouco intensa quando estimuladas com sobrenadante de PBMC, não concorda com os achados de LOGANADANE *et al.* (1997), que estudaram a expressão desta molécula em culturas HUBEC estimuladas. Porém, é importante ter em conta que neste trabalho não estudamos a correlação da concentração da matriz sub-endotelial da molécula e a densidade da cultura, fatos que influenciam a secreção de trombospondina por células endoteliais *in vitro*, conforme postulado pelo mesmo autor.

A expressão das moléculas de adesão *in vivo* não sempre foi igual à expressão *in vitro*, porém deve ser levado em consideração que os modelos *in vitro* utilizando culturas de células em monocamada podem ter algumas limitações, principalmente aquelas referentes à ausência de fatores fisiológicos essenciais do micro-ambiente tecidual e à própria estimulação exercida pelas células vizinhas.

No experimento foi observado um aumento na expressão de ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e trombospondina em cérebro, pulmão e rim nos bovinos infectados com *B. bovis*. Isso pode acontecer devido à ação das citocinas que são liberadas na fase aguda da babesiose que podem estimular a célula endotelial a expressar grande quantidade de moléculas de adesão. Os resultados aqui mostrados evidenciam uma possível participação destas moléculas de adesão no seqüestro de eritrócitos nos capilares, estes achados coincidem com os obtidos por GARETH *et al.* (1994) em tecidos de pacientes, que morreram de malária por *P. falciparum*, onde o seqüestro é mediado por interação entre ligante e receptor específico do eritrócito e da superfície da

célula endotelial, respectivamente. Entre os receptores identificados *in situ* estão CD36, CD-31, ICAM-1, E-Selectina, trombospondina e VCAM-1.

No presente trabalho foi observada uma expressão muito intensa de ICAM-1 e E-selectina no endotélio dos capilares cerebrais dos animais inoculados com *B. bovis*, comparada com a apresentada no endotélio cerebral dos animais controle. Também no rim dos animais que morreram de babesiose, a E-selectina teve uma expressão medianamente intensa, e no rim controle, não houve expressão. Todos estes resultados concordam com os obtidos em trabalhos de GARETH *et al.* (1994) onde estudos de imunohistoquímica demonstraram que a expressão destas duas moléculas era mais alta no endotélio cerebral e renal de pacientes que morreram de malária do que em indivíduos com outros tipos de patologia e que a expressão estava fortemente associada ao seqüestro de hemácias parasitadas naqueles órgãos. Assim, de forma geral, tendo em conta nossos resultados o mesmo pode acontecer com *B. bovis* onde, concordando com GARETH *et al.* (1994), os níveis de expressão de receptores endoteliais para citoaderência em *P. falciparum* (ICAM-1, VCAM, PECAM-1 e TSP) são variáveis porque muitos são dependentes da ativação induzida por citocinas.

A E-selectina e a trombospondina foram as moléculas de adesão que mais se expressaram em todos os tecidos pesquisados, sendo também observadas em alguns dos tecidos controle, provavelmente pelo fato de que a E-selectina esteja envolvida no rolamento de leucócitos e a trombospondina se expresse constitutivamente. Outros trabalhos sugerem que a E-selectina pode ter um papel muito importante no rolamento e seqüestro de eritrócitos infectados na patogênese da malária produzida pelo *P. falciparum* demonstrando que isolados de PfEMP1 podem funcionar como ligantes para P-selectina (SENEZUK *et al.*, 2001). Igualmente, os antígenos expressos na superfície das hemácias infectadas por *B. bovis* aderem a superfícies tratadas com trombospondina, laminina (PARRODI *et al.*, 1989). Então, é possível que no caso da babesiose produzida pela amostra de *B. bovis* patogênica (BbovUFV1 7^a passagem), também haja envolvimento destas duas moléculas de adesão na patogênese da doença.

O aumento da expressão de ICAM-1, VCAM, PECAM-1 E-selectina e trombospondina em cérebro, pulmão e rim dos bovinos que morreram após a

infecção com *B. bovis* sugere que as de citocinas como TNF- α , as quais são liberadas na fase aguda da babesiose e estimulam as células endoteliais a expressar grande quantidade de moléculas de adesão, a semelhança do que acontece nos casos de malária aguda em que os níveis de TNF- α estão elevados, estando também correlacionados com a severidade da doença (KWIATKOWSKI *et al.*, 1990).

Aumento na expressão de moléculas de adesão nos endotélios cerebrais tem sido observado também em outros modelos animais como no caso da encefalomielite autoimune experimental, vírus da imunodeficiência em símios e em doenças humanas produzidas por lesões necróticas e inflamatórias. Todas estas patologias têm como mecanismo patogênico básico a liberação de citocinas (TURNER *et al.*, 1994)

A expressão de ICAM-1, na babesioses bovina, principalmente localizada nos glomérulos renais e nos capilares intertubulares é um fato que ajuda a explicar a fisiopatologia da infecção. A presença desta molécula, por outros estímulos como LPS já tinha sido relatada por NITTA *et al.* (1995), que evidenciaram a expressão de ICAM-1 na superfície de células de glomérulo renal bovino.

Os resultados da expressão de PECAM-1 nas células endoteliais do cérebro e do pulmão são similares aos resultados obtidos por MÜLLER *et al.* (2002), em biópsias pulmonares de pacientes com patologias pulmonares ou em lobectomia de pacientes com carcinoma pulmonar, que verificaram reação positiva contra PECAM-1 homogeneamente expressada em todos os vasos pulmonares independentemente do calibre.

O seqüestro de eritrócitos não parasitados na microcirculação sempre foi descrito como consequência da estase sangüínea, da agregação dos eritrócitos não parasitados em torno dos eritrócitos parasitados e da ativação da coagulação. Seria, na verdade, um “empacotamento” dos eritrócitos, sendo impedidos de fluir pelos vasos. Trabalhos anteriormente realizados por KILGER (1999) e PATARROYO *et al.* (1999) mostram que pode haver mecanismos específicos de ligação dos eritrócitos não parasitados com a célula endotelial, via antígenos adsorvidos pelos eritrócitos. Isto explica os resultados da imunohistoquímica para detecção de antígenos de *B. bovis*, os quais mostraram reação positiva nos eritrócitos aderidos ao lúmen dos vasos de

tecidos como cérebro e pulmão e também presença de antígenos nos capilares glomerulares no rim dos animais que morreram de babesiose.

A fisiopatologia da *B. bovis* inclui hiperemia passiva, deposição de pigmentos e seqüestro de eritrócitos infectados nas vênulas pós-capilares. Como na malária produzida pelo *P. falciparum*, um dos fatos mais importantes na babesiose é o seqüestro de eritrócitos parasitados e não parasitados na microcirculação e acumulação em órgãos vitais.

A retenção de eritrócitos não parasitados na microcirculação facilita a proliferação da *B. bovis* nos tecidos e o escape do parasita da resposta imunológica do hospedeiro. Com os eritrócitos justapostos, os merozoítos podem se transferir diretamente de uma hemácia a outra, escapando da fagocitose ou opsonização por anticorpos. Desenvolvimento de mecanismos que aumentem a retenção de hemácias favorecem a sobrevivência do parasita. Neste contexto, a *B. bovis* utiliza a adesão de eritrócitos não parasitados como um mecanismo para escapar da resposta imune do hospedeiro.

Em pesquisas realizadas em malária cerebral produzida pelo *P. falciparum*, encontraram-se evidências de que na fisiopatologia desta doença citocinas como o TNF, em especial, junto com as alterações na adesão e função das células endoteliais têm um papel importante no seqüestro de eritrócitos nos capilares do cérebro e um conseqüente dano cerebral (MANTOVANI *et al.*, 1997). A semelhança deste mecanismo, na babesiose produzida pela *B. bovis*, caso o cérebro esteja envolvido, o dano causado pelo bloqueio dos capilares pode levar a uma condição fatal conhecida como babesiose cerebral (DE SOUZA & RILEY, 2002).

7. CONCLUSÕES

- Células endoteliais de veia umbilical bovina (BUVECs) constituem um bom modelo para o estudo da fisiopatologia da babesiose produzida pela *B. bovis*.
- Eritrócitos provenientes de animais inoculados com a amostra patogênica de *Babesia bovis* BbovUFV1 7^a passagem se aderem em BUVECs *in vitro*.
- A adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com amostra patogênica de *B. bovis* em BUVECs é maior quando estimuladas com plasma de animais inoculados e com sobrenadante de PBMC os quais contêm interleucinas como TNF- α e IFN- γ capazes de induzir expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais *in vitro*.
- O aumento da adesão de eritrócitos provenientes de animais inoculados com *B. bovis* em BUVECs estimuladas pode ser devido à maior expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM, PECAM-1, TSP, E-selectina e trombospondina na superfície das células endoteliais.
- As moléculas de adesão ICAM-1, VCAM, PECAM-1, TSP, E-selectina e trombospondina estão claramente envolvidas na fisiopatologia da babesia visceral produzida pela *B. bovis*.

7.1 Perspectivas futuras

Pesquisar outras moléculas de adesão como a CD36 e o Sulfato A de Condroitina que possam estar envolvidas na fisiopatologia da *B. bovis* e que tenham uma participação comprovada na citoaderência em patologias similares como no caso da malária.

Podem-se empregar testes de adesão realizando bloqueio das moléculas de adesão usando anticorpos monoclonais das moléculas como ICAM-1, VCAM, PECAM-1, E-selectina e Trombospondina. O bloqueio na adesão dos eritrócitos por um anticorpo específico contra uma molécula de adesão reafirmaria a participação direta desta molécula na adesão dos eritrócitos infectados com *B. bovis*.

A partir da identificação das moléculas de adesão pode-se dar início a uma nova etapa do estudo. Então, poder-se-á testar o potencial destas como terapêuticos capazes de induzir a produção de anticorpos bloqueadores, os quais impediriam o processo de adesão *in vivo*. Uma vacina com estas características seria uma ferramenta importante para prevenção do desenvolvimento da babesiose aguda e da mortalidade por ela causada.

As moléculas de adesão em bovinos não têm sido profundamente estudadas, razão pela qual ainda há muitas questões sobre expressão e regulação destas moléculas no endotélio vascular e circulação de leucócitos. A caracterização das moléculas de adesão na superfície das BUVECs e a sua resposta frente à citocinas, poderia permitir um melhor entendimento dos receptores que mediam a adesão de eritrócitos parasitados e não parasitados por *B. bovis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHMAN, A.H., POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 3 Ed. Revinter. Rio de Janeiro, 469 p.1998.
- AFONSO, L.C.C., SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v.61, n.7, p. 2952-2959, 1993.
- AIKAWA, M., RABBEGE, J., UNI, S., RISTIC, M., MILLER, L.H. Structural alterations of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 1, p. 45-49, 1985.
- AIKAWA, M. Human cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.39, n.1, p.3-10, 1988.
- AIKAWA, M., ISEKI, M., BARNWELL, J.W., TAYLOR, D., OO, M.M., HOWARD, R.J., The pathology of human cerebral malária. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.43, n.2, p.30-37, 1990.
- AIKAWA, M., PONGPONRATN, E., TEGOSHI, T., NAKAMURA, K., NAGATAKE, T., COCHRANE, A., OZAKI, L.S. A study on the pathogenesis of human cerebral malária and cerebral babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, s.III, p.297-301, 1992.
- ALLRED, D.R., HINES, S.A., AHRENS, K.P. Isolate-specific parasite antigens of the *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.60, p.121-132, 1993.

- ALLRED, D.R., CINQUE, R.M., LANE, T.J., AHRENS, K.P. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis*-infected erythrocytes. **Infect. Immun.**, v.62, n.1, p.91-98, 1994.
- ALLRED, D.R. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the Parasite World. **Parasitol. Today**, v.11, n.3, p.100-105, 1995.
- ALLRED, D.R. Antigenic variation in *Babesia bovis*: how similar is to that in *Plasmodium falciparum*? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.92, p.461-472, 1998.
- ALLRED, D.R., CARLTON, J.M-R., SATCHER, R.L., LONG, J.A., BROWN, W.C., PATTERSON, P.E., O'CONNOR, R.M., STROUP, S.E., The ves multigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. **Mol. Cell**, v.5, p.153-162, 2000.
- AUBOUY, A., DELORON, P., MIGOT-NABIAS, F. Plasma and in vitro levels of cytokines during and after a *Plasmodium falciparum* malária attack in Gabon. **Acta Tropical.**, *In Press*. 2002.
- BARRIER, B., SHARPE-TIMMS, K. Expression the soluble adhesion molecules in sera of woman with stagy III and IV the endometriosis. **J. Soc. Ginecol. Investig.**, v.9, p.98-101, 2002.
- BARUCH, D.I., MA, X.C., SINGH, H.B., BI, X., PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood**, v.90, n.9, p.3766-3775, 1997.
- BATISTA, C. **Avaliação da resposta imune de bovinos, inoculados com amostra atenuada de *Babesia bovis* (Starcovici, 1893)**. Viçosa: UFV, 2001. 92p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- BENEKLI, M., GULLU, I., TEKUZMAN, G., SAVAS, M., HAYRAN, M., HASCELIK, G., FIRAT, D. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin levels in gastric cancer. **Br. J. Cancer**, v. 78, p.267-271, 1998.
- BEVILACQUA, M. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Ann. Rev. Immunol.**, v.11, p.767-804, 1993.
- BIGGS, B., ANDERS, R.F., DILLON, H.E., DAVERN, K.M., MARTIN, M., PETERSEN, C., BROWN, G.V. Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variants of *Plasmodium falciparum*. **J. Immunol.**, v.149, n.6, p.2047-2054, 1992.

- BISCHOFF, J., BRASEL, C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor- α . **Biomed. Biofis. Res. Communic.**, v.210, n.1, p.174-180, 1995.
- 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., PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. **Parasitol Today**, v.15, n.7, p.275-280, 1999.
- BUSHELL, G.R., GARRONE, B., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., DALRYMPLE, B.P. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **Int. J. Parasitol.**, v.21, n.5, p.609-611, 1991.
- CAETANO, B. C., **Estudo 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.
- CARLOS, T.M., HARLAN, J.M. Leucocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v.84, n.7, p.2068-2101, 1994.
- CLARK, I.A., SCHOFIELD, L. Pathogenesis of malária. **Parasitol. Today**, v. 16, n.10, p.451-454, 2000.
- COOKE, B.M., BERENDT, A.R., CRAIG, A.G., MacGREGOR, J., NEWBOLD, C.I., NASH, G.B. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. **Brit. J. Haematol.**, v.87, p.162-167, 1994.
- COURT, R.A., JACKSON, L.A., LEE, RP. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 19, p. 2937, 2001.
- CRAIG, A., FERNANDEZ-REYES, D., MESRI, M., McDOWALL, A., ALDERI, D., HOGG, N., NEWBOLD, C. A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1 Kilifi). **Hum. Mol. Genet.**, v.9, p.525-530, 2000.
- DE SOUZA, B., RILEY, M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microb. Infect.**, v.4, p.291-300, 2002.
- DIETRICH, J. The adhesion molecule ICAM-1 and its relation with the blood-brain barrier. **J. of Neuroimmunol.**, v.128, p.58-68, 2002.
- EAST, I.J., ZAKRZEWSKI, H., GALE, K.R., LEATCH, G., DIMMOCK, C.M., THOMAS, M.B., WALTISBUHL, D.J. Vaccination against *Babesia bovis*:

T cell from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. **Int. J. Parasitol.**, v.27, p.1537-1545, 1997.

FIGUEIREDO, J.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 parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

FLORIN-CHRISTENSEN, J., SUAREZ, C.E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., HINES, S.A., McELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.106, p.147-156, 2000.

FRESHNEY, R. Culture of specific cell types in: **Culture of animal cells. A manual of basic technique.** (3 ed). Wiley-Liss. 1994.

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

FUSAI, T., PARZY, D., SPILLMANN, D., EUSTACCHIO, F., POUVELLE, B., LÉPOLARD, C., SCHERF, A., GYSIN, J. Characterisation of the chondroitin sulphate of Saimiri brain microvascular endothelial cell involved in *Plasmodium falciparum* cytoadhesion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.108, p.25-37, 2000

GARETH, D., TURNER, H., MORRISON, H., DAVIS, T., LOOAREESTUWAN, S., BULEY, I., GATE, K., NEWBOLD, C., PUKRITAYAKAMEE, S., NAGACHINTA, B., WHITE, N.J., BERENDT, A. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malária. Evidence for widespread endothelial activation and potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **Am. J. Pathol.**, v.145, p.1057, 1994.

GAY, F., ROBERT, C., POUVELLE, B., PEYROL, S., SCHERF, A., GYSIN, J. Isolation and characterization of brain micro vascular endothelial cells from *Saimiri* monkeys. An in vitro model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Immunol. Met.**, v.184, p.15-28, 1995.

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

GOFF, W.L., JOHNSON, W.C., PARISH, S.M., BARRINTON, G.M., TUO, W., VALDEZ, R.A. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- λ and inducible nitric oxide synthetase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunol.**, v.23, p.453-461, 2001

- GOODGER, B.V. *Babesia argentina*: intraerythrocytic location of babesial antigen extracted from parasite suspensions. **Int. J. Parasitol.**, v.3, p.387-391, 1973.
- GOODGER, B.V. *Babesia argentina*: studies on the nature of an antigen associated with infection. **Int. J. Parasitol.**, v.6, p.213-216, 1976.
- GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., MAHONEY, D.F. Initial characterization of cryoprecipitates in cattle recovering from acute *Babesia bovis (argentina)* infection. **Ajebak**, v.59, p.521-529, 1981.
- GOODGER, B.V., COMMINS, M.A., WRIGHT, I.G., WALTISBUHL, D.J., MIRRE, G.B., *Babesia bovis*: succesful homologous vaccination using a heparin-biding fraction of infected erythrocytes. **Int. J. Parasitol.**, v.17, p.935, 1987.
- GRABER, N., COPAL, T., WILSON, D., BEALL, L., POLTE, T., NEWMAN, W. T-cell bind to cytokine-activated endothelial cell via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule. **Int. J. Immunol.**, v.145, p.819-830, 1990.
- GROOBY, W.L., KRISHNAN, R., RUSS, G.R. Characterization of ovine umbilical vein endothelial cells and their expression of cell adhesion molecules: comparative study with human endothelial cells. **Immunol. Cell. Biol.**, v.75, p.21-28, 1997.
- HANDUNNETTI, S.M., SCHRAVENDIJK, M.R., HASLER, T., BARNWELL, J.W., GREENWALT, D.E., HOWARD, R.J. Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Blood**, v.80, n.8, p.2097-2104, 1992.
- HASLER, T., ALBRECHT, G.R., van SCHRAVENDIJK, M.R. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.48, p.332-347, 1993.
- HORN, S.C., ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Vet.**, v.4, n.1, p.12-35, 1985.
- HOWARD, R.J., BARNWELL, J.W., ROCK, E.P. Tow approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.27, p.207-224, 1988.
- IGARASHI, I., AIKAWA, M., KREIER, J.P. Host cell-parasite interactions in babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 53-70.

- JACK, R.M., WARD, P.A. Mechanisms of entry of *Plasmodia* and *Babesia* into red cells. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p.445-458.
- JOHNSON, J.K., SWERLICK, R.A., GRADY, K.K. et al. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to microvascular endothelium is regulatable by cytokines and phorbol ester. **J. Infect. Dis.**, v.167, p.698-703, 1993.
- JUDE, E., DOUGLAS, J., ANDERSON, S., YOUNG, M., BOULTON, A. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P and E-selectine in the prediction of cardiovascular disease in the diabetes mellitus. **E. J. Int. Med.**, v.13, p.185- 189, 2002.
- JUTILA, M.A. $\gamma\delta$ T cell/endothelial cell interaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.54, p.105-110, 1996.
- KAYAL, S., JAIS, J., AGUINI, N., CHAUDIER, J., LAUBROUSSE, J. Elevated circulating E-selectine, intercellular adhesion molecule-1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.157, p.776-784, 1998.
- KIKUCHI, M., LOOAREESUWAN, S., UBALEE, R., TASANOR, O., SUZULI, F., WATTANAGOON, Y., NA-BANGCHANG, K., KIMURA, A., AIKAWA, M., HIRAYAMA, K. Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malária in Thais. **Parasitol. Int.**, v.50, p.235-239, 2001.
- KILGER, G.U. Abschlussbericht. Postdoktoranden – Stipendium der Deutschen. **Forschungsge-meinschaft**. 1999.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-22.
- KWIATKOWSKI, D., HILL, V., SAMBOU, I., TWUMASI, P., CASTRACANE, J., MANOGUE, K.R., CERAMI, A., BREWSTER, D.R., GREENWOOD, B.M. TNF concentration in fatal cerebral, nonfatal cerebral and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malária. **Lancet**, n.336, p.1201-1204, 1990.
- LAHAV, J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1182, p.1-14, 1993.
- LOBB, R., HESSION, C., OSBORN, L. Vascular Cell Adhesion Molecule -1 In: **Cellular and molecular mechanisms of inflammation**. New York: Academic Press, 1991. 191p.
- LOGANADANE, L.D., BERGE, N., LEGRAND, C., FAUVEL-LAFAYE, F. Endothelial cell proliferation regulated by cytokines modulates

- trombospondin-1 secretion into the subendothelium. **Cytokines affect cell growth and TSP secretion**. Academic Press, 1997. 740p
- MACPHERSON, G.G., WARREL, M.J., WHITE, N.J., LOOAREESUAN, S., WARREL, D.A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. **Am. J. Pathol.**, v.119, p.385-401, 1985.
- MAHONEY, D.F. Babesia of domestic animals. In: KREIER, J.P. (ed.). **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1977. p. 1-52.
- 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.
- MANTOVANI, A. BUSSOLINO, F., INTRONA, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. **Immunol. Today**, v.18, n.5, p.231-240, 1997.
- MARSH, K., OTOO, L., HAYES, R.J., CARSON, D.C., GREENWOOD, B.M. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.83, p.293-303, 1989.
- MASON, M., DAVIES, G., JIANG, W. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. **Critical reviews in oncology/Hematology**. v.41, p.11-28, 2002.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stage. **Adv. Parasitol.**, v.23, p.37-103, 1984.
- MUANZA, K., GAY, F., BEHR, C., SCHERF, A. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence. **Res. Immunol.** v147, p.149-163, 1996.
- MÜLLER, A., HERMANN, M., SKRYNSKI, C., NESSLINGER, M., MÜLLER, K., KHKPATRICK, J. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. **Exp. Mol. Pathol.**, v.72, p.221-229, 2002
- MURAKAMI, S., MORIOKA, T., NAKAGAWA, Y., SUZUKI, Y., ARAKAWA, M., TAKASHI, O. expression of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cell in response to cytokines: comparison to human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. **Microvas. Res.**, v.62, p.383-391, 2001.
- MURPHY, R., FOLEY, J., MULVIHILL, N., CREAN, P., WALSH, M. Endothelial inflammation and thrombolysis resistance in acute myocardial infarction. **Int. Jour. Cardiology**, v.83, p.227-231, 2002.

- NAITO, Y., YOSHICAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33 n.3, p.323-336, 2002.
- NAITZA, S., SPANO, F., ROBSON, K.J., CRISANTI, A. The trombospondin-related protein family of apicomplexam parasites: the gears of the cell invasion machinery. **Parasitol. Today**, v.14, n.12, p.479-484, 1998.
- NAKAMURA, K.I., MOREHEAD, K., HASLER, T. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes receptor(s) for CD36 and thrombospondin are restricted to knobs on the erythrocyte surface. **J. Histochem. Cytochem.**, v.40, p.1419-1422, 1992.
- NEWBOLD, C., CRAIG, A., KYES, S., ROWE, A., FERNANDEZ-REYES, D., FAGAN, T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.927-93, 1999.
- NITTA, K., YMURA, W., UCHIDA, K., MIWA, M., HORITA, S., TSUTSUI, T., KAWASHIMA, A., NIHEI, H. Expression of intercellular adhesion molecule I on cultured glomerular endothelial cell by pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide. **Jpn. J. Nephrol.**, v.37, p.100-104, 1995.
- OCKENHOUSE, C.F., TEGOSHI, T., MAENO, Y., BENJAMIN, C., HO, M., KAN, K.E., THWAY, Y., WIN, K., AIKAWA, M., LOBB, R.R. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leucocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. **J. Exp. Med.**, v.176, p.1183-1189, 1992.
- O'CONNOR, R.M., LANE, T.J., STROUP, S.E., ALLRED, D.R. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA-1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.89, p.259-270, 1997.
- O'CONNOR, R.M., LONG, J.A., ALLRED, D.R. Cytoadherence of *Babesia bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. **Infect. Immun.**, v.67, p.3921-3928, 1999.
- O'CONNOR, R.M., ALLRED, D.R. Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. **J. Immunol.**, v.164, p.2037-2045, 2000.
- OHNO, M., ICHIKAWA, H., COE, L., KVIETYS, P., GRANGER, D., ALEXANDER, J. Soluble selectin and ICAM-1 modulate neutrophil-endothelial adhesion and diapedesis in vitro. **Inflammation**, v.21, n.3, p.313-324, 1997.

- PARRODI, F., WRIGHT, I.G., BOURNE, A.S., DOBSON, C. In vitro adherence of bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis* to thrombospondin and laminin. **Int. J. Parasitol.**, v.19, n.5, p.567-569, 1989.
- PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malária, the red cell and the endothelium. **Ann. Rev. Med.**, n.45, p.283-295, 1994.
- PATARROYO S., J.H., VARGAS, M.I., 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., CAETANO, B.C., MARCELINO, F.C., KILGER, G.U. Modelo "in vitro" de adesão em células endoteliais de eritrócitos e leucócitos de bovinos infectados com *Babesia bovis*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11. **Anais...** Salvador, Brasil, 1999.
- PETZELBAUER. P., BENDER. J.R., WILSON, J., POBER, J.S. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness *in situ* and in cell culture. **J. Immunol.**, v.151, p.5062-5072, 1993.
- PONGPONRATN, E., RIGANTI, M., PUNPOOWONG, B., AIKAWA, M. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malária: a pathological study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.44, n.2, p.168-175, 1991.
- PREFUMO, F., SEMINO, C., MELIOLI, G., VENTURINI, P.L. A defective expression of ICAM-1 (CD54) on secretory endometrial cell is associated with endometriosis. **Immunol. letters**, v.80, p.49-53, 2002.
- PRIN-MATIEU, C., LE ROUX, Y., FAURE, G.C., LAURENT, F., BÉNÉ, M.C., MOUSSAOUI, F. Enzymatic Activities of Bovine Peripheral Blood Leukocytes and Milk Polymorphonuclear Neutrophils during Intramammary Inflammation Caused by Lipopolysaccharide. **Clinic. Diag. Lab. Immun.**, v.9, n.4, p.812-817, 2002
- PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology.** Washington, 1992. 274p.
- PRUDHOMME, J., SHERMAN, I., LAND. K., MOSES, ^a, STENGLEINS, S., NELSONS, J. Studies of Plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cell. **Int. J. Parasitol.**, v.26, n.6, p.647-655, 1996.
- PRUDHOMME, J., SHERMAN, I. A high capacity in vitro assay for measuring the cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J. Immunol. Method.**, v.229, p.169-176, 1999.

- RAAB, M., DAXECKER, H., MARKOVIC, S., KARIMI, A., GRIESMACHER, A., MUELLER M. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. **Clin. Chim. Acta**, n.321, p.11-16, 2002.
- REY VALEIRÓN, C. Auto anticuerpos contra glóbulos rojos en hemoparásitos. Año 4, n.1, p.17-35, 1998.
- RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. 589p.
- RISTIC, M., KAKOMA, I. Exoantigens of *Babesia*. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.131-142.
- RISTIC, M., LEWIS, G.E. *Babesia* in man and wild and laboratory-adapted mammals. In: **Parasitic Protozoa**. J.P. Kreier. New York: Academic Press, p.53-76, 1977.
- ROTHLEIN, R., BARTON, R., WINQUIST, R. The role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in the inflammatory response. In: **Cellular and molecular mechanisms of inflammation**. New York: Academic Press, 1991. 191p.
- ROWE, J.A., MOULDS, J.M., NEWBOLD, C.I., MILLER, L.H. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. **Nature**, v. 388, p. 292-295, 1997.
- RUDZINSKA, M.A. Morphologic aspects of host-cell-parasite relationships in babesiosis. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 87-141.
- SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUTARRA, D., ATTANATH, T., BOUHARON-TAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHAJAISIDDHI, T., DRUILHE, P. Parasitological and clinical response to immunoglobulin administration in *P. falciparum* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.297-308, 1991.
- SCHETTERS, T.P.M., EILING, W.M.C. Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria? **Parasitol. Today**, v.15, n.12, p.492-497, 2000.
- SCHIMIDT, J.A., UDEINYA, I.J., LEECH, J.H. et al. An amelanotic melanoma cell line bears receptors for the knob ligand on infected erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, v. 70, p. 379-386, 1982. Apud PASLOSKE, B.L., HOWARD, R.J. Malaria, the red cell and the endothelium. **Ann. Rev. Med.**, n.45, p.283-295, 1994.
- SCHOFIELD, L., NOVAKOVIC, S., GEROLD, P., SCHWARZ, R.T., McCONVILLE, M.J., TACHADO, S.D. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell

- adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. **J. Immunol.**, v.156, p.1886-1896, 1996.
- SCHRAVENDIJK, M.R., ROCK, E.P., MARSH, K., ITO, Y., AIKAWA, M., NEEQUAYE, J., OFORO-ADJEI, D., RODRIGUEZ, R., PATARROYO, M.E., HOWARD, R.J. Characterization and localization of *Plasmodium falciparum* surface antigens on infected erythrocytes from West African patients. **Blood**, v.78, n.1, p.226-236, 1991.
- SENEZUK, A., REEDER, J., KOSMALA, M., HO, M. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 functions as a ligand for P-selectin. **Blood**, v.98, n.10, p.3132-3135, 2001.
- SHAO, T., HE, C., SU, M., WEST, C., SWANSON, S., YOUNG, A. MENTZER, S. Cell adhesion molecule expression in the sheep thymus. **Devel. Comparati. Immuno.**, v.25, p.519-530, 2001.
- SHIMIZU, Y., NEWMAN, W., GOPAL, T.V., HORGAN, K.J., GRABER, N., BEALL, L.D., VAN SEVENTER, O.A., SHAW, S. Four Molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cell: role of LFA-1, VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathways hierarchy under different activation conditions. **J. Cell Biol.**, v.113, p.1203-1212, 1991.
- SHODA, L.K., PALMER, G.H., FLORIN-CHRISTENSEN, J., GODSON, D.L., BROWN, W.C. Babesia bovis-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infect. Immun.**, v.68, n.9, p.5139-5145, 2000.
- SOETHOUT, E., MÜLLER, K., RUTEM, V. Neutrophil migration in the lung, general and bovine- specific aspects. **Vet. Immunol. Immupathol.**, v.87, p.277-285, 2002.
- SPANIEL-BOROWSKI, K., FENYVES, A. The heteromorphology of cultered microvascular endothelial cells. **Drug. Res.**, v.44, n.1, p.385-391, 1994.
- STICH, R., SHODA, L., DREEWES, M., ADLER, B., JUNGI, T., BROWN, W. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by Babesia bovis. **Am. Soci. Microbio.**, v.66, n.9, p.4130-4136. 1998.
- SU, X., HEATWOLE, V.M., WERTHEIMER, S.P., GUINET, F., HERRFELDT, J.A., PETERSON, D.S., RAVETCH, J.A., WELLEMS, T.E. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Cell**, v.82, p.89-100, 1995.

- TREMBLAY, C., PARADIS, M., DORÉ, M. Expression of E and P-selectin in tumor necrosis factor-induced dermatitis in dogs. **Vet. Pathol.**, v.38, n.3, p.261-268, 2002.
- TSANG, Y.T.M., HASKARD, D.O., ROBINSON, M.K. Cloning and expression kinetics of porcine vascular cell adhesion molecules. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.201, p.805-812, 1994.
- TURNER, G.D.H., MORRISON, H., JONES, M., DAVIS, T.M.E., LOOAREESUWAN, S., BULEY, I.D., GATTER, K.C., NEWBOLD, C.I., PUKRITAYAKAME, S., NAGACHINTA, B., WHITE, N.J., BERENDT, A.R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence of widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule 1 in cerebral sequestration. **Am. J. Pathol.**, v.145, n.5, p.1057-1069, 1994.
- TURNER, G. LY, V.C., NGUYEN, T.H., TRAN, T.H., NGUYEN, H.P., BETHELL, D., WYLLIE, S., LOUWRIER, K., FOX, SB., GATTER, K.C., DAY, N.P., TRAN, T.H., WHITE, N.J, BERENDT, A.R. Systemic Endothelial Activation Occurs In Both Mild and Severe Malaria: Correlating Dermal Microvascular Endothelial Cell Phenotype and Soluble Cell Adhesion Molecules with Disease Severity. *et al* . **Am. J. Pathol.**, v,152, n.6, p.1477-1487, 1998.
- UDEINYA, I.J., SCHMITH, J.A., AIKAWA, M., MILLER, L.H., GREEN, I. Falciparum-malária infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, v.213, p.555-557, 1981.
- URBA, B.C., ROBERTS, D.J. Malaria, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v.14, p.458-465, 2002.
- VALIYAVEETIL, M., ACHUR, R., ALKHALIL. C., OCKENHOSE, F., GOWDA, C. Plasmodium falciparum cytoadherence to human placenta: Evalulation of hyaluronic acid and chondroitin 4-sulfate for bing of infected eritrocytes. **Exp. Parasithol.**, v.99, p.57-65, 2001.
- VALPORCIYAN, A., DELISSER, H., YAN, H., MENDIGUREN, I., THORN, S., JONES, M., WARD, P., ALBELDA, S. Involvement of patelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. **Setence**, v.262, p.1580-1852, 1993.
- VAN KAMPEN, C., MALLARD, B. Regulation of bovine E-selectin expression by recombinant tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n.79, p.151-165, 2001.
- VAN KAMPEN, C., MALLARD, B. Regulation of bovine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on cultured aortic endothelial cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.79, p.129-138, 2001.

- VERMONT-DESROCHES, C. Heterogeneity of antigenicity expression among human umbilical cord vascular endothelial cell subsets by coexpression of haemopoietic antigens. **Immunol. Letters.**, v.48, n.1, p.1-9, 1995.
- VOYTA, J.C., VIA, D.P. BUTTERFIELD, C.E. ZETTER, B.R. identification and isolation of endothelial cell based on the their increased uptake of acetylated low density lipoprotein. **J. Cell Biol.**, v.99, p.20034-2040, 1984.
- WAHLGREN, M., CARLSON, J., UDOMSANGPETCH, R., PERLMAN, P. Why do *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocytes rosettes? **Parasitol. Today**, v.5, p.183, 1989.
- WALCHECK, B., WARTS, G., JUTILA, M.A. Bovine gd T cell bind E-selectin via a novel glycoprotein receptor: first characterization of a lymphocyte/E-selectin interaction in an animal model. **J. Exp. Med.**, v.178, p.853-863, 1993.
- WENISCH, C., MYSKIW, D., PARSEHALK, B., HARTMANN, T., DAM, K., GRANINGER, W. soluble endothelial associated adhesion molecules in patients with Grave's disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 98, p. 240-244, 1994.
- WILLIMANN, K., MATILE, H., WEISS, N.A., IMHOF, B.A. In vitro sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes: a severe immunodeficiency mouse model for cerebral malaria. **J. Exp. Med.**, v.182, p.643-645, 1995.
- WRIGHT, I.G. An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia argentina* infection. **Int. J. Parasitol.**, v.2, p.209-215, 1972.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Proteolytic enzyme activity in the intra-erythrocytic parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Zur. Parasitenkd.**, v.42, p.213-220, 1973.
- WRIGHT, I.G., KERR, J.D. Hypotension in acute *Babesia bovis* (= *B. argentina*) infections of splenectomized calves. **J. Comp. Pathol.**, v.87, p.531-537, 1977.
- WRIGHT, I.G. Biogenic amine levels in acute *Babesia bovis* infected cattle. **Vet. Parasitol.**, v.4, p.393-398, 1978.
- WRIGHT, I.G. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: KREIER, J.P., RISTIC, M. (eds.). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p.171-206.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. In: RISTIC, M. (ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.99-118.

- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., CLARK, I.A. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. **Parasitology Today**, v.4, n.8, p.214-218, 1988.
- WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., BUFFINGTON, G.D., CLARK, I.A., PARRODI, F., WALTISBUHL, D.J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.83, p.11-13, 1989.
- XIAO, L., YANG, C., DOROVINI-ZIS, K., TANDON, N.N., ADES, E.W., LAL, A.A., UDHAYAKUMAR, V. *Plasmodium falciparum*: involvement of additional receptors in the cytoadherence of infected erythrocytes to microvascular endothelial cells. **Exp. Parasitol.**, v.84, p.42-55, 1996.
- YAMAMOTO, H., UEMURA, S., TOMODA, Y., FUJIMOTO, S., HASHIMOTO, T., OKUCHI, K. Transcardiac gradient of soluble adhesion molecules predicts progression of coronary artery disease. **Int. J. Cardiol.** v.84, p.249-257. 2002.