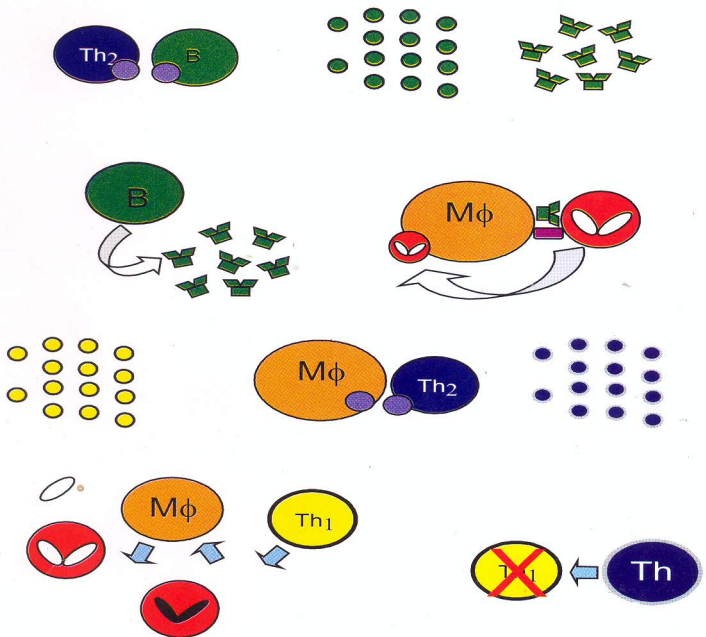


Resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia bovis*



Documentos60

Resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia bovis*

Magda Vieira Benavides

Gizele Lima de Sá

Ana Maria Sastre Sacco

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

Embrapa Pecuária Sul
BR 153, Km 595. Caixa postal 242
96401-970 - Bagé – RS
Fax: 55 53 3242-8499
<http://www.cppsul.embrapa.br/>
sac@cppsul.embrapa.br

Coordenação editorial
Comitê Local de Publicações Embrapa Pecuária Sul

Normalização bibliográfica
Graciela Olivella Oliveira

Editoração eletrônica
Gráfica Instituto de Menores

1ª edição
1ª impressão (2006): 2000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pecuária Sul

Benavides, Magda Vieira.

Resposta imune dos bovinos frente a infecção por *Babesia bovis* / Magda Vieira Benavides, Gizele Lima de Sá, Ana Maria Sastre Sacco. – Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2006.

32 p.: il. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos; 60).
ISSN 0103-376X

1. Bovino. 2. Babesia bovis. 3. Sanidade. 4. Imunidade. I. Sá, Gizele Lima de. II. Sacco, Ana Maria Sastre. III. Título. IV. Série.

CDD 636.0896

©Embrapa 2006

Autor

Magda Vieira Benavides

Zootecnista, PhD Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970,

(0XX53) 3242-8499, magda@cppsul.embrapa.br

Gizele Lima de Sá

Graduanda de Ciências Biológicas, Urcamp, Bolsista,
PIBIC/CNPq Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, Bagé-
RS, CEP 96401-970.

(0XX53) 3242-8499, gizele@cppsul.embrapa.br

Ana Maria Sastre Sacco

Méd. Vet. Dr. Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Caixa
Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970,

(0XX53) 3242-8499, anasacco@cppsul.embrapa.br

Sumário

Introdução	11
Resposta Imune	13
Imunidade idade-dependente	13
Imunidade inata e adquirida	15
Interação tipo de resposta x tempo de infecção: algumas hipóteses	17
Fatores relacionados a anemia	20
Aplicações	22
Conclusão	22
Referências	23
Glossário	26

Lista de Figuras

Figura 1	29
Figura 2	30

Resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia bovis*

Magda Vieira Benavides
Gizele Lima de Sá
Ana Maria Sastre Sacco

1. Introdução

Um dos graves problemas sanitários da pecuária do Rio Grande do Sul é a tristeza parasitária bovina (TPB), causada por protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e por rickettsia do gênero *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*). Estes agentes etiológicos parasitam as hemácias dos bovinos e são transmitidos pelo carrapato *Boophilus microplus*. A TPB causa prostração, febre, icterícia, anemia, anorexia, sintomatologia nervosa e, se não tratada, leva o animal à uma morte rápida. A doença é prevalente em regiões onde se encontra o *B. microplus*, ou seja, em áreas geográficas localizadas entre os paralelos 32°N e 32°S, sendo que o contato constante, desde o nascimento do bovino, com o carrapato induz a uma imunização natural contra os agentes da doença. A presença descontínua do carrapato, ocasionada por fatores climáticos e de manejo adversos ao seu desenvolvimento, impede uma imunização efetiva dos bovinos.

Nas regiões próximas ao paralelo 32°S do Brasil, surtos de TPB ocorrem em função dos bovinos receberem altas cargas de hemoparasitas em certas épocas do ano, ou mesmo infestações leves em animais adultos não previamente imunizados. Surtos em rebanhos sensíveis são de alta morbidade com perdas produtivas que acarretam perda de peso, atraso no crescimento e abortos, conseqüências importantes porém não facilmente mensuráveis pelos produtores. Além disso, os surtos de babesiose podem provocar índices de mortalidade superiores a 50%. Estes fatores fazem da TPB um dos

principais entraves para a produtividade e lucratividade dos rebanhos de corte e leite da Região Sul do Brasil.

Em recente diagnóstico da pecuária bovina de corte do RS realizado pelo Diagnóstico... (2005) foi constatado que 83% dos produtores não fazem prevenção contra a TPB, 9,1% pré-imunizam e 7,9% vacinam. Em média 39% dos produtores entrevistados possuem problema com a enfermidade, com uma perda média de 5,7 animais por ano, chegando a casos extremos como a morte de 83 animais em uma só propriedade no período de um ano.

A limitação atual no controle da TPB se encontra no fato de que os métodos de prevenção disponíveis ou seja, a pré-imunização tradicional ou vacinação com cepas atenuadas, estão baseados no processo infecção-resposta imune e constam da inoculação do agente vivo através de sangue. Esta inoculação pode apresentar riscos que incluem o desenvolvimento da doença que pode ser grave quando o inóculo é altamente virulento, a não-imunização quando são usados inóculos insuficientes ou mortos, e os riscos inerentes ao uso de sangue como veículo, como a transmissão/disseminação de outros agentes patogênicos. Portanto, é importante que sejam encontradas alternativas seguras de auxílio no controle da TPB, como vacinas de sub-unidade (ou recombinantes) eficientes e identificação de bovinos geneticamente resistentes à infecção causada por estes hemoparasitos. Para isto, um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune dos bovinos, determinados 'in vivo', é imprescindível para um melhor entendimento deste processo para propiciar sua utilização como ferramenta auxiliar no controle da doença.

Em função da similaridade da resposta dos hospedeiros frente a infecção por Babesia e Plasmodium, parasito causador da malária, esta revisão utilizará informações de ambos parasitos. Infecções causadas por Tripanossoma também ocasionam elevada anemia nos hospedeiros, razão pela qual estudos desta hemoparasitose também serão levados em consideração no texto.

▪ Resposta imune

A infecção por *Babesia*, que pode se apresentar de forma subclínica (animais em processo de imunização e portadores sadios) ou clínica (animais doentes), é uma consequência direta do processo de multiplicação do parasito nos eritrócitos do hospedeiro. Este processo de multiplicação é mais ou menos intenso dependendo de vários fatores como a espécie e o grau de virulência do parasito inoculado, o tamanho do inóculo e, principalmente, a reação ou resposta imune do hospedeiro frente a esta infecção, o que é fundamentalmente baseado na raça e na idade deste hospedeiro.

A resposta imune protetora à babesiose requer o envolvimento da imunidade humoral, mediada por anticorpos (linfócitos B ou imunoglobulinas) e da imunidade celular, mediada por células efetoras e linfócitos T, células Th₁ e CD4⁺. Estas células são produtoras de cininas biológicas (ou citocinas) como interferom gama, fator de necrose tumoral e interleucinas, entre outros, que afetam diretamente a multiplicação do parasito, estimulando ou dificultando o processo de resposta imune.

Imunidade idade-dependente

Bovinos jovens, do nascimento até aproximadamente seis a nove meses de idade, são mais resistentes a protozoários quando comparados a bovinos adultos (GOFF et al., 2001). Animais jovens, filhos de mães imunes, recebem anticorpos específicos através do colostro (imunidade colostrar) que os protegem aproximadamente até os 60-90 dias de idade. Krolow (2002) estudou as porcentagens de animais que apresentavam anticorpos específicos contra *B. bovis* em terneiros nascidos de mães imunes e observou um pico de 90% positivos no 5º dia de vida, sendo que aos 60 dias de idade, mais de 60% dos terneiros já se apresentavam sorologicamente negativos para *B. bovis*.

Além da imunidade colostrar existem outros fatores que determinam uma maior resistência dos bovinos jovens frente à

infecção por *B. bovis*, como a produção de citocinas, o que é diferente em animais jovens e adultos. Goff et al. (2001) observaram que os sintomas clínicos da babesiose eram mais severos em adultos do que em terneiros de 3 meses, constatando uma importante diferença na expressão de interferon gama (IFN-g) e interleucina 12 (IL-12). Terneiros mostraram expressão destas duas citocinas imediatamente após infecção, enquanto que a expressão destas em animais adultos foi detectada em células mononucleares esplênicas somente a partir do 5º dia pós infecção. Além disso, as células esplênicas dos terneiros foram estimuladas à produção de óxido nítrico (NO) tanto pela presença de merozoítos como de interferon gama (IFNg) e fator de necrose tumoral alfa (TNFa). O NO possui um efeito babesicida nas hemácias parasitadas, induzindo a morte intraeritrocitária. As células esplênicas de adultos não apresentaram resposta de NO, conseqüentemente, estes animais apresentaram altas parasitemias e vieram a óbito entre o dia 12-15 pós inoculação enquanto que a parasitemia dos terneiros foi menor, foi constatada morte intraeritrocitária e os animais sobreviveram.

Em adultos, a presença inicial e contínua de IL-10 provoca reduções nas expressões de TNFa e IFNg esplênicas, diminuindo o feedback positivo destas na produção de NO pelos fagócitos mononucleares esplênicos e reduzindo o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro frente a *Babesia bovis* (GOFF et al., 2001). Em trabalho posterior, foi demonstrado que células citotóxicas natural (NK) esplênicas de terneiros também produziam IFNg em resposta aos estímulos por IL-12 e IL-18, citocinas Th₁, além daqueles normalmente expressos por macrófagos quando estimulados por merozoítos de *B. bovis* (GOFF et al., 2006).

Diferenças marcantes entre animais jovens e adultos também ocorrem sob dois aspectos: (1) alta porcentagem de células T em animais jovens (HEIN; MACKAY, 1991), em relação a células T e (2) decréscimo na resposta pró-inflamatória a medida que os animais envelhecem (CLARK; JACOBSEN, 1998). Talvez estas sejam possíveis explicações do porquê animais mais jovens sejam mais resistentes a primo-infecções hemoparasitárias.

Camundongos produzidos com inativação gênica que causa a ausência (knock-out ou KO) de células não suportaram infecção por uma cepa de *B. microti* altamente virulenta (WA1), mostrando que a ação destas células é vital para a resposta do hospedeiro frente ao patógeno. A sobrevivência frente a desafio com *Babesia* sp. em camundongos KO para o receptor do TNFalfa foi de 90%, seguida do grupo KO para CD8⁺ (células produtoras de IFNg; 78%), sugerindo que a resposta destas duas citocinas pró-inflamatórias, embora necessárias, podem contribuir para agravar a patologia da babesiose (HEMMER et al., 2000).

- Imunidade inata e adquirida dos bovinos a infecção por *Babesia bovis*

A resposta imune dos bovinos frente à infecção por *Babesia* requer tanto resposta inata como adquirida, mediada por células efetoras (principalmente macrófagos e NK), células Th₁ e anticorpos (BROWN, 2001). Um resumo dos mecanismos inato e adquirido é mostrado na Figura 1.

A resposta imune inata é uma resposta não específica, pronta para responder a infecções primárias. Quando o bovino é primo-infectado por *B. bovis*, ocorre uma resposta por parte dos macrófagos que fagocita hemácias parasitadas e merozoítos livres. Os macrófagos processam e apresentam os antígenos de *B. bovis* para as células CD4⁺ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Este processo é necessário pois eritrócitos não apresentam moléculas de MHC, portanto necessitam de células apresentadoras de antígeno que promovam o posterior desenvolvimento de uma resposta imune adquirida (BROWN; PALMER, 1999).

Além de IFNg e TNFa, os macrófagos também produzem interleucinas 12 (IL-12) e IL-1 beta (SHODA et al., 2000). A IL-1 beta estimula a ativação de células CD4⁺, estas, por sua vez, produzem IL-2 que estimula a diferenciação e proliferação de células CD4⁺ específicas ao parasito e também a ativação de macrófagos (ROITT et al., 2003). Os macrófagos ainda secretam produtos tóxicos, principalmente o

óxido nítrico, que são responsáveis pela morte intraeritrocitária de *B. bovis* uma vez que impede o crescimento *in vitro* de *B. bovis* (MONTEALEGRE et al., 1985; SHODA et al., 2000).

Possivelmente o óxido nítrico seja um dos principais fatores de controle de parasitemia durante o processo de infecção por *B. bovis*, contribuem para uma melhor resposta do óxido nítrico os IFN γ e de TNF α produzidos por macrófagos e por células CD4⁺ Th₁ estimuladas por *B. bovis* (STICH et al., 1998). Os resultados de Goff et al. (2001) indicam que a morte intraeritrocitária de *Babesia* em terneiros nos dias 11-13 pós-inoculação possam ser resultado da expressão de iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) ocorrida nos dias 7-8 pós-inoculação nesta categoria animal.

Ao mesmo tempo que o óxido nítrico e a resposta de células CD4⁺ Th₁ são necessários para o desenvolvimento da resposta imune do bovino frente a *B. bovis*, super-expressões destas citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico podem contribuir para o agravamento da infecção (STICH et al., 1998) e dificultar a recuperação do animal.

Não está claro que fatores que levam à redução da resposta de células Th₁ (aliada a resposta celular), mas esta ocorre após o pico de parasitemia (GOFF et al., 2001). Uma hipótese é de que o próprio óxido nítrico possa ter função inibidora nas células CD4⁺ Th₁ produtoras de IFN γ (GOFF et al., 2001), levando a uma redução na resposta de macrófagos, porém, mais importante é a sua capacidade de estimulação da IL-4, a qual servirá como feedback negativo para o próprio NO e as citocinas inflamatórias (KALLMAN et al., 1999). Há também relatos de que o TGF β (Transforming growth factor beta) possa atuar na supressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de TNF α , quando este é produzido durante a infecção. Além disso, o aumento de expressão de TGF β acarreta em aumento de expressão de IL-10 que regula a síntese de IFN γ , TNF α e NO durante a infecção *in vivo* por *B. bovis* (GOFF et al., 2001).

Em camundongos parasitados por *Plasmodium chabaudi* houve redução da parasitemia durante a resposta primária

quando foram observados altos títulos de IgM e IgG₂ logo após (1-2 dias) os animais terem atingido o pico de parasitemia (TAYLOR-ROBINSON, 1995), sugerindo uma resposta de células CD4⁺ Th₂. A IL-4, citocina produzida por células CD4⁺ Th₂, é responsável pela diferenciação de células B e mudança isotípica de imunoglobulinas, aumentando a produção de IgG₁ e IgE (ESTES et al., 1994). Além disso, todas as células *Babesia*-específica CD4⁺ produzem IFN γ (BROWN et al., 1993) que é uma citocina capaz de estimular células B a se diferenciar e multiplicar para a produção de IgG₂. É possível que estas imunoglobulinas atuem como opsoninas, ativando novamente macrófagos pela via de complemento e auxiliando no processo imune dos bovinos contra a infecção por *B. bovis* (BROWN; PALMER, 1999).

Uma vez ocorrida a resposta à infecção primária, acredita-se que a resposta adquirida dos bovinos frente a infecção por *B. bovis* dependa de células CD4⁺ Th₁ e Th₂ parasito-específico para promover tanto a ativação de macrófagos e mecanismos de eliminação do parasito como a produção de IgG (BROWN; PALMER, 1999). Mesmo tendo sido demonstrado que bovinos imunizados foram capazes de suportar desafio homólogo de *B. bovis*, as evidências mostram que a imunização não foi capaz de proteger os bovinos contra desafio heterólogo. Já bovinos naturalmente infectados ou imunizados com organismos mortos se mostraram protegidos a desafios homólogo e heterólogo (MAHONEY, 1994), mostrando que anticorpos oferecem proteção parcial. Portanto, a resposta imune à *B. bovis* só será completa se apresentar respostas humoral e celular.

- Interação tipo de resposta x tempo de infecção: algumas hipóteses

De acordo com os resultados apresentados até o momento, o sucesso para uma efetiva imunização dos bovinos frente à infecção primária por *B. bovis* depende de uma resposta celular baseada em macrófagos e de resposta Th₁ logo após a infecção (fase 1) e de uma resposta Th₂, provavelmente após o pico de parasitemia (fase 2) (BROWN, 2001; BROWN et al., 1993; BROWN; PALMER, 1999; GOFF et al., 2001, 2006; MONTEALEGRE et al., 1989; STICH et al., 2000).

Elevada resposta de Th₁ na fase 1 pode levar a um quadro de imunopatologia, com altas produções de citocinas inflamatórias (IFNg, TNFa e IL-1b) e NO, ocasionando um agravamento da infecção com risco de óbito, se não tratados. Em comparação entre camundongos infectados por cepa virulenta (WA1) e não-virulenta de *B. microti*, foi observado que a resposta do hospedeiro frente a WA1 mostrou uma elevada resposta de TNFa e IL-10, em células , até o 10º dia pós-infecção, sendo que os níveis de IFNg e IL4 permaneceram constante até o final do estudo. Os camundongos inoculados por *B. microti* não-virulenta tiveram níveis constantes de TNFa e IFNg ao longo do experimento e baixos níveis de IL-10, constantes até o 18º dia pós-infecção, após, a IL-10 permaneceu alta e estável até o final da infecção. Nos camundongos infectados por WA1, os altos níveis de TNFa e IL-10 foram decisivos para a mortalidade de 100% dos indivíduos, mostrando que altos níveis da resposta Th₁ levam à uma infecção aguda seguida de óbito (HEMMER et al., 2000).

Por outro lado, se ao invés de uma resposta Th₁ ocorrer uma resposta Th₂ na fase 1, o desenvolvimento da resposta imune parasito-específica provavelmente será prejudicado e, neste caso, é possível que o animal venha a óbito pois não haverá controle da parasitemia. Em trabalho comparando bovinos jovens com adultos, foi observado que a expressão precoce e persistente de IL-10 na fase 1, uma citocina produzida por células Th₂ em células esplênicas, determinou a morte de todos os animais adultos. Em função desta resposta precoce de IL-10, os bovinos adultos atrasaram ou inibiram a resposta de células Th₁, não conseguindo controlar o processo de infecção. Embora a produção de IL-10 não tenha sido significativamente diferente entre terneiros e adultos, o tempo de expressão de IL-12 no baço de terneiros foi significativamente mais precoce do que em adultos (GOFF et al., 2001). Os autores sugerem que a presença tardia da IL-10 nos terneiros possa ter promovido a expressão precoce de IL-12 e sugerem que a IL-12 possa ter sido um dos fatores críticos para uma maior resistência nos bovinos jovens.

Efeitos antagônicos da IL-10 foram relatados na IL-12, IFNg, TNFa, IL-1, IL-2, IL-6 e iNOS (GOFF et al., 1998) que são citocinas pró-

inflamatórias importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune do hospedeiro frente à infecção por *Babesia* sp. Já em trabalhos com cepas letais de *Plasmodium yoelii*, a resposta Th_1 foi negativamente modulada por altos níveis de TGF β logo nas 24 horas pós-infecção, levando a aumento de parasitemia e morte de camundongos. Nos animais infectados por cepa não-letal, a produção de TGF β foi mais tardia, propiciando o desenvolvimento de resposta Th_1 e o controle da parasitemia (GOOD et al., 2005). Portanto, não só a presença de certas citocinas mas quando estas são produzidas são fatores essenciais no sucesso da resposta imune. Um diagrama com as hipóteses para diferentes tipos de resposta dos bovinos frente a infecção por *B. bovis* se encontra na Figura 2.

A existência dos mecanismos acima mencionados pode ser a explicação de diferentes fenótipos encontrados em experimento em andamento na Embrapa Pecuária Sul, que visa identificar diferentes tipos de resposta de bovinos frente a infecção por *B. bovis*. Estes resultados foram detectados em 240 bovinos das raças Aberdeen Angus e Hereford com idade >9 meses, originários de zona livre de carrapato *Boophilus microplus* (Santa Vitória do Palmar, RS) e sensíveis a *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, que foram inoculados com cepa virulenta de *B. bovis* (desafio experimental). Encontramos que 54,1% dos animais não necessitaram de tratamento específico para babesiose, destes, 25,8% com sintomatologia clínica da doença mas capazes de recuperação no final do processo de infecção ('auto-recuperação') e 28,3% mostraram leves parasitemia e redução em volume globular (<20%; 'resistentes'). Os demais (45,9%; 'suscetíveis') tiveram sintomatologia clínica de alta parasitemia e redução no volume globular e foram medicados para evitar óbito. Os resultados de sorologia (títulos de IgG anti-*B. bovis*) demonstraram que houve soroconversão em 100% dos animais na fase pós desafio, portanto os animais com leve redução no volume globular se mostraram realmente 'resistentes' à *B. bovis*.

A resposta imune destes diferentes fenótipos ainda não foi avaliada, no entanto é possível sugerir que tanto os animais resistentes quanto os que se recuperaram da doença tenham mostrado resposta

