

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PAULA BOEIRA BASSI

CINÉTICA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS
EM MODELO BOVINO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma vivax*

UBERABA, MG

2014

PAULA BOEIRA BASSI

CINÉTICA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS
EM MODELO BOVINO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma vivax*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Orientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar.

UBERABA, MG

2014

PAULA BOEIRA BASSI

CINÉTICA DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS
EM MODELO BOVINO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma vivax*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar – Orientadora.
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho á minha mãe Suzana pelo incentivo, amor, dedicação e ao meu pai João pelo exemplo de perseverança na busca do conhecimento e que apesar das dificuldades soube transmitir toda sua sabedoria e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - UNIUBE, em especial aos professores por todo o ensinamento transmitido neste período, e aos funcionários, pelos serviços prestados e grande ajuda em diversos momentos.

À Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar pela orientação nestes últimos quatro anos, desde a Residência em Diagnóstico Laboratorial. Agradeço pela confiança e por sempre acreditar na minha capacidade pessoal, me oferecendo oportunidade de crescimento e aprimoramento profissional.

Às Veterinárias Jandra e Camila, e às biomédicas Giovanna e Renata dos laboratórios do Hospital Veterinário de Uberaba (HVU), que também estavam presentes e sempre me deram suporte desde a minha especialização. Muito obrigada pela colaboração para a conclusão deste trabalho.

Aos Veterinários: Rita, Débora e Luciano, e aos colaboradores Antônio, Jandir, Toninho, Cristiano e Fernando do setor de Grandes animais do Hospital Veterinário de Uberaba, pela disponibilidade em me ajudar sempre, pela colaboração neste trabalho e cuidado com os animais do projeto.

Aos meus colegas do mestrado Dênia e Luiz Flávio pela amizade, pela ótima convivência, pela ajuda e colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos alunos de iniciação científica Everton, Guilherme, José Paulo, Marco Túlio e Rafael pelo auxílio durante as coletas e disponibilidade, além da colaboração durante o experimento, com certeza vocês também foram responsáveis por essa conquista.

Aos Prof. Dr. Olindo A. Martins Filho e Márcio Sobreira S. Araújo do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico – Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ, pela colaboração e pelos ensinamentos essenciais sobre as técnicas e padronização da citometria de fluxo neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Vinícius do laboratório de Imunologia da UFTM, pela disponibilidade em me ajudar durante as mensurações e avaliações por citometria de fluxo e nas análises estatísticas. Com certeza, teve fundamental participação na realização de grande parte deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que foi imprescindível para me dar suporte para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu noivo Anderson, pelo amor, carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

A toda minha família que sempre me apoiou e que de alguma forma contribuiu para minha realização profissional.

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*, pois atualmente pouco se sabe sobre as respostas imunes causadas por este parasito em bovinos nas diferentes fases de infecção. Foram inoculados experimentalmente, dez bovinos, sendo cinco do grupo infectado com 2×10^6 tripomastigotas de *T. vivax*/mL e cinco com solução fisiológica (2mL SC e IM). Os animais foram acompanhados em relação aos parâmetros clínicos (escore da condição corporal, temperatura retal, frequência cardíaca e frequência respiratória), e sinais clínicos da enfermidade, parasitologia (BCT), hematologia (hemograma), sorologia (RIFI) e imunofenotipagem, caracterizando perfil de LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT $\gamma\delta$ (WC1⁺), LB CD21⁺, ativação linfocitária (CD25⁺), células NK (CD335⁺) e ativação de monócitos/macrófagos (CD14⁺) em sangue periférico durante 90 dias. A parasitemia foi observada somente no GI a partir do 11° dpi, com pico no 18° dpi ($2,1 \times 10^4/\mu\text{L}$), e manteve-se intermitente até o final do experimento (90 dias). A partir do 6° dpi até o 90° dpi, os animais infectados apresentaram apatia, mucosas pálidas, secreção ocular e nasal, opacidade de córnea, diarreia, claudicação, aumento da temperatura corporal e diminuição do escore corporal. No hemograma foi observado no grupo infectado redução significativa dos parâmetros eritrocitários, leucocitários (neutrófilos, linfócitos e monócitos) e plaquetários associados à parasitemia, sendo a anemia microcítica normocrômica a mais prevalente. Quanto a imunofenotipagem de leucócitos periféricos, na fase inicial (0-11° dpi), foi observado aumento de LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT $\gamma\delta$ e IgM anti-*T. vivax*. A redução da parasitemia foi evidenciada com elevação de CD14⁺, da relação LT CD4⁺/CD8⁺, IgG e redução de IgM. Enquanto que, entre 21°-90° dpi observou-se elevação da relação LT CD4⁺/CD8⁺, LT CD25⁺, LT CD21⁺ e de IgG, e redução de LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LT $\gamma\delta$ provavelmente contribuíram para manutenção da baixa parasitemia. O entendimento dos sinais clínicos em conjunto com os mecanismos de resposta imune inata, celular e humoral frente ao *T. vivax* permitirá estabelecer protocolos imunoprofiláticos para a tripanossomíase bovina.

Palavras-chaves: Tripanossomíase, bovino, imunofenotipagem

ABSTRACT

This study aimed to describe the kinetics of clinical, hematological and immunological parameters in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Lately, few is known about the immune responses caused by this parasite in cattle at different stages of infection. The infected group with five calves were experimentally inoculated with 2×10^6 trypomastigotes of *T. vivax*/mL (2 mL SC and IM) and the control group, five calves were inoculated saline. Clinical parameters (body condition score, rectal temperature, heart rate and frequency) and clinical signs, parasitology (BCT), hematology (complete blood count) and immunology tests (IFAT and immunophenotyping) were evaluated. Immunophenotypic profile of peripheral leukocytes was featured on LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT $\gamma\delta$ (WC1⁺), LB (CD21⁺), lymphocyte activation (CD25⁺), NK cells (CD335⁺) and monocyte/macrophage activation (CD14⁺) for 90 days. The parasitemia was observed only in infected group from the 11th dpi, with a peak at 18th dpi ($2,1 \times 10^4/\mu\text{L}$), and remained until the end of the experiment. From the 6th dpi until 90th dpi, the infected animals showed apathy, pale mucous membranes, ocular and nasal discharge, corneal opacity, diarrhea, claudication, increased body temperature and decrease body condition score. Blood cells count in the infected group showed significant reduction in erythrocytes, leukocytes (neutrophils, lymphocytes and monocytes) and platelets parameters associated with parasitemia, being the most prevalent microcytic normochromic anemia. Immunophenotypic leukocytes profile in group of infected animals showed increase of LT CD4⁺, LT CD8⁺, and LT $\gamma\delta$ IgM anti - *T. vivax* in initial phase (0-11 dpi). Reduction of parasitemia was associated with an increase in CD14⁺, LT CD4⁺/CD8⁺ ratio and IgG, plus reduction in IgM. Meanwhile, from 21th to 90th dpi, the higher LT CD4⁺/CD8⁺ ratio, LT CD25⁺, LB CD21⁺ and IgG, plus reduction of LT CD4⁺, LT CD8⁺ and LT $\gamma\delta$ which contributed to the maintenance of low parasitemia. Understanding of clinical signs and the mechanisms of innate immune cellular and humoral response against *T. vivax* will establish immune prophylactic protocols for bovine trypanosomiasis.

Key-words: *Trypanosoma vivax*, bovine, flow cytometry, immunophenotyping

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Formas tripomastigotas do *Trypanosoma vivax* na corrente sanguínea do hospedeiro. Fonte: <http://www.fao.org>..... 22
- Figura 2 Ciclo biológico do *Trypanosoma vivax* nas moscas tsé-tsé e nos ruminantes na África. Fonte: Adaptado de Baral (2010). 24
- Figura 3 Espécies de tripanosomas transmitidas pela mosca tsé-tsé induzem a secreção de vários componentes a partir de células imunológicas. Além dos seus efeitos tripanocidas, estas moléculas também estão envolvidas em mecanismos deletérios para os tecidos do hospedeiro e/ou favorecer o desenvolvimento do parasito. (T: tripomastigota, MØ: macrófago; LT: linfócito T; LB: linfócito B). Fonte: Vincedeau e Bouteille (2006). 28
- Figura 4 Visão simplificada dos mecanismos inatos de imunidade contra infecções por tripanosomas. (+) regulação positiva, (-) regulação negativa, (?) regulação não confirmada, (MØ) monócito/macrófago, (MØc), monócito/macrófago classicamente ativado, (MØa) monócito/macrófago alternativamente ativado, (NK) células *natural killer*, (LT aux) linfócitos T auxiliares, (DC) células dendríticas. Fonte: Adaptado de Baral (2010) e Namangala et al. (2001). 32
- Figura 5 Visão simplificada dos mecanismos inatos e específicos nas infecções por tripanosomas. (+) regulação positiva, (-) regulação negativa, (?) não confirmado, (MØ) monócito/macrófago, (MØc), monócito/macrófago classicamente ativado, (MØa) monócito/macrófago alternativamente ativado, (NK) células *natural killer*, (LT aux) linfócitos T auxiliares, (LT cit) linfócitos T citotóxicos, (LB) linfócitos B, (DC) células dendríticas. Fonte: Adaptado de Namangala et al. (2001) e Baral (2010). 34
- Figura 6 Gel de Eletroforese (agarose 2%, corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml), fotografados sob luz ultravioleta a partir de resultados parasitológicos de amostras de DNA extraídas de sangue periférico no dia 0 (anterior à inoculação experimental). (1) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (2)

	controle positivo amostra de <i>T. vivax</i> de um isolado de Aquidauana-MS cedida pelo Professor Fernando Paiva do amplificada em 210pb; (3) controle negativo; (4-8) amostras do GC; (9-13) amostras do GI.	45
Figura 7	População de leucócitos periféricos bovinos, após a lise do sangue periférico com solução de lise. As populações estão selecionadas (círculos). (A) Linfócitos; (B) Monócitos; (C) Neutrófilos; (D) Basófilos e Eosinófilos.	49
Figura 8	Representação gráfica da população leucocitária de linfócitos (A) baseado no tamanho versus granuloseidade (círculo) e de monócitos (B) baseado no tamanho versus fluorescência (círculo).	50
Figura 9	Representação gráfica da população de linfócitos bovinos marcados com o anticorpo monoclonal anti CD4+ FL1(A); CD8+ FL1 (B); CD21+ FL1 CD335+ FL2 (C); CD25+ FL2 (D) e WC1+ FL2 (E).	51
Figura 10	Avaliação por BCT das formas tripomastigotas (seta) de <i>T. vivax</i> em esfregaço sanguíneo de bovinos do GI corado pelo Panótico Rápido (aumento 1000x).	53
Figura 11	Análise da atividade parasitêmica durante a infecção experimental <i>T. vivax</i> nos bovinos do GI. GI1, GI2, GI3, GI4 e GI5 referem-se ao perfil parasitário de cada animal do GI e a linha tracejada refere-se à média da parasitemia. As seleções retangulares (T1 e T2), indicam os momentos de tratamento com aceturato de diminazene.	54
Figura 12	Médias de temperatura retal dos grupos controle (GC) e infectado (GI) durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade de temperatura retal segundo Radostits et al. (2007).	55
Figura 13	Médias de ECC dos grupos controle (GC) e infectado (GI) durante a infecção experimental por <i>T. vivax</i> . 1. Caquético 2. Magro 3. Intermediário. 4. Gordo.	56

Figura 14	Figura 14. Opacidade de córnea (seta) em bovino infectado experimentalmente por <i>T. vivax</i> .	57
Figura 15	Médias da contagem de hemácias dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	58
Figura 16	Médias do teor de hemoglobina dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	59
Figura 17	Médias do hematócrito dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	59
Figura 18	Médias do VCM dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	60
Figura 19	Médias do CHCM dos bovinos dos grupos controle (CC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	61
Figura 20	Médias de HCM dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	61

Figura 21	Classificação das anemias dos bovinos do GI, durante a infecção experimental por <i>T. vivax</i>	62
Figura 22	Médias de contagem de plaquetas dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	63
Figura 23	Médias de contagem de leucócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	64
Figura 24	Médias de contagem de neutrófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	64
Figura 25	Médias de contagem de linfócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	65
Figura 26	Médias de contagem de monócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	66
Figura 27	Médias de contagem de eosinófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).	66

Figura 28	Médias de contagem de basófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).....	67
Figura 29	Médias dos monócitos/macrófagos ativados (CD14+) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa o limite mínimo de normalidade, segundo Buza et al. (2008).....	68
Figura 30	Médias das células NK (CD335+) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa o limite mínimo da normalidade segundo Bastos et al. (2008).....	68
Figura 31	Médias das células LT CD4+ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa os limite mínimo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).....	69
Figura 32	Médias de LT CD8+ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa o limite mínimo da normalidade segundo Tizard et al. (2012).	70
Figura 33	Médias da relação LT CD4+/CD8+ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	71
Figura 34	Médias de LT CD25+ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa o limite mínimo de normalidade, segundo Sakaguchi et al. (1995).	71
Figura 35	Médias de LT $\gamma\delta$ (WC1+) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . A linha horizontal tracejadas representa o limite mínimo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).	72

Figura 36	Correlação positiva entre perfil de parasitemia e $LT\gamma\delta$ (WC1+) ($P<0,05$) no grupo infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	72
Figura 37	Média de LB (CD21+) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).....	73
Figura 38	Média da relação LT/LB dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	74
Figura 39	Lâminas de RIFI mostrando resultado de amostra negativa (A) e amostra positiva (B) com as formas tripomastigotas de <i>T. vivax</i> marcadas com isotiocianato de fluoresceína. Imagens obtidas por microscópio confocal (Zeiss® LSM 510 Meta) (1000x).	74
Figura 40	Mediana da titulação de anticorpos IgM e IgG anti- <i>T. vivax</i> do grupo infectado durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Escore da condição corporal de bovinos com aptidão leiteira. Fonte: Maciel, (2006)	47
Quadro 2	Síntese dos resultados relacionados à interferência da parasitemia e comportamento das variáveis no grupo infectado durante infecção experimental por <i>T. vivax</i> . [↓] indica redução significativa e [↑] indica elevação significativa.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos anti-bovino monoclonais produzidos em ratos (Serotec®) marcados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), e ficoeritrina (PE) utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e marcadores de ativação.	48
Tabela 2	Frequência dos sinais clínicos relacionados com a atividade parasitêmica durante a infecção experimental <i>T. vivax</i> em bovinos do GI.....	56
Tabela 3	Perfil eritocitário e plaquetário dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	57
Tabela 4	Perfil leucocitário dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	63
Tabela 5	Perfil imunofenotípico das células da resposta imune inata dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	67
Tabela 6	Perfil imunofenotípico dos LT dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	69
Tabela 7	Perfil da resposta imune humoral dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por <i>T. vivax</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	-	Aspartato Aminotransferase
BCT	-	<i>Buffy Coat Technique</i>
CD	-	<i>Cluster of Differentiation.</i>
CHCM	-	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	-	Creatina quinase
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
dpi	-	dias pós-infecção
EC	-	Escore da condição corporal
ELISA	-	Ensaio imunoenzimático
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FITC	-	Isocianato de Fluoresceína
FL	-	Detector de fluorescência
FSC	-	<i>Forward Scatter</i>
GC	-	Grupo controle
GI	-	Grupo infectado
HAT	-	Tripanossomíase humana africana
HCM	-	Hemoglobina Corpuscular Média
IFN- γ	-	Interferon gama
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
IM	-	Intramuscular
LB	-	Linfócito B
LT	-	Linfócito T
LT $\gamma\delta$	-	Linfócito T gama-delta
MHC	-	Complexo de histocompatibilidade principal
MHCT	-	<i>Microhaematocrit Centrifugation technique</i>
MoAb	-	Anticorpo monoclonal
NK	-	Célula <i>Natural Killer</i>
ON	-	Óxido nítrico
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
PCR	-	Reação em cadeia de polimerase
PE	-	Ficoeritrina

RIFI	-	Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	-	Ácido Ribonucléico
SC	-	Subcutânea
SSC	-	<i>Side Scatter</i>
TA	-	Temperatura ambiente
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral alfa
LT reg	-	Linfócito T regulador
TRL	-	<i>Toll-like Receptor</i>
VCM	-	Volume Corpuscular Médio
VSG	-	Glicoproteína variáveis de superfície
WC	-	<i>Workshop Cluster</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	180
2 REVISÃO DA LITERATURA	222
2.1 TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOMETRIA	222
2.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	233
2.3 CURSO DA INFECÇÃO	255
2.4 FISIOPATOLOGIA, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E CLÍNICAS	266
2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO	29
2.5.1 Resposta imune Inata	29
2.5.2 Resposta imune Adquirida	33
2.6 DIAGNÓSTICO	37
2.6.1 Testes Parasitológicos	37
2.6.2 Testes Sorológicos	38
2.6.3 Testes Moleculares	39
2.6.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
2.6.3.2 Imunofenotipagem	40
2.7 TRATAMENTO	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAL DE MÉTODOS	45
4.1 NORMAS ÉTICAS	45
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	45
4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO	46
4.4 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA	46
4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA	47
4.6 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	48
4.7 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS	48
4.8 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA	51
4.9 TRATAMENTO	52
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	52
5 RESULTADOS	53
5.1 PERFIL PARASITÁRIO	53

5.2 PERFIL CLÍNICO	54
5.3 PERFIL HEMATOLÓGICO	57
5.4 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO	67
5.4.1 Células envolvidas na resposta imune inata	67
5.4.2 Células envolvidas na resposta imune adquirida	69
5.5 PERFIL SOROLÓGICO	74
5.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS	75
6 DISCUSSÃO	77
6.1 PERFIL PARASITÁRIO	77
6.2 PERFIL CLÍNICO	78
6.3 PERFIL HEMATOLÓGICO	79
6.4 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO	82
6.4.1 Células envolvidas na resposta imune inata	82
6.4.2 Células envolvidas na resposta imune adquirida	83
6.5 PERFIL SOROLÓGICO	86
7 CONCLUSÕES	87

REFERÊNCIAS

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (UNIUBE)

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase é uma enfermidade causada pelo gênero *Trypanosoma*, sendo o *Trypanosoma (Duttonella) vivax* (Ziemann, 1905) um dos protozoários hemoflagelados mais importantes responsáveis pela doença em espécies de ungulados silvestres e domésticos, principalmente bovinos na África e América Latina (OSÓRIO et al., 2008).

Na América Latina a transmissão ocorre por vetores mecânicos através de outros dípteros sugadores de sangue, além de transmissão por fômites como agulhas (HOARE, 1972; GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002).

T. vivax vem sendo de grande interesse para o Brasil, devido ao seu impacto negativo sobre a pecuária. É um dos protozoários mais importantes e patogênicos que causam a tripanossomíase bovina (OSÓRIO et al., 2008; GARDINER, 1989). Geram grandes perdas econômicas devido à morte de cerca de três milhões de bovinos anualmente, tanto nos países africanos quanto nos países da América do Sul. Em animais subclínicos o impacto econômico também é significativo devido à diminuição da produção de carne, leite e derivados, resultando em perda de aproximadamente cinco milhões de dólares/ano (OSÓRIO et al., 2008).

Este protozoário foi introduzido nas Américas provavelmente no século XIX (LEVINE, 1973) e o primeiro relato no Brasil ocorreu nos anos 70 no Estado do Pará em búfalos (SHAW; LAINSON, 1972). Atualmente, trabalhos realizados no Brasil revelaram que esta tripanossomíase foi encontrada nas regiões nordeste (BATISTA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2012), sudeste (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012), sul (SILVA et al., 2009) e principalmente centro-oeste (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004). A incidência de *T. vivax* no Brasil está aumentando, principalmente devido ao desconhecimento desta enfermidade pelos proprietários e profissionais, além da falta de controle, diagnóstico e vigilâncias insuficientes (SILVA et al., 2004).

Em Minas Gerais, o primeiro relato de ocorrência do *T. vivax* foi na região do Igarapé em 2007 (CARVALHO et al., 2008). Na região do Triângulo Mineiro já foi constatado surto, com prevalência de 16,2% em um levantamento soropidemiológico de bovinos realizado por Frange (2013), na microrregião de Uberaba.

A tripanossomíase bovina é caracterizada pela presença de formas tripomastigotas no sangue e ocorre em animal assintomático que pode evoluir da fase aguda para a crônica (OSÓRIO et al., 2008). Em surtos bovinos, ovinos e caprinos os sinais clínicos se caracterizam na fase aguda como alta parasitemia associada à febre, anemia, fraqueza,

diminuição na produtividade, perda de peso, crescimento restrito nos mais jovens, aborto e até mortalidade, o que leva a principalmente perdas econômicas nas propriedades (SCHENCK et al., 2001; BATISTA et al., 2007; 2009; CARVALHO et al., 2008, FRANGE, 2013).

No Brasil, a única droga liberada para tratamento contra *T. vivax*, é o aceturato de diminazene que possui ação tripanocida, porém já demonstrou resistência do parasito a campo com recorrências de parasitemia (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008). O que dificulta ainda mais o tratamento dos animais e controle da doença.

Os aspectos clínicos da doença estão associados às relações parasita-hospedeiro, interferindo diretamente na resposta imune dos animais (CUGLOVICI et al., 2010). Na América do Sul, a manifestação clínica ocorre em baixa frequência devido às características epidemiológicas com transmissão exclusivamente mecânica dificultando a variabilidade genética e a patogenicidade nas primo-infecções e em condições experimentais podendo estar relacionada a grandes quantidades de inóculo (DESQUESNES; GARDINER, 1993).

Os aspectos fisiopatológicos provocados pelo *T. vivax* em bovinos e seus mecanismos de modulação ainda não estão completamente elucidados. Estudos relacionados às tripanossomíases causadas por *T. vivax*, sugerem que os processos imunológicos desempenham um papel fundamental na patogênese da doença, pois desenvolvem resposta imune com o controle da parasitemia evitando o aparecimento de sinais clínicos, porém sem cura parasitológica (BURATAI et al., 2006). Em alguns casos, animais imunossuprimidos e suscetíveis a infecção mais grave, podem desenvolver uma resposta ineficaz, com o aparecimento de sinais clínicos mais graves e mortalidade (GUEGAN et al., 2013).

Para o desenvolvimento de uma resposta imune, os leucócitos são as principais células responsáveis contra as tripanossomíases, e a realização do perfil fenotípico de leucócitos periféricos tem fornecido importantes resultados para caracterização da patogênese nas tripanossomíases (SATHLER-AVELAR et al., 2003; HILL et al., 2005; BODA et al., 2009; BARAL, 2010). Porém, há a necessidade de estudos sobre a interferência do *T. vivax* na resposta imune, pois parte dos bovinos infectados desenvolvem manifestações graves da doença, apresentando formas clínicas altamente heterogêneas, sendo de grande importância não só para a compreensão dos mecanismos imunes e alterações clínicas, mas para a aplicação de terapias adequadas e o cuidado com estes animais no Brasil.

Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TAXONOMIA, MORFOLOGIA E BIOMETRIA

O gênero *Trypanosoma*, pertencente ao filo Euglenozoa, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subordem Trypanosomatina compõem as tripanossomíases que infectam membros de todas as classes de vertebrados e podem ser transmitidos pelos mais diversos vetores, tais como os invertebrados hematófagos (HOARE, 1972; GARDINER, 1989).

Trypanosoma vivax pertence à seção salivaria (HOARE, 1972) e ao subgênero *Dutonella*, pois faz a transmissão do tipo inoculativa, ou seja, é transmitido pelas glândulas salivares dos vetores e nos vertebrados multiplica-se assexuadamente por fissão binária de forma contínua como tripomastigotas (SILVA et al., 2002). Além deste, incluem mais três subgêneros: *Pycnomonas*, *Nannomonas* (*T. congolense*) e *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*).

T. vivax é um protozoário pleomórfico, apresentando o corpo alongado e achatado, com extremidades afiladas e um grande cinetoplasto pós-nuclear (Figura 1). O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo, correndo ao longo da membrana ondulante (DÁVILA et al., 1997). A característica mais marcante do *T. vivax*, é a presença de um grande cinetoplasto, maior em comparação a outras espécies patogênicas, sendo importante para diagnóstico, pois facilita a identificação em esfregaços de sangue periférico (HOARE, 1972). A membrana ondulante do *T. vivax* é mais desenvolvida em comparação ao *T. congolense* e inferior ao do *T. brucei*. Apresenta também um flagelo livre que está sempre presente (OSÓRIO et al., 2008).

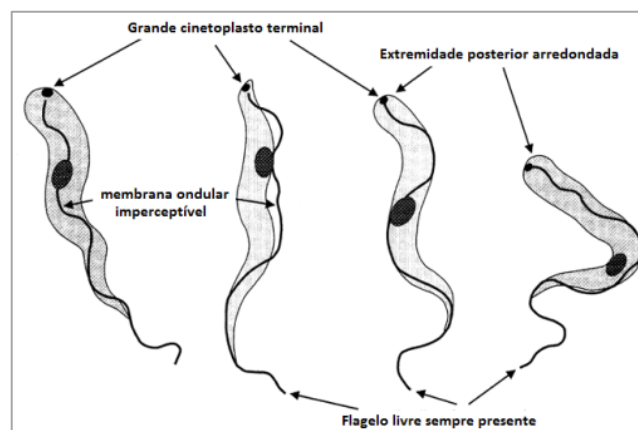


Figura 1. Formas tripomastigotas do *Trypanosoma vivax* na corrente sanguínea do hospedeiro.

Fonte: <http://www.fao.org>

A infecção é marcada por picos de parasitemias variando o número de parasitos e a distribuição das formas segue um padrão distinto (OSÓRIO et al., 2008). Estudos morfométricos demonstraram similaridade entre os isolados de *T. vivax* sul-americanos e aqueles do Oeste da África (SHAW; LAINSON, 1972; DÁVILA et al., 1997). Segundo Hoare (1972), durante a fase de parasitemia elevada, as formas tripomastigotas delgadas tem comprimento variando de 23,6 a 27,0µm, enquanto que na fase de baixa parasitemia, as formas curtas e largas apresentando variação de 21,4 a 24,6µm, sendo estas diferenças influenciadas pelo hospedeiro mamífero. Segundo Shaw e Lainson (1972) estas diferenças estão relacionadas com a patogenicidade do isolado. Na África, o *T. vivax* encontrados da costa Oeste apresentam forma mais curta e são de maior potencial patogênico e causam a forma aguda da doença, e as formas longas, que causam um quadro crônico, estão presentes no Leste do continente.

2.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O ciclo de vida do *T. vivax* envolve um hospedeiro invertebrado (vetor biológico), a mosca do gênero *Glossina*, e um hospedeiro vertebrado que geralmente são os mamíferos ungulados (OSÓRIO et al., 2008).

A espécie *Glossina* spp., é popularmente conhecida como tsé-tsé, que significa “mosca que mata o rebanho”. Estão restritas somente na África tropical e são responsáveis pela forma cíclica de transmissão (MATTIOLI; WILSON, 1996).

Os hospedeiros definitivos mais comuns nas tripanossomíases causadas por *T. vivax* são os bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos (GARDINER, 1989). Outros animais como os equídeos (LEVINE, 1973), ratos, camundongos ou cobaias são considerados refratários à infecção por *T. vivax* (CHAMOND et al., 2010).

No ciclo da infecção do *T. vivax* (Figura 2), a mosca tsé-tsé faz repasto sanguíneo, inoculando as formas infectantes no hospedeiro que passa para a forma tripomastigota e que na circulação sanguínea fazem multiplicação por fissão binária (OSÓRIO et al., 2008). A mosca ingere as formas tripomastigotas, e no esôfago e faringe, se multiplicam e se transformam em epimastigotas. Depois de 24 horas, estas migram em direção à hipofaringe da mosca onde se multiplicam intensivamente nas glândulas salivares, se transformam novamente em tripomastigotas, e depois em formas infectantes, também chamadas tripomastigotas metacíclicas ou metatripanosomas (SILVA et al., 2002).

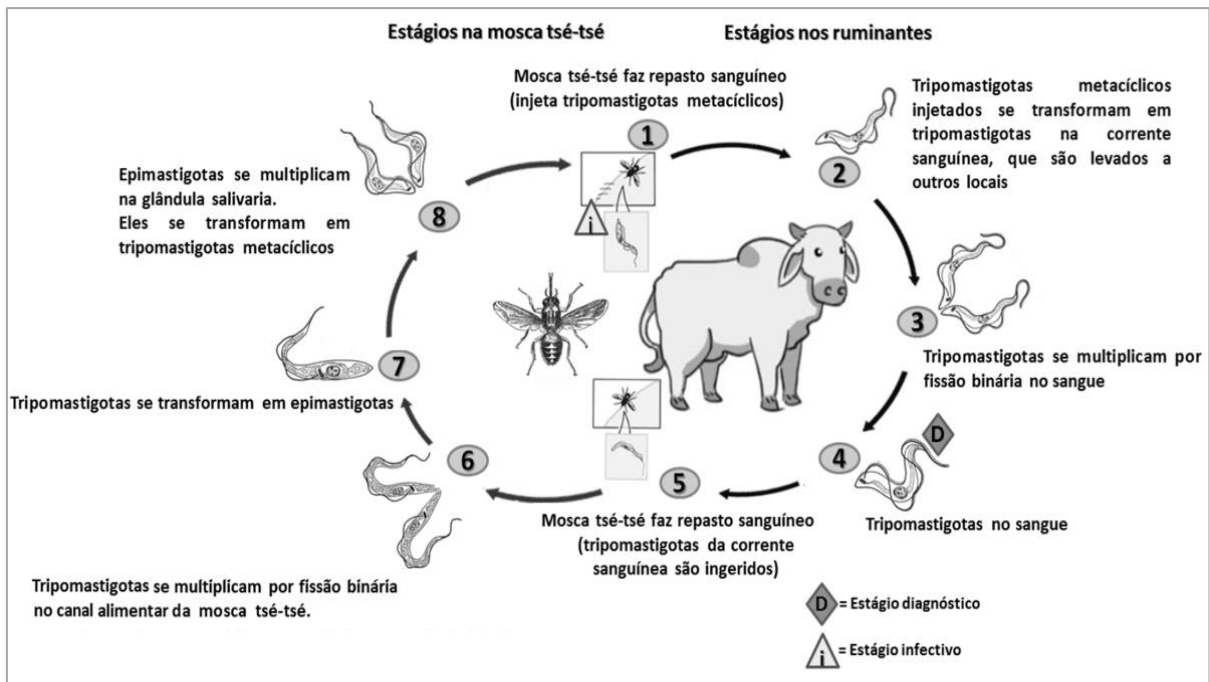


Figura 2. Ciclo biológico do *Trypanosoma vivax* nas moscas tsé-tsé e nos ruminantes na África.

Fonte: Adaptado de Baral (2010).

A transmissão mecânica na África também pode ocorrer por outros dípteros sugadores de sangue que atuam nesse caso, somente com vetores mecânicos (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008). Foi demonstrado em condições experimentais com tabanídeos, que na África, as transmissões mecânica e cíclica coexistem no campo, porém, apenas a transmissão mecânica pode explicar a presença permanente de *T. vivax* fora da região onde existe a mosca tsé-tsé (DESQUESNES; DIA, 2004; DELAFOSSE et al., 2006).

Na América Latina, a transmissão é estritamente mecânica, ou seja, os parasitos são transmitidos através de hospedeiros invertebrados, principalmente por moscas hematófagas dos gêneros *Tabanus* spp. (mutuca) e *Stomoxys* spp. (mosca dos estábulos), sem desenvolvimento cíclico nestes insetos (DESQUESNES, 2004; SILVA et al., 2002).

A adaptação à transmissão mecânica por insetos vetores na América Latina restringiu-se à variação antigênica deste parasito, sendo diretamente relacionada com sua patogenicidade, indicando que, o estabelecimento de sinais clínicos graves nesses países se deve à intensidade da parasitemia e não a variedade antigênica (JONES; DÁVILA, 2001).

Outra forma de transmissão mecânica que pode ocorrer é através de fômites, principalmente agulhas contaminadas com sangue contendo o parasito principalmente com a utilização de ocitocina em gado de leite para aumentar a produção (SILVA et al., 2002).

Na África, a transmissão transplacentária por *T. vivax* é incomum e apresenta baixa relevância na epidemiologia da doença (OGWU; NURU, 1981). Na América Latina, por outro lado, a transmissão transplacentária já foi relatada durante um surto da infecção no Brasil (BATISTA et al., 2012) e parece ser de relevância epidemiológica na Venezuela demonstrando a ocorrência de infecção perinatal pode ser antes ou após o parto (MELÉNDEZ; WILLIAM, 1993).

2.3 CURSO DA INFECÇÃO

O curso da infecção por *T. vivax* depende de uma série de fatores, entre eles o hospedeiro (espécie, raça, idade, tripanotolerância), presença do vetor biológico ou mecânico e patogenicidade do inóculo.

A parasitemia apresenta flutuações irregulares, até mesmo durante o dia (OSÓRIO et al., 2008). A literatura não descreve ritmo circadiano, ou mesmo uma periodicidade da parasitemia. Em alguns casos ocorrem níveis elevados de parasitemia no período da manhã e níveis mais baixos no período da tarde em um mesmo dia (OSÓRIO et al., 2008). O período inicial de parasitemia pode durar entre uma semana e dois meses antes das formas tripomastigotas se tornarem indetectáveis no sangue. Após essa fase, os períodos de recorrência da parasitemia podem ocorrer (MATTIOLI; WILSON, 1996).

O período pré-patente apresenta variações durante as infecções por tripanossomas entre pequenos e grandes ruminantes (HOOF et al., 1948). Em ovinos e caprinos, o período de pré-patente variou de quatro a 12 dias pós-inoculação (dpi) (HOOF et al., 1948; ALMEIDA et al., 2008), enquanto que em bovinos esse período pode variar de nove a 14 dias para os isolados virulentos e de três a 59 dias nas infecções com isolados menos patogênicos (HOARE, 1972; SCHENCK et al., 2001; HILL et al., 2005; ADAMU et al., 2007).

Estudos realizados por Adamu et al. (2007) na África em região onde há presença da mosca tsé-tsé, touros zebus foram infectados experimentalmente com *T. vivax* para avaliar a gravidade dos danos testiculares causados pelo parasito, e mostraram que a parasitemia ocorreu entre 4-5 dpi e o pico de parasitemia no 6º dpi.

No Brasil, no estado do Mato Grosso do Sul, o estudo de Schenk et al. (2001), demonstraram a presença de *T. vivax* na circulação sanguínea a partir do 3º dpi em todos os bezerros infectados experimentalmente, sendo que o pico ocorreu no 5º dpi e persistiu com variações de parasitemia até o 30º dpi com animais apresentando sinais subclínicos. Os

resultados obtidos sugeriram que a adaptação à transmissão mecânica na América latina reduz a variação antigênica do parasito, podendo ser um dos principais fatores a ser considerado devido à diferenciação das manifestações clínicas entre cepas africanas e americanas.

A infecção por *T. vivax* pode ser superaguda, aguda ou crônica. A infecção superaguda é caracterizada por parasitemia alta e persistente, levando o animal a óbito rapidamente dentro de três semanas de infecção. A infecção aguda é caracterizada por elevada parasitemia em associação à diminuição dos parâmetros eritrocitários, levando a anemia, podendo durar de 2 semanas a 2 meses após infecção. Na fase crônica, os animais que não morrem, os parâmetros eritrocitários tendem a aumentar (ou até voltar aos parâmetros fisiológicos) em torno de 6 a 8 semanas, porém ainda observam-se recorrências da parasitemia em baixas concentrações podendo se estender por vários meses e até anos (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004).

2.4 FISIOPATOLOGIA, ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E CLÍNICAS

Em bovinos com infecção natural ou experimental por *T. vivax*, a anemia é a manifestação mais frequente (SILVA et al., 1999; SCHENK et al., 2001; BATISTA et al., 2008) e tem sido considerada como parâmetro principal para monitorar a gravidade da doença nas tripanossomíases (GARDINER, 1989; D'IETEREN et al., 1998). Essa alteração pode estar atribuída à hemólise intra e extravascular causada pelo protozoário mais especificamente devido a um processo autoimune com deposição de imunocomplexos desencadeada durante a infecção, podendo levar a lesões teciduais principalmente inflamações ou necrose em baço, fígado e cérebro, além de incremento da fragilidade osmótica por ação da febre, edema cerebral e diminuição ou inibição da eritropoiese e hemorragias (ALMEIDA et al., 2008; BATISTA et al 2008; CHAMOND et al., 2010).

As hemácias são revestidas pelos complexos imunes, e são destruídas pelo sistema fagocíticomononuclear (baço e fígado) do hospedeiro, desencadeando a eritrofagocitose (TAYLOR, 1998). Guegan et al. (2013) caracterizaram uma família multigênica de trans-sialidases no *T. vivax*, que são enzimas liberadas no soro do hospedeiro após o reconhecimento das tripomastigotas pelos macrófagos durante a infecção, sendo capazes de desencadear eritrofagocitose.

No hemograma, a anemia está relacionada com a queda acentuada dos parâmetros do número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito sendo classificada como

anemia macrocítica normocrômica (SILVA et al., 1999). Pode ser verificada anisocitose, policromasia e presença de corpos intracelulares de *Howell-Jolly*, que são resultantes de mudanças regenerativas que ocorrem para compensar a perda de eritrócitos durante a infecção por *T. vivax* (BATISTA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008).

A leucopenia também é uma das alterações mais frequentes e a diminuição da contagem também pode estar relacionada com a ativação do sistema fagocíticomononuclear acarretando em fagocitose (CHAMOND et al., 2010). A presença da parasitemia está associada às mudanças das populações de leucócitos, sendo que leucopenia com linfopenia e neutropenia, é sugestiva de aumentos dos antígenos do parasita na circulação (ALMEIDA et al., 2008).

A trombocitopenia é outro achado que também está associada diretamente com o aparecimento da parasitemia nas tripanossomíases e também ocorre pelos mesmos processos desencadeados pela anemia (ASSOKU; GARDINER, 1989; CHAMOND et al., 2010), pois também há fagocitose generalizada plaquetas pelos macrófagos (MURRAY; DEXTER, 1988; GARDINER, 1989; CHAMOND et al., 2010).

Considerando então que a doença afeta múltiplas linhagens de células sanguíneas (hemácias, linfócitos e neutrófilos), hipoteticamente poderia levar a defeitos na hematopoiese contribuindo para a pancitopenia nas tripanossomíases (ANDRIANARIVO et al., 1995).

Nas infecções por *T. brucei*, este parasito induz a liberação de citocinas pelos macrófagos, em particular o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO), que possuem ação tripanocida e são capazes de causar inflamação e conseqüentemente o aparecimento dos sinais clínicos no hospedeiro (BARAL, 2010; VINCENDEAU E BOUTEILLE, 2006). Os macrófagos ativados alternativamente liberam L-ornitina, um aminoácido presente nas inflamações agudas, induzindo a reparação tecidual e modulação da resposta imune levando ao aumento da parasitemia e aparecimento da anemia. Um fator desencadeante de linfócitos derivado do tripanosoma induz a produção de interferon gama (IFN- γ) pelos linfócitos T (LT), que também está envolvido na modulação do sistema imune, facilitando o desenvolvimento parasitário.

Outros componentes antigênicos, principalmente as glicoproteínas variáveis de superfície (VSG), que é inteiramente coberta com uma monocamada feita de 10^7 cópias dessas moléculas, sofrendo mudanças antigênicas contínuas. Esta variação é um dos mecanismos adaptativos exibidos pelos tripanosomas apresentando função de tráfico macromolecular em que a VSG ligado ao anticorpo são selecionados e endocitados. As VSGs induzem a produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B (LB), causando lesões

teciduais devido à deposição de imunocomplexos (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006) (Figura 3).

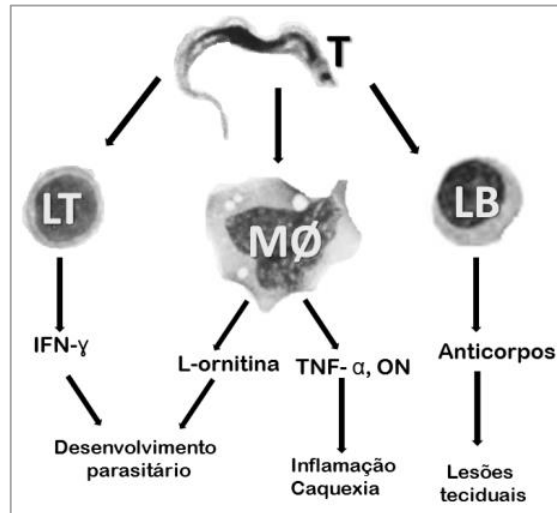


Figura 3. Espécies de tripanosomas transmitidas pela mosca tsé-tsé induzem a secreção de vários componentes a partir de células imunológicas. Além dos seus efeitos tripanocidas, estas moléculas também estão envolvidas em mecanismos deletérios para os tecidos do hospedeiro e/ou favorecer o desenvolvimento do parasito. (T: tripomastigota, MØ: macrófago; LT: linfócito T; LB: linfócito B).

Fonte: Vincendeau e Bouteille (2006).

Na América latina, surtos de tripanossomíase bovina com manifestações graves da doença, geralmente estão acompanhados de febre, anemia, mucosas pálidas, apatia, anorexia, linfadenomegalia, frequências respiratória e cardíaca aumentadas, perda de peso, diminuição da produção de leite, aborto, hemorragia visceral principalmente no trato gastrointestinal, e morte (SILVA et al. 2002; SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2007; OSÓRIO et al., 2008).

As lesões caracterizadas pela infecção por *T. vivax* podem levar ao aparecimento de sinais clínicos como ceratite, opacidade da córnea, secreção ocular e nasal (BATISTA et al., 2008; CADIOLI et al., 2012), edema subcutâneo da cabeça, epistaxe, salivação excessiva (BATISTA et al., 2007, 2011; CUGLOVICI et al., 2010), alterações neurológicas como tremores musculares e incoordenação motora (BATISTA et al., 2008; BATISTA et al., 2012), miocardite com acúmulo de líquido no saco pericárdio e hemorragias no epicárdio (MASAKE 1980; KIMETO et al. 1990; CHAMOND et al. 2010).

Outra alteração importante é o comprometimento do musculo esquelético observado nas infecções por *T. vivax*. O estudo de Almeida et al. (2010) sugeriram haver lesão muscular em ovinos infectados por *T. vivax*. Neste estudo, foi observado diminuição na concentração de aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), sendo que, estas enzimas

caracterizam uma alteração muscular esquelética. Esta diminuição pode contribuir para a morte celular, resultando até em neurodegeneração. Cadioli et al. (2005) verificaram que em ratos infectados com *T. evansi*, apresentaram emagrecimento progressivo até caquexia, com perda do tônus muscular e transtornos motores, evoluindo para paraplegias atribuídas às lesões que envolvem o sistema nervoso central e muscular.

As alterações reprodutivas também são importantes nas infecções por *T. vivax*, pois também interferem diretamente na produção animal, ocasionando problemas diretos na economia agropecuária. Adamu et al. (2007) verificaram que a infecção por *T. vivax* em touros podem causar danos severos ao testículo e epidídimo resultando em infertilidade ou até esterilidade. Já nas fêmeas, foi observado aborto no terço final da gestação e observação de bezerros natimortos (SILVA et al., 2004; DELAFOSSE et al., 2006; BATISTA et al., 2007).

Os animais que se recuperam da doença podem se tornar reservatórios, com baixos ou mesmo indetectáveis contagens sanguíneas do parasito (DELAFOSSÉ et al., 2006; BARAL, 2010). Em baixa parasitemia, os tripanosomas podem ser encontrados extravascularmente em linfonodos (HOARE, 1972), no plexo coróide e humor aquoso dos olhos, e no fluido cefalorraquidiano (BODA et al., 2009). Como consequência, quando há imunossupressão ou debilidade nestes animais, o parasito pode se espalhar rapidamente devido ao trânsito de animais, além de combinar com a disponibilidade de potenciais vetores mecânicos (DESQUESNES, 2004).

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

Por não haver descrição detalhada da resposta imune de bovinos contra *T. vivax* a revisão abaixo foi realizada em relação aos tripanosomatídeos de forma geral, abrangendo principalmente as espécies da seção salivária como *T. brucei* e *T. congolense*, pois os mecanismos do ciclo biológico e resposta imune inata e adaptativa demonstram ser semelhantes em vários aspectos.

A resposta imunológica nas tripanossomíases é complexa, desde a infecção até a proteção imunológica. Após a infecção, as formas infectantes (tripomastigotas) se movem a partir do local de inoculação, para todas as partes do organismo pelo do sistema sanguíneo e linfático (OSÓRIO et al., 2008). O prognóstico da doença varia consideravelmente devido à complexidade da interação parasito-hospedeiro, resultando em mecanismos de resposta imune adaptativa celular e humoral (BLACK et al., 2001; BODA et al., 2009). Em animais com

tripanotolerância, a resposta pode ser mais rápida e eficaz levando ao não aparecimento de sinais clínicos graves do que em comparação aos animais suscetíveis (NAESSENS et al., 2002).

Diferentes aspectos clínicos da doença por *T. vivax* estão associados com as relações parasita-hospedeiro, interferindo diretamente na resposta imune dos animais (CUGLOVICI et al 2010, OSÓRIO et al., 2008). A maioria dos bovinos infectados nas tripanossomíases evolui para a fase crônica e podem permanecer clinicamente assintomáticos (oligossintomáticos), sendo definidos animais como tripanotolerantes (TAYLOR, 1998; D'IETEREN et al., 1998).

A tripanotolerância é definida como a capacidade dos hospedeiros, de diferentes origens genéticas, em controlar a parasitemia e anemia relacionada, que são dois dos principais efeitos patogênicos (TAYLOR, 1998; NAESSENS et al., 2002). Este fenômeno depende das cepas envolvidas e pode ocorrer em bovinos com idade, estado nutricional e condições de estresse variado, podendo estar envolvido também em infecções intercorrentes (HILL et al., 2005). Animais tripanotolerantes parecem controlar a parasitemia pela resposta imune inata, independente da resposta adquirida (TAYLOR, 1998).

Entretanto, Tabel et al. (2008) relatam que o mecanismo da imunossupressão de acordo com infecções causadas por *T. brucei* ainda é uma questão não definida, pois ainda não se sabe qual o mecanismo de mediação da resposta imunológica. Segundo Taylor (1998), a imunossupressão causada pelas tripanossomíases é marcada por uma diminuição na proliferação de LT e na produção de citocinas auxiliares, podendo estar associado ao sistema imunológico fagocíticomononuclear em estado de imunossupressão para outros antígenos. A supressão generalizada foi relatada afetando as funções tanto na resposta imune humoral (LB) quanto na resposta imune celular (LT), conseqüentemente, levando à ocorrência de patologias induzidas pelo tripanosoma.

2.5.1 Resposta imune Inata

A resposta imune inata é o principal mecanismo de proteção contra a infecção por *T. congolense* e *T. brucei* (HILL et al., 2005; BARAL, 2010). Uma vez que as formas infectantes são inoculadas pela picada do vetor nos hospedeiros mamíferos, elas enfrentam as primeiras barreiras do sistema imune inato (BARAL, 2010).

Na tentativa de eliminar o parasito, o bovino (hospedeiro) possui barreiras físico-químicas, como o epitélio (pH e ácidos secretados), além de substâncias solúveis, como enzimas presentes em superfícies e secreções, citocinas (tipo 1) como interferons, proteínas

do sistema complemento e proteínas de fase aguda (amilóide, haptoglobulina, fibrinogênio), e ainda, células (neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*) que irão participar na destruição e eliminação do antígeno (FLYNN et al., 1994). Estes mecanismos de defesa são importantes para iniciar uma resposta inflamatória aguda contra antígenos do tripanosoma e manter a saúde dos animais e se esta função for interrompida por qualquer razão, o animal torna-se mais susceptível à infecção.

Entretanto, os tripanosomas necessitam de mecanismos para burlar a resposta imune do hospedeiro. Uma das principais características antigênicas dos tripanosomas é a presença das glicoproteínas de superfície (VSGs), que cobrem praticamente toda a membrana e é o antígeno de superfície predominante (BARAL, 2010). Este mecanismo provavelmente protege os parasitas da morte mediada pelo complemento e fuga dos tripanosomas do sistema imunitário do hospedeiro. Alguns mecanismos encontrados no *T. brucei*, tais como nivelamento de cobertura da superfície pela ligação dos fatores imunes e restrição dos receptores invariáveis no flagelo, pode tornar o parasito inacessível para a resposta imune do hospedeiro (BARAL, 2010).

T. brucei pode induzir a ativação (clássica) dos macrófagos pela liberação de DNA na fase aguda, a partir dos tripanosomas mortos na corrente sanguínea e também pelas VSGs de membrana, na porção glicosil inositol fosfato (GIP) associado à cadeia lateral da galactose. Essa ativação dos macrófagos resulta em produção direta de TNF- α e secreção de interleucina (IL) como IL-1, IL-6 (citocinas do tipo 1) substância tripanocida como óxido nítrico (NO) com funções pró-inflamatórias e (COLLER et al., 2003; HARRIS et al., 2006; BARAL, 2010).

Os macrófagos são importantes na resposta inata contra as tripanosomíases nos bovinos, pois desempenham função protetora, promovendo a fagocitose dos parasitos opsonizados com anticorpo e secreção moléculas tripanotóxicas que estão envolvidas no controle do primeiro pico de parasitemia (HARRIS et al., 2006). Entretanto, as concentrações IL-1 e TNF- α aumentam nas fases iniciais da doença, e pode ser parcialmente responsável pelos efeitos patogênicos das infecções por protozoários hemoflagelados (COLLER et al., 2003). Segundo Baral (2010), os macrófagos podem agir nesses casos de forma prejudicial por fagocitar e destruir hemácias e leucócitos e seus progenitores resultando em hipersensibilidade do tipo IV (Figura 4).

As células *natural killer* (NK) dos bovinos também desempenham um papel importante neste tipo de resposta imune, influenciando o desenvolvimento da imunidade celular adquirida, pois regulam respostas mediadas por LT (PASTORET et al., 1998). A

indução da ativação de células NK depende principalmente da IL-12 produzida pelos macrófagos ativados e células dendríticas (Figura 4), o que tem sido demonstrado pelo aumento da atividade lítica dos macrófagos do hospedeiro contra alvos sensíveis à ação de células NK (BARAL, 2010).

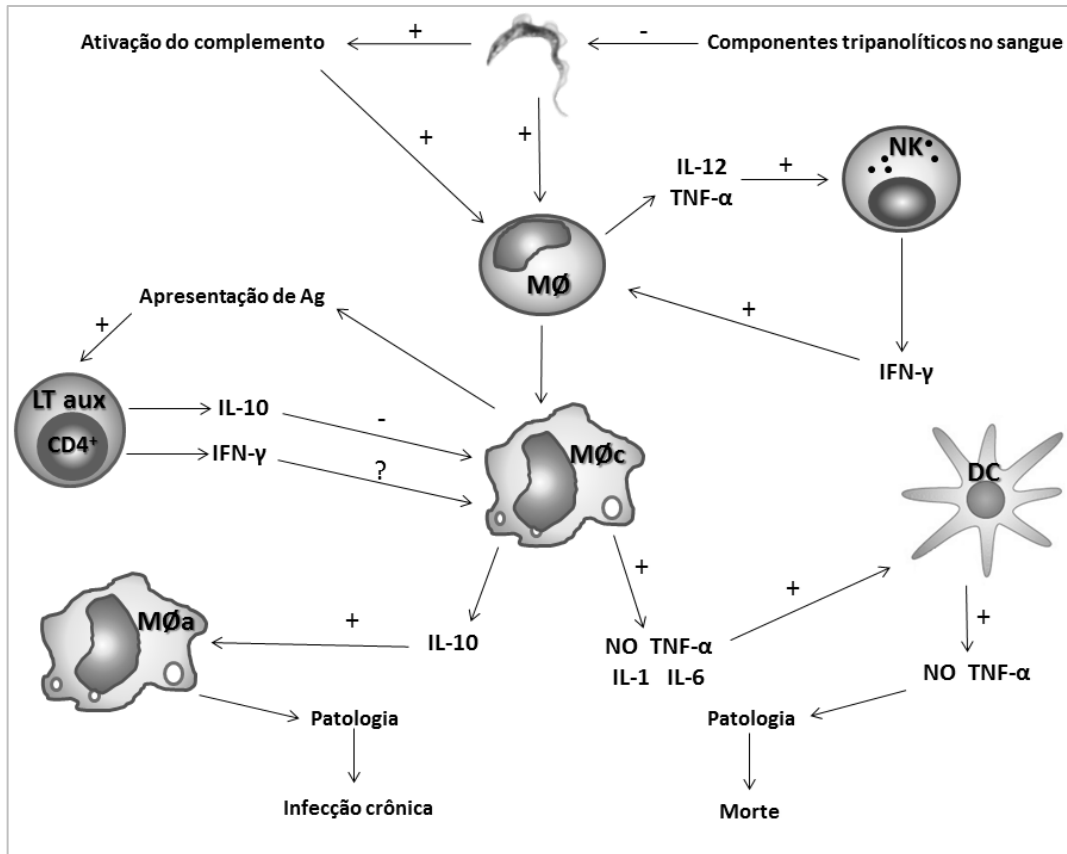


Figura 4. Visão simplificada dos mecanismos inatos de imunidade contra infecções por tripanosomas.

(+) regulação positiva, (-) regulação negativa, (?) regulação não confirmada, (MØ) monócito/macrófago, (MØc), monócito/macrófago classicamente ativado, (MØa) monócito/macrófago alternativamente ativado, (NK) células *natural killer*, (LT aux) linfócitos T auxiliares, (DC) células dendríticas.

Fonte: Adaptado de Baral (2010) e Namangala et al. (2001).

Tipicamente, as células NK são as primeiras a responderem durante a infecção com agentes patogênicos (intracelulares), produzindo IFN- γ em resposta à infecção, além de promoverem a maturação das células dendríticas e respostas mediadas por LB (BASTOS et al., 2008). Nas tripanossomíases, que são causadas por patógenos extracelulares, essa resposta não é eficaz, porém o papel do interferon- gama (IFN- γ), e o papel do NO e IFN- γ em conjunto com a resposta por anticorpos, têm sido considerados cruciais no controle da infecção por *T. congolense* e por *T. brucei* no primeiro pico de parasitemia (MAGEZ et al., 2006). Por outro lado, na infecção por *T. evansi*, embora os níveis de TNF- α , IFN- γ e NO

estejam elevados na fase inicial da infecção, nenhuma destas moléculas pareceram ser importante para o controle da parasitemia bem como para a sobrevivência do hospedeiro (BARAL, 2010).

Os neutrófilos também possuem atividade importante neste tipo de resposta e estão presente nas inflamações teciduais. Segundo Espinoza et al. (2000), foi avaliado que em novilhas e bezerros infectados experimentalmente por *T. vivax* houve mudanças significativas no número total de neutrófilos, em associação com o processo patológico de hemólise na fase inicial e no período pré-patente. Esta alteração fisiopatológica ocorreu também para outras tripanossomíases (MURRAY; DEXTER, 1988). Sandoval et al. (1996) observaram a presença de neutropenia em grandes e pequenos ruminantes infectados com *T. vivax* na fase aguda e no pico de parasitemia, devido à transmigração para os tecidos lesionados durante processo inflamatório e fase aguda da infecção (SANDOVAL et al, 1996).

2.5.2 Resposta imune Adquirida

2.5.2.1 Resposta Celular

A resposta adquirida celular é caracterizada pela participação dos LT auxiliares ($CD4^+$) e citotóxicos ($CD8^+$). De maneira geral, os LT quando estimulados por um antígeno do parasito, se diferenciam em LT efetores para desenvolver LT de memória posteriormente.

Os LT agem como efetores pela da citotoxicidade mediada por célula (LT citotóxicos), secretando perforinas e granzimas, ou pela produção de citocinas (LT auxiliares), incluindo IL-4 e IL-13, para ativar outras células efetoras, tais como LB, células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos e células dendríticas (BARAL, 2010). Nas infecções por *T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax* em bovinos, os LT melhoram as respostas dos LB, principalmente pela secreção de citocinas mediando troca de classe de anticorpos (TABEL et al, 2008) (Figura 5).

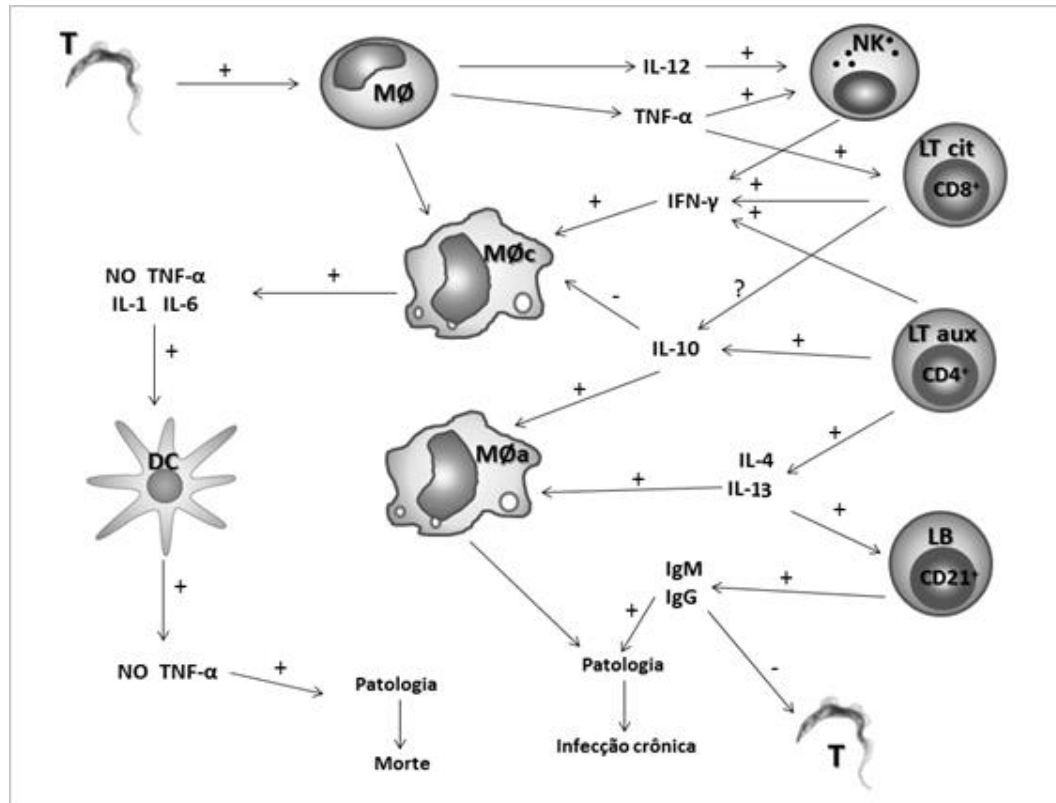


Figura 5. Visão simplificada dos mecanismos inatos e específicos nas infecções por tripanosomas. (+) regulação positiva, (-) regulação negativa, (?) não confirmado, (MØ) monócito/macrófago, (MØc), monócito/macrófago classicamente ativado, (MØa) monócito/macrófago alternativamente ativado, (NK) células *natural killer*, (LT aux) linfócitos T auxiliares, (LT cit) linfócitos T citotóxicos, (LB) linfócitos B, (DC) células dendríticas.

Fonte: Adaptado de Namangala et al. (2001) e Baral (2010).

Durante as infecções agudas, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune por LT contra o agente patogênico, caracterizado por uma proliferação rápida e funcional (citotoxicidade e produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2). No entanto, durante a infecção crônica, os LT, tanto LT CD4⁺ quanto LT CD8⁺, tornam-se progressivamente exaustos e gradualmente perdem a capacidade de montar uma resposta eficaz para a recuperação da infecção, bem como a sua funcionalidade.

Estudo desenvolvido por Naessens et al. (2002), em que comparou bovinos depletados para LT CD4⁺ e normais, foi observado nos animais com depleção LT CD4⁺ redução dos títulos de anticorpos, sugerindo que as respostas geradas durante a infecção por *T. congolense* são, na sua maioria, dependentes de LT. Entretanto nesse mesmo estudo, constatou-se que a subpopulação de LT CD8⁺ não foi influenciada para controlar a parasitemia nem anemia.

Segundo D'Leteren et al. (1998), os tripanossomas que são transmitidos pela mosca tsé-tsé, principalmente *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei*, liberam moléculas imunomoduladoras que deprimem as respostas dos LT no hospedeiro infectado. No modelo

murino, os extratos solúveis de *T. congolense* têm demonstrado um efeito supressivo, *in vitro*, através da indução de LT CD8⁺, pela segregação de IFN- γ ativando macrófagos e suprimindo a proliferação de LT (D'LETEREN et al., 1998).

A relação CD4⁺/CD8⁺ também é um parâmetro importante durante as infecções nas tripanossomíases. A relação tende a aumentar no início da infecção por *T. congolense* devido a alterações nas proporções de linfócitos principalmente com aumento de LB (ELLIS et al., 1987, HILL et al., 2005).

Foi observado que subpopulações de LT CD4⁺, denominadas T reguladoras (LT reg) detêm atividade importante no controle da resposta imune (SAKAGUCHI et al., 1995). Essas células apresentam função protetora em várias situações patológicas, que possuem o marcador de superfície CD25⁺, que expressam constitutivamente o receptor de cadeia da IL-2R α , e o repressor de transcrição FOXP3, sendo assim denominadas CD4⁺CD25⁺ (BODA et al., 2009; SAKAGUCHI et al., 1995).

A participação dos LT gama-delta (LT $\gamma\delta$) na resposta imune adquirida apresenta funções semelhantes ao LT CD4⁺ e CD8⁺ (TIZARD, 2012). Em resposta, elas produzem TNF- α , IL-1, IL-12 e IFN- γ , sugerindo serem capazes de promover a inflamação enquanto contribuem nas respostas imunes de bovinos, interligando as respostas imune e inata. Os LT $\gamma\delta$ foram denominados “não convencionais”, porque eles têm características tanto de resposta inata quanto adaptativa (GUZMAN et al., 2012). Flynn et al. (1994) aponta a presença significativa de T $\gamma\delta$ na pele e epitélios, sugerindo que, podem ser uma primeira linha de defesa para a imunidade de LT e que reconhecem as células alteradas por estímulo desfavorável incluindo agentes infecciosos, malignidade, substâncias tóxicas, radiação e choque térmico. Os LT $\gamma\delta$ apresentaram serem cruciais no controle da parasitemia contra *T. brucei* em humanos, pois secretam IFN- γ , importante citocina quem melhora a função das células citotóxicas (BODA et al., 2009). Dados apresentados também nesse estudo apontam que durante a infecção por *T. brucei* pode haver uma disfunção da resposta pelos LT, possivelmente devido à estimulação antigênica do sistema imunitário, a partir de novos variantes antigênicos de tripanosomas ou casos de maior suscetibilidade à infecção mais grave, resultando baixo número de linfócitos efetores e também de células de memória (BODA et al., 2009).

Nos animais tripanotolerantes, os LT CD8⁺ e LT- $\gamma\delta$ não contribuem para o controle da parasitemia. Este controle da parasitemia também é independente de LT CD4⁺ e/ou de anticorpos (NAESSENS et al., 2002). Isto sugere que a resposta imune inata pode ser melhor no controle da parasitemia, e independente das respostas adquiridas (HILL et al., 2005).

2.5.2.2 Resposta Humoral

A resposta imune predominante nas infecções por *T. vivax* durante a fase crônica é pela proliferação de LB e produção de anticorpos, devido à localização extracelular das formas tripomastigotas no hospedeiro vertebrado (TAYLOR, 1998). Embora os anticorpos específicos contra tripanosomas sejam produzidos na fase inicial da infecção, ainda é uma proporção significativa dos anticorpos, pois são poli-específicos e/ou auto-reativos (BARAL et al., 2010). A resposta de anticorpos do hospedeiro contra os tripanosomas pode ser evitada e até não ser eficiente em alguns casos, pois eles têm a capacidade de alterar a expressão de uma VSG para outra, resultando em mutação antigênica. As VSGs são novamente reconhecidas pelo sistema imune, e tal mecanismo de escape acaba por provocar ondas de alta e baixa parasitemia, sendo considerado o principal mecanismo impedindo a eliminação do parasito e estabelecendo uma infecção crônica (BARAL, 2010). Além disso, estes parasitos são capazes de internalizar os anticorpos que se ligaram à sua superfície (HILL et al., 2005).

Quanto aos antígenos não variantes, estes podem se diferir entre animais tripanotolerantes e suscetíveis, e provavelmente não estão envolvidos na destruição ou liberação dos parasitas, pois eles podem reduzir os efeitos tóxicos ou patogênicos dos próprios antígenos e isto poderia fornecer um tipo de resposta diminuindo os efeitos patológicos (HILL et al., 2005).

As imunoglobulinas M e G (IgM e IgG) específicas produzidas durante a infecção por *T. congolense* (primária ou secundária) podem ser protetores além de retirar complexos imunes e possivelmente neutralizar produtos do parasito (TAYLOR, 1998). Também na infecção por *T. congolense*, ocorre à ativação policlonal de LB, demonstrada pelo aumento no número destas células e da secreção de imunoglobulinas, principalmente IgM na fase aguda e IgG na fase crônica (NAESSENS et al., 2002). Na infecção por *T. brucei*, os LT pela produção de IFN- γ melhoram as respostas dos LB, mediando troca de classe de anticorpos (BARAL et al., 2010).

Segundo Naessens et al. (2002), nos animais suscetíveis nas infecções por *T. congolense*, a ativação celular parece ser auto controlada e a infecção pode resultar em uma diminuição significativa na população de LB e isso pode levar a incapacidade do hospedeiro em desenvolver proteção contra o parasito, devido à falta de uma resposta eficaz da LB de memória e, conseqüentemente baixa produção de anticorpos específicos. No entanto, estudos indicaram que bovinos mais resistentes podem desenvolver elevados níveis de anticorpos

neutralizantes contra os tripanosomas durante o primeiro pico de parasitemia do que animais suscetíveis (BARAL, 2010).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo consiste em exames diretos, com confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaços sanguíneos ou por meio de técnicas moleculares para a detecção de DNA/RNA de *T. vivax*, e em exames indiretos como testes sorológicos para observar a presença de títulos de anticorpos anti-*T. vivax*.

2.6.1 Testes Parasitológicos

A técnica do microhematócrito (MHCT), apresentado por Woo (1970) é uma das mais amplamente utilizadas entre os métodos parasitológicos, em que a motilidade dos tripomastigotas pode ser vista entre a camada de leucócitos e a de plasma. Esta técnica permite a detecção de tripanosomas de seis a dez dias. Porém, a técnica de *Buffy coat* (BCT) descrita por Murray (1977), oferece várias vantagens sobre outras técnicas convencionais utilizados para o diagnóstico da tripanossomíase (DESQUESNES; TRESSE, 1996; MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006). Esta técnica detectou 50% mais casos de infecção por tripanosoma em comparação ao MHCT (MURRAY, 1977).

Outra vantagem é a facilidade e rapidez do reconhecimento dos tripanosomas, tornando os exames muito menos cansativos especialmente quando se avalia um grande número de amostras em pouco tempo (MURRAY, 1977). Além disso, também permite a identificação de espécies de tripomastigotas, quando utilizado técnicas de biometria em conjunto (MAGONA et al., 2008). A desvantagem desta metodologia é que as amostras devem ser analisadas rapidamente após a colheita, pelo menos, dentro de quatro a seis horas. Caso contrário, o número de tripanosomas detectáveis na amostra reduz devido à diminuição de produtos metabólicos e lise das células (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009). Como também ocorrem flutuações da parasitemia, se torna difícil o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos em fases crônicas da doença (MURRAY, 1977). No entanto, ambas as técnicas discutidas exibem uma baixa sensibilidade quando aplicada durante a fase crônica da doença, e a sensibilidade diminui consideravelmente quando a parasitemia é inferior a 200 tripomastigotas/ml de sangue (DESQUESNES; TRESSE, 1996).

A BCT é uma importante ferramenta utilizada para avaliar a parasitemia em estudos experimentais pela infecção por *T. vivax* em bovinos (ADAMU et al., 2007) e para estudos epidemiológicos como os realizados por Batista et al. (2012) que avaliaram 158 vacas leiteiras e diagnosticada por BCT nos animais de três fazendas, com prevalências 13,3% a 46,6%, sendo associada diretamente com as alterações clínicas como febre e diminuição do volume globular, indicando animais em fase aguda da doença.

Magona et al. (2008) realizaram estudos epidemiológicos utilizando as técnicas BCT e MHCT em conjunto, para avaliar a positividade do rebanho e identificar as tripomastigotas, pois na Uganda, África haviam encontrado tripomastigotas de *T. congolense* nas amostras.

Em estudo soroepidemiológico realizado por Dayo et al. (2010) utilizaram a BCT como triagem para posterior diferenciação das espécies de *T. congolense* e *T. brucei* em bovinos na África. Foram avaliados 363 bovinos mestiços sendo monitorados mensalmente por mais de dois anos. A prevalência parasitológica estimado no início da pesquisa usando BCT foi de 7,54% e sorologia variando de 0,29% a 19,29%.

2.6.2 Testes Sorológicos

A ocorrência de doença crônica e assintomática em bovinos no Brasil dificulta a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos (VENTURA et al., 2001). Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos podem fornecer informações úteis complementares ao obtido pelos métodos parasitológicos, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por tripanosoma e avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde animal, produtividade e estimar o risco tripanossomíase (MATTIOLI et al., 2001).

As técnicas sorológicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*T. vivax*, atualmente são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção e são úteis para investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação da distribuição de *T. vivax* (MADRUGA et al., 2006).

Embora a presença de anticorpos não seja necessariamente sinônimo de uma infecção ativa, uma vez que essas moléculas persistem após a recuperação, as correlações positivas entre os resultados parasitológicos pelo BCT e a presença sorológica de anticorpos anti-tripanosoma, tal como avaliado pelos diferentes sistemas de testes sorológicos, têm sido relatadas (MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006). Os testes sorológicos RIFI e

ELISA para anticorpos circulantes vêm sendo intensamente utilizados, mostrando boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010).

Dellafosse et al. (2006) estudaram a prevalência em uma região da África sem a presença do vetor cíclico, e pelo teste de ELISA, observaram que 43,2% (403/933) dos bovinos eram positivos para anticorpos anti- *T.vivax*, mesmo com BCT menor que 0,2%. A elevada prevalência mesmo na ausência de tsé-tsé ocorreu devido à transmissão mecânica pela presença de tabanídeos, e o clima favorável ao aumento da população desses vetores, constatando-se alta mortalidade devido à infecção. Também se verificou que o hematócrito nos animais positivos era significativamente menor que nos não infectados. Foi observado que as infecções persistentes podem também ocorrer como resultado da utilização maciça de drogas tripanocidas, com a subdosagem frequente.

Segundo estudos realizados por Cadioli et al. (2012), 98,36% (599/609) das amostras de soro colhidas de vacas em uma fazenda em Lins-SP, apresentaram títulos positivos para IgG anti-*T. vivax* pelo teste de ELISA e menos de 1% foi positivo para o MHCT. A maioria dos animais apresentaram sinais clínicos e foram registrados 31 óbitos. A alta frequência de anticorpos ocorreu devido à transmissão eficiente de hemoparasito (vetores mecânicos) mesmo com o rebanho em bom estado nutricional, e que os animais suscetíveis apresentavam doença grave e de alta mortalidade.

Por outro lado, Cuglovici et al., (2010) realizou um levantamento epidemiológico na região de Igarapé-MG, utilizando testes parasitológicos (MHCT), molecular como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorológico (RIFI). No teste de RIFI para observar a soroprevalência e verificou que, no período de setembro de 2007 a fevereiro de 2009, houve aumento na soropositividade de 7,4% para 48%, indicando novos casos no rebanho. Além disso, de fevereiro a outubro de 2008 a titulação de anticorpos IgG anti-*T. vivax* aumentou, sugerindo aumento do caso de infecção ativa. Entretanto, a maioria dos animais, no final do experimento, apresentou títulos de anticorpos mais baixos e MHCT negativo, indicando o estabelecimento da fase crônica da infecção.

2.6.3 Testes Moleculares

2.6.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos sorológicos são úteis em estudos epidemiológicos, porém, estes usualmente não distinguem o curso da infecção, devido à avidez de IgG em infecções recentes

ou progressos nas tripanossomíases, e a sua detecção pela PCR, abre novas perspectivas neste campo (VENTURA et al., 2001). A PCR teve uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico molecular de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (DESQUESNES; DÁVILA, 2002). Para a identificação do *T. vivax*, são utilizados *primers* direcionados no gene do mini-exon (*splicedleader*) e na região intergênica, com amplificação produto de 210pb (VENTURA et al., 2001).

Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia, além do uso em larga escala seja difícil a campo, uma vez exige alto custo em laboratórios equipados, pessoal treinado e reagentes adequados (DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

2.6.3.2 Imunofenotipagem

Desde 1985, a atenção tem sido focada na identificação e caracterização funcional de populações de leucócitos de bovinos, em particular, as diferentes populações de LT e os seus marcadores de superfície. Esta atenção também foi dirigida à organização, polimorfismo e imunologia do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) bovina, com seus antígenos leucocitários bovinos (PASTORET et al., 1998).

Atualmente, o aparecimento e avanço de técnicas de biologia molecular têm proporcionado rapidez e especificidade de diagnóstico imunológico. Uma ferramenta que permite avaliar os mecanismos como o funcionamento celular de leucócitos é a citometria de fluxo (SHAPIRO, 2003).

A citometria de fluxo é uma metodologia analítica que permite a rápida medição da emissão de luz dispersa e de fluorescência produzida por células iluminadas e marcadas adequadamente e são capazes de separar fisicamente os subconjuntos de células com base nas suas características de citometria de triagem (celulares) (SHAPIRO, 2003). Nas infecções, a citometria de fluxo serve não apenas para detecção direta dos protozoários, fungos ou bactérias, mas também identificar os tipos de leucócitos presentes na resposta imunológica com base das suas características de marcação celular obtidas pela citometria de fluxo (SHAPIRO, 2003).

A análise imunofenotípica por meio da citometria de fluxo consiste em utilizar anticorpos monoclonais (MoAb) que apresentam especificidade para moléculas expressas na superfície leucocitária designadas internacionalmente como CD (*cluster of differentiation*). Os MoAb reagem especificamente com distintos CDs e assim, pode-se ter uma avaliação da

expressão dos diferentes marcadores de superfície leucocitária ao longo do processo infeccioso e, conseqüentemente, da funcionalidade efetora do sistema imune (SATHLER-AVELAR et al., 2003; SHAPIRO, 2003).

O perfil imunofenotípico de leucócitos periféricos tem fornecido importantes resultados para o esclarecimento da patogênese das tripanossomíases (HILL et al., 2005; BODA et al., 2006). Padrões imunofenotípicos de linfócitos foram observados durante o curso de infecção pela tripanossomíase africana bovina causada pelo *T. congolense* (HILL et al., 2005), doença de Chagas causada por *T. cruzi* (SATHLER-AVELAR et al., 2003) e na tripanossomíase africana humana (HAT) causada pelo *T. brucei* (BODA et al., 2009) e atualmente fornecem uma melhor explicação para a doença para o entendimento da biologia do parasito e da sua relação com o hospedeiro durante a infecção e compreensão dos mecanismos de parasita-hospedeiro e controle da doença.

A expressão destes antígenos de diferenciação leucocitárias permitiu a identificação das principais populações de monócitos e linfócitos, os quais, em alguns casos, têm propriedades funcionais distintas.

Segundo Buza et al. (2008), para a detecção dos macrófagos e monócitos ativados, o marcador das subpopulações de células mononucleares do sangue periférico bovino foi caracterizado por CD14⁺ correspondendo nos adultos em torno de 5 a 20% dos macrófagos/monócitos totais. Investigações revelam que os ligantes conhecidos como *toll-like receptor* TLR7/8 são ativadores potentes de células imunes de ruminantes e que a indução ótima de IL-12 e IFN- γ por estes ligantes requerem a presença de CD14⁺. Estes resultados justificam o possível papel dos TLR7/8 ligantes como adjuvantes de vacinas em bovinos (BUZA et al., 2008).

As células NK bovinas foram recentemente identificadas e caracterizadas como um subconjunto dos leucócitos que expressam o receptor natural, NKp46 citotóxico (CD335⁺), que produzem IFN- γ e destroem células alvo (BASTOS et al., 2008). Ambas as funções efectoras e regulatórias que podem afetar tanto a resposta imune inata quanto adquirida e nos bovinos representam 2-10% das subpopulações de células (BASTOS et al., 2008).

Os leucócitos da classe II de MHC restritas aos LT são CD4⁺ (LT auxiliares) que compreendem cerca de 8-31% dos linfócitos periféricos dos bovinos e que proporcionam auxílio às respostas dos LB e da classe I do MHC restringido os LT CD8⁺ (LT citotóxicos) que se encontram em torno de 10-30% dos linfócitos bovinos (TIZARD, 2012).

As populações de LB são caracterizadas por CD21⁺, nos bovinos são encontrados em média 16-21% dos linfócitos circulantes e estão diretamente relacionadas à produção de anticorpos (PASTORET et al., 1998; TIZARD, 2012).

Bittar et al. (2004), avaliaram o perfil imunofenotípico de linfócitos de bovinos adultos (*Bos taurus*) das raças Holandesa, Hereford e Pardo-Suíça, observando variações de LT CD4⁺ (23,8 a 39,8%), LT CD8⁺ (17,2 a 28,1%) e LB CD21⁺ (12,2 a 18,8%) entre as raças. Sugeriram que a imunofenotipagem de linfócitos pode influenciar o padrão de resposta imune.

Alguns dos LT com marcadores CD25⁺ possuem função de ativação celular, e pertencem também as populações de subconjunto T reg que expressam receptor IL-2R α e representam 2 a 10% das LT CD4⁺ periféricas (SAKAGUCHI et al., 1995).

Os anticorpos monoclonais (MoAb) conhecidos como “*workshop cluster 1*” (WC1), é uma glicoproteína tipo 1 encontrada em cerca de 90% de LT $\gamma\delta$ de bovinos e esta proporção pode chegar a 40% nos bezerros, sendo encontrando de 5-44% LT $\gamma\delta$ em sangue periférico (TIZARD, 2012). Os LT $\gamma\delta$ (WC1⁺) de bovinos são encontrados em grande número na pele, membranas mucosas e intra-epiteliais do intestino e embora seu ligante natural seja ainda desconhecido, a WC1⁺ provavelmente se liga a estruturas presente em macrófagos e células dendríticas (PASTORET et al., 1998; TIZARD, 2012).

2.7 TRATAMENTO

O tratamento nas infecções por *T. vivax* no Brasil é limitado (OSÓSRIO et al., 2008). No país, o aceturato de diminazene a única droga com ação tripanocida liberada pelo Ministério da Agricultura para uso no território brasileiro, porém a literatura já aponta relatos de resistência do parasito a campo (BATISTA et al., 2007, 2008, 2012).

Batista et al. (2007) relata que nove vacas apresentaram sinais nervosos decorrentes de infecção por *T. vivax* e vieram a óbito, mesmo após o tratamento com aceturato de diminazene. Batista et al. (2008), observaram resistência, apresentando recidiva clínica mesmo após aplicações de aceturato de diminazene. Segundo Cadioli et al. (2012), oito vacas que apresentaram anemia, aborto, apatia, perda de peso, diarreia e diminuição na produção de leite foram tratados com aceturato de diminazene e pareceram ter cura clínica, sem parasitemia detectável de 20 dias a dois meses. No entanto, nova parasitemia foi observada e estes animais tornaram-se clinicamente doentes. Os tratamentos subsequentes com uma dose

mais elevada não teve efeito sobre as tripomastigotas de *T. vivax* e, pelo menos, três vacas vieram a óbito após tratamentos correntes, indicando resistência do *T. vivax* a esta droga.

Segundo Bengaly et al. (2001), foi relatado que animais tratados com aceturato de diminazene apresentaram queda dos títulos de anticorpos entre 60 a 100 dias após tratamento, porém, um animal apresentou aumento nos títulos de anticorpos, além da presença do DNA do tripanosoma confirmada pela PCR 40 dias após o tratamento. É ideal que se faça um tratamento precoce com aceturato de diminazene, principalmente quando a parasitemia ainda está alta, pois podem evitar que os animais sofram com os sinais clínicos e piores quadros de anemia, além de contribuir reduzindo a transmissão mecânica por moscas hematófagas (BENGALY et al., 2001).

A nova droga denominada cloreto de isometamídio (nome comercial Trypamidium®) pode diminuir a severidade da doença, aumentando significativamente o volume globular dos animais e diminuindo a incidência da doença, mesmo que não evite novas infecções (CADIOLI et al., 2012). Entretanto esta droga ainda não está liberada para utilização no território brasileiro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil imunofenotípico dos leucócitos periféricos totais de bovinos infectados experimentalmente por tripomastigotas de *T. vivax*.
- Determinar o perfil hematológico de bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax*.
- Determinar a cinética de produção de anticorpos anti-*T. vivax* IgG e IgM específicos
- Avaliar o efeito da infecção experimental de bovinos com tripomastigotas de *T. vivax* sobre a condição física, leucócitos circulantes no sangue periférico e resposta imunológica celular e humoral
- Avaliar a cinética da parasitemia de bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* e correlaciona-lo com os achados hematológicos, imunofenotípicos e sorológicos.

4 MATERIAL DE MÉTODOS

4.1 NORMAS ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba sob o número de processo 001/2013 (ANEXO A)

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Dez bovinos, machos, mestiços girolando, hípidos, com idade entre 12-18 meses, peso variando de 180 a 200kg, e negativos para *T. vivax* nos exames sorológicos com 4 dosagens consecutivas de anticorpos IgG anti-*T. vivax* (RIFI<40), e também 4 testes parasitológicos consecutivos (direto, MHCT e BCT) e moleculares (PCR) (Figura 6). Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário da Universidade de Uberaba, alimentados com forragem verde (*Panicum maximum* e feno) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

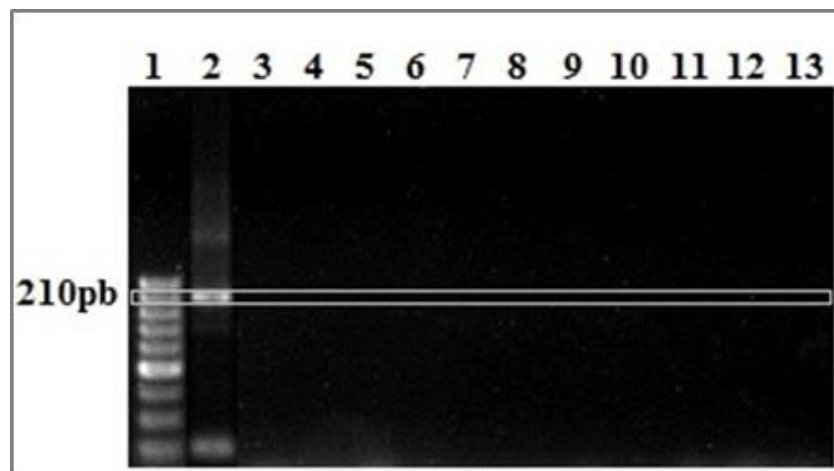


Figura 6. Gel de Eletroforese (agarose 2%, corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml), fotografados sob luz ultravioleta a partir de resultados parasitológicos de amostras de DNA extraídas de sangue periférico no dia 0 (anterior à inoculação experimental). (1) Marcador molecular DNA Ladder (Invitrogen®); (2) controle positivo amostra de *T. vivax* de um isolado de Aquidauana-MS cedida pelo Professor Fernando Paiva do amplificada em 210pb; (3) controle negativo; (4-8) amostras do GC; (9-13) amostras do GI.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC) e infectado (GI). Os animais do GC (n=5) foram inoculados por via SC e IM com 2mL de solução fisiológica estéril e os do GI (n=5) foram inoculados por via SC e IM 2mL de sangue de ovino inoculado experimentalmente contendo 2×10^6 /mL tripomastigotas de *T. vivax*

(amostra de um isolado do surto de Aquidauana-MS, cedida pelo Prof. Dr. Fernando Paiva da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul) contagem de acordo com o método de Brener (1961).

Os animais durante o período experimental (90 dias) foram acompanhados em relação aos sinais clínicos, parasitologia, hematologia, sorologia e imunofenotipagem de leucócitos periféricos. Os animais de cada grupo ficaram em piquetes separados e foram tratados com antiparasitário mosquicida de aplicação *pour on* a base de Diazinon 30% e Clorpirifós 10% (EXPERT[®] MSD Saúde Animal) nos animais no dia 0, 18^o, 45^o e 75^o dpi.

4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Para a avaliação parasitológica, hemograma e imunofenotipagem, foram colhidos de cada animal, 4 mL de sangue por venopunção da jugular, utilizando agulhas 25 x 0,8mm (BD[®]) em tubos *vacutainer* (Vacuette[®]) contendo ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA) a 10%. A coleta de sangue entre os grupos ocorreu separadamente.

As amostras para avaliação da parasitemia e hemograma foram conservadas em temperatura ambiente (TA) e foram processadas em até 2 horas após a coleta.

Para a realização do perfil imunofenotípico, amostras de sangue foram mantidas a TA até no máximo por 5 horas após coleta para realização da imunofenotipagem.

Para RIFI, foram colhidos, 10 mL de sangue da veia jugular, utilizando agulhas 25x0,8mm (BD[®]) em tubos *vacutainer* (Vacuette[®]) sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas (Fanem Baby[®] I 206 BL) em velocidade de 2000 g a TA por 10 minutos para obtenção dos soros que foram transferidos e acondicionados em tubos de polipropileno de 2,5 mL (Eppendorf[®]), devidamente identificados e mantidos na temperatura de -20°C até a realização da imunofluorescência indireta.

4.4 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA

As avaliações parasitológicas e clínicas foram feitas diariamente até o 21^o dia e quinzenalmente até o 90^o dia pós-inoculação (dpi).

A parasitemia foi avaliada pelo BCT para detectar a presença da forma tripomastigota (MURRAY, 1977). A técnica consistiu no preenchimento de tubo capilar de vidro para cada amostra de sangue com anticoagulante, centrifugação a 10000g (Celm[®] MH) por cinco

minutos. Após, foi realizado o esfregaço a partir da amostra obtida de um capilar, quebrando o tubo na fração entre a camada líquida (plasma) e a camada leucocitária. Posteriormente o esfregaço foi corado com Panótico Rápido (Laborclin[®]). A partir dos esfregaços sanguíneos corados, a estrutura geral das formas tripomastigotas pode ser observada em aumento 1000x por microscopia óptica (NIKON[®] Eclipse E200).

A determinação quantitativa de tripomastigotas pelo exame direto do sangue periférico foi realizada pelo método de Brener (1961), realizando a contagem de tripanosomas no sangue periférico dos animais positivos no teste do BCT. Foram pipetados 5µL de sangue e colocados entre lâmina e lamínula (22x22mm). Foi realizada contagem dos tripomastigotas em 50 campos microscópicos em aumento de 400x (Nikon[®] Eclipse E200). O número de parasitos observados é multiplicado 80, obtendo-se o número de tripanosomas em 5µL de sangue. O resultado foi transformado em tripomastigotas/µL).

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

As avaliações parasitológicas e clínicas foram feitas diariamente até o 21º dia e quinzenalmente até o 90º dia pós-inoculação (dpi). As avaliações clínicas foram realizadas observando temperatura retal, consciência, frequência cardíaca e frequência respiratória, seguindo metodologia segundo Radostits et al. (2007).

Para avaliação do escore da condição corporal (ECC) foi empregado metodologia descrita por Maciel (2006), que utiliza a escala mais difundida e abrange escores de 1 a 5 (Quadro 1).

ESCORE DA CONDIÇÃO CORPORAL	
1: Caquético	Cavidade profunda na região de inserção da cauda, costelas e ossos da pélvis (bacia) pronunciados e facilmente palpáveis, ausência de tecido gorduroso na pélvis e lombo.
2: Magro	Cavidade rasa ao redor da inserção da cauda, pélvis palpável, costelas mais posteriores arredondadas e depressão visível na área do lombo.
3: Intermediário	Presença de gordura na inserção da cauda, camada de tecido sobre a parte superior das costelas, sentidas sob pressão, e ligeira depressão no lombo.
4: Gordo	Pregas de gordura visíveis na inserção da cauda, costelas mais posteriores não palpáveis e ausência de depressão no lombo.
5: Muito Gordo	Inserção da cauda imersa em camada espessa de tecido adiposo, ossos pélvicos não mais palpáveis, costelas posteriores cobertas por tecido gorduroso.

Quadro 1. Escore da condição corporal de bovinos com aptidão leiteira.

Fonte: Maciel (2006).

4.6 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Os hemogramas foram realizados no dia 0 e nos momentos 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 18°, 21°, 24°, 27°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90° dpi.

As determinações de contagem de hemácias, leucócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e plaquetas, bem como os valores dos índices hematimétricos como o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) foram obtidos pelo analisador hematológico automático veterinário (ABC VET - Horiba® ABX Diagnostics).

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados pelo Panótico Rápido (Laborclin®) para a realização da contagem diferencial dos leucócitos em aumento de 1000x por microscópio óptico (Nikon® Eclipse E200).

4.7 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS PERIFÉRICOS

Amostras de sangue com EDTA para análise imunofenotípica foram colhidas no dia 0 e 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90° dpi, e processados imediatamente após a coleta. Os ensaios de citometria de fluxo para a imunofenotipagem dos linfócitos periféricos foram realizados conforme o protocolo (Bittar et al., 2004) com modificações.

Foram utilizados MoAb (Serotec®) (Tabela 1), que apresentam especificidade para marcadores de superfície leucocitária (CD ou WC).

Tabela 1 – Anticorpos anti-bovino monoclonais produzidos em ratos (Serotec®) marcados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), e ficoeritrina (PE) utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e marcadores de ativação.

Anticorpo	Código	Clone	Diluição em PBS
Anti-CD14 (FITC)	MCA2678F	CC-G33	1:50
Anti-CD335 (PE)	MCA2365PE	AKS1	1:25
Anti-CD21 (FITC)	MCA1424F	CC21	1:50
Anti-CD4 (FITC)	MCA1653F	CC8	1:50
Anti-CD8 (FITC)	MCA837F	CC63	1:50
Anti-CD25 (FITC)	MCA2430F	IL-A111	1:50
Anti-WC1 ($\gamma\delta$) (FITC)	MCA838F	CC15	1:50

Para cada animal, foram separados sete tubos em poliestireno de 5ml (BD Falcon™) e identificados como: Branco (sem marcador); MoAb CD14; CD4; CD8; CD21-CD335; CD25

e WC1. CD21 e CD335 foram colocados num mesmo tubo por serem marcações fluorescentes diferentes.

Em cada tubo correspondente, foram dispensados 10 µL da diluição com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaH_2PO_4 40mM e NaCl 150mM pH 7,5), 50 µL de sangue total, e depois incubados 30 minutos à TA em repouso. Todas as preparações celulares foram submetidas à lise de eritrócitos, acrescentando 3 mL de solução de lise (2,85% de citrato de sódio; 30% de dietilenoglicol; 54% de formaldeído P.A.; 0,04% de heparina 100.000 USP – pH 7,85) diluída 1:10 em água destilada para selecionar apenas os leucócitos (Figura 7).

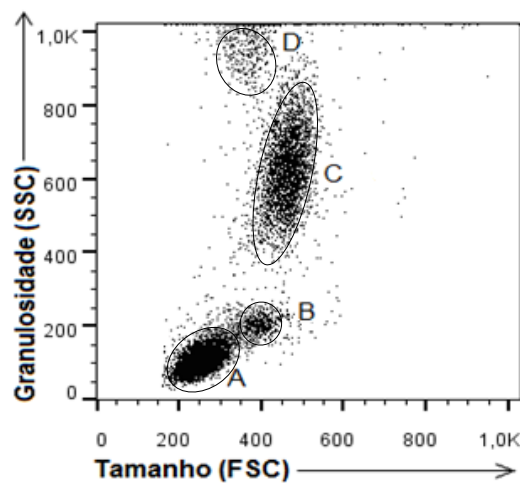


Figura 7. População de leucócitos periféricos bovinos, após a lise do sangue periférico com solução de lise. As populações estão selecionadas (círculos). (A) Linfócitos; (B) Monócitos; (C) Neutrófilos; (D) Basófilos e eosinófilos.

As amostras foram agitadas em vortex (Evlab[®] Ev019) e centrifugadas em TA por 7 minutos a 1400 g (Fanem Baby[®] I 206 BL). Os leucócitos totais foram lavados em PBS (3 mL), e uma nova agitação em vortex e centrifugação em TA foi realizada. Posteriormente, as amostras foram fixadas com 200µL de formol 4% e mantidas a 4° C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, sendo que o tempo máximo para a coleta dos dados foi sempre inferior às 24h.

A aquisição e análise das amostras foram realizadas no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickson[®]) acoplado a um computador Macintosh (Apple[®]), localizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Ao processar as amostras no citômetro de fluxo, foram adquiridos 20000 eventos e os dados coletados foram registrados e salvos pelo software CellQuest[®] versão para Macintosh. A análise dos dados adquiridos foi realizada pelo software FlowJo[®]. A análise

consistiu na seleção da população celular de interesse baseada nas propriedades de dispersão da luz frontal (FSC) e lateral (SSC), selecionando com base no conjunto de diferenciação (CD). A população de linfócitos foi selecionada pelo *dot plot* FSC *versus* SSC (Figura 8A), e a população de monócitos pelo dot plot SSC *versus* FL1(CD14) (Figura 8B).

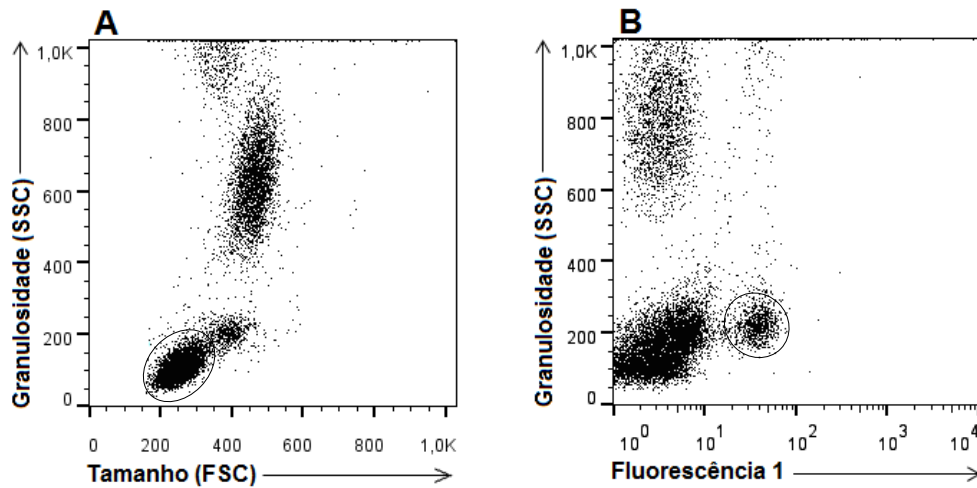


Figura 8. Representação gráfica da população leucocitária de linfócitos (A) baseado no tamanho versus granulosidade (círculo) e de monócitos (B) baseado no tamanho versus fluorescência (círculo).

As frequências de subpopulações de linfócitos celulares fluorescentes foram analisadas nas modalidades FL1 versus FL2, dentro da população selecionada (Figura 9).

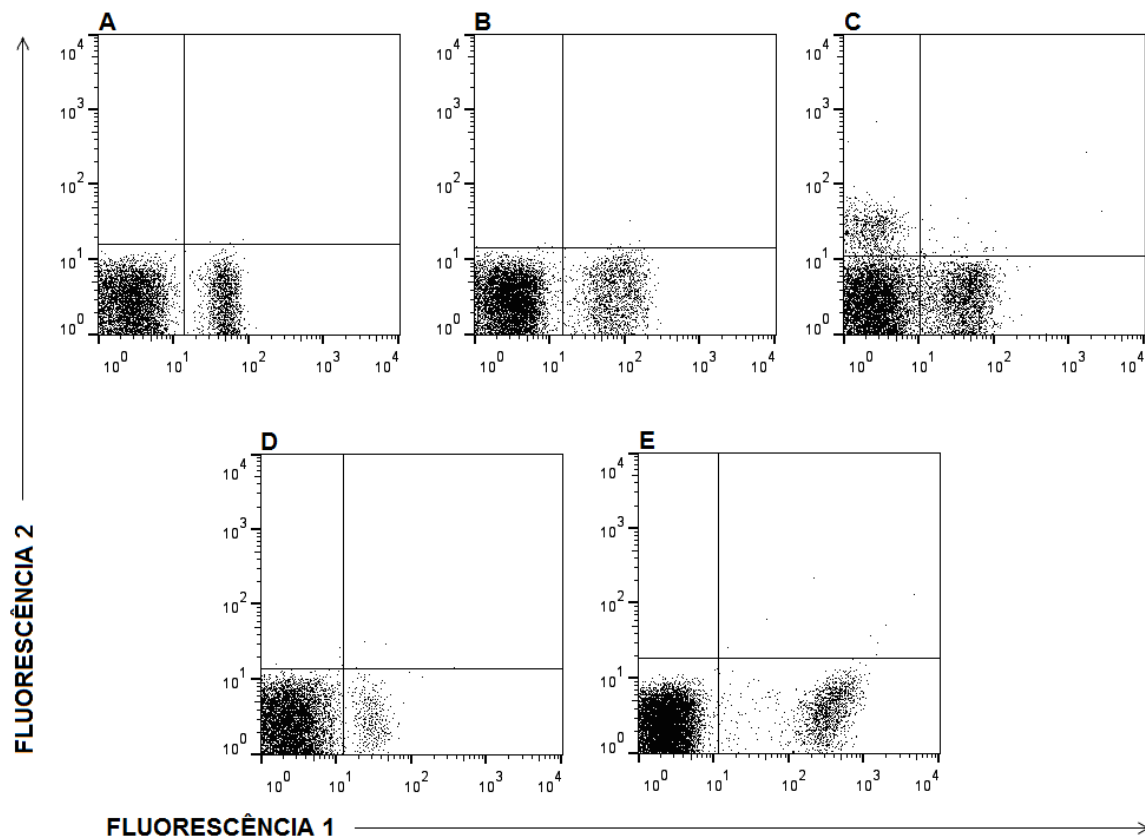


Figura 9. Representação gráfica da população de linfócitos bovinos marcados com o anticorpo monoclonal anti CD4⁺ FL1(A); CD8⁺ FL1 (B); CD21⁺ FL1 CD335⁺ FL2 (C); CD25⁺ FL2 (D) e WC1⁺ FL2 (E).

4.8 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA

Foi realizado teste de RIFI para detectar anticorpos (IgM e IgG) anti-*T. vivax*, foi realizado conforme metodologia descrita por Frange (2013). Amostras de soro bovino foram diluídas (1:40 até 1:10240) e distribuídas em 20µL nas limitações da lâminas contendo o antígeno de *T. vivax* de acordo com cada amostra de soro a ser testada e incubadas por 30 minutos à 37°C. Após, foram feitos três lavagens da lâmina com PBS por cinco minutos cada, uma lavagem com água destilada por cinco minutos e após secagem a TA. Foi adicionado para cada amostra 20µL de conjugado anti-IgG (Sigma® F7887) ou anti-IgM (AbD Serotec® AAI19F) marcado com Isotiocianato de Fluoresceína na diluição 1:200 em PBS e Azul de Evans (1:10) com anticorpo IgG ou IgM bovino e incubados novamente por 30 minutos à 37°C. Após foi feito o mesmo processo das lavagens.

Soros de bovinos infectados com *T. vivax* foram utilizados como controles positivos e soro de bovinos negativos na diluição 1:40 e solução de PBS 1:10 foram utilizados como controle negativo. Posteriormente, para a leitura das lâminas, estas foram acrescentados 10 µL

de glicerina tamponada (Glicerina 90%, Na₂CO₃ 0,5mM, NaHCO₃ 0,5mM pH 8,0-8,5) para cada amostra e coberta por uma lamínula. As lâminas foram lidas em microscópio epifluorescente (Nikon[®] E200) com aumento de 400x e foram avaliadas todas as diluições encontradas nos animais do GI e GC (CUGLOVICI et al, 2010).

4.9 TRATAMENTO

Durante o período experimental, caso os bovinos apresentassem anemia (abaixo de 22%) e alterações clínicas como debilidade, apatia, ataxia, sonolência, seriam tratados com aceturato de diminazene (Ganaseg plus[®] Novartis), conforme recomendação do fabricante.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas das variações de cada grupo durante o período experimental foram utilizados teste ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey (testes paramétricos) e teste de Friedmann seguido do teste de Dunns (testes não paramétricos). Para comparações entre os grupos durante o período experimental foi utilizado teste de Mann-Whitney. Para correlação dos resultados versus parasitemia foi utilizado teste de Pearson (teste paramétrico). Foi utilizado programa GraphPad Prism 5.0. O nível de significância foi de P<0,05. Os resultados estão expressos como média±desvio padrão.

5 RESULTADOS

Devido a grande quantidade de informações e resultados obtidos neste estudo, optou-se por apresentá-los em tópicos para facilitar a compreensão e interpretação dos resultados. No texto serão apresentadas todas as diferenças estatísticas observadas, porém nas figuras somente as mais relevantes, em que as diferenças entre grupos estão expressas por [\downarrow] e as intra grupos por [*].

5.1 PERFIL PARASITÁRIO

As formas tripomastigotas de *T. vivax* começaram a ser observadas somente nos esfregaços sanguíneos (BCT) dos animais do GI a partir do 11º dia (Figura 10).

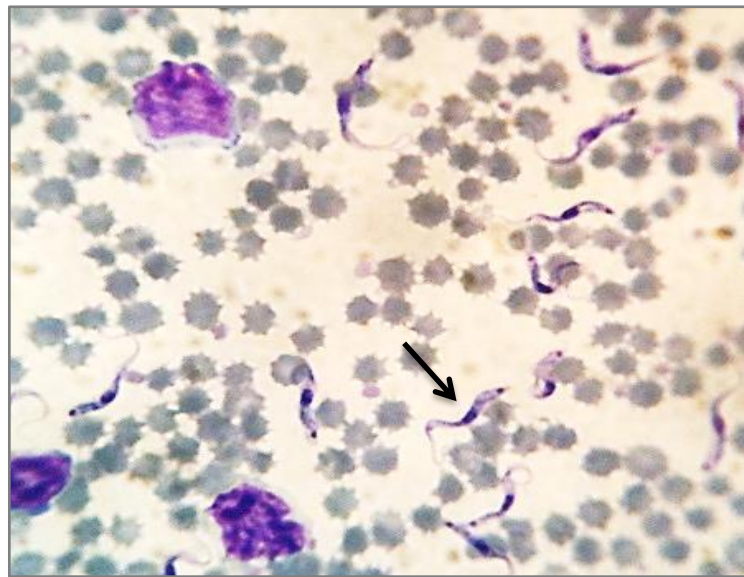


Figura 10. Avaliação por BCT das formas tripomastigotas (seta) de *T. vivax* em esfregaço sanguíneo de bovinos do GI corado pelo Panótico Rápido (aumento 1000x).

O período pré-patente do GI variou de 11 a 16 dias ($13,8 \pm 1,78$) e a parasitemia variou de 0 a $4,8 \times 10^7$ ($1,6 \times 10^3 \pm 1071,5$) tripomastigotas/mL de sangue. O perfil da parasitemia dos animais do GI, bem como a média da parasitemia está apresentado na Figura 11.

Elevação significativa da média da parasitemia foi observada nos 17º dpi ($1,4 \times 10^4 \pm 7555,7$) e 18º dpi ($2,1 \times 10^4 \pm 18104,9$) ($P < 0,05$).

Devido à debilidade e/ou anemia dos animais houve necessidade de tratamento com aceturato de diminazene (3,5 mg/kg) em todos os animais do GI no 18º dpi (T₁) e no 45º dpi (T₂). Após a intervenção observou-se ausência de parasitemia no 19º dpi (Figura 11).

A recorrência das formas tripomastigotas foi observada nos 20º dpi (20% dos animais $0,2 \times 10^3 \pm 522,3$), 21º dpi (20%, $0,9 \times 10^3 \pm 2146,6$), 24º dpi (20% dos animais, $0,1 \times 10^3 \pm 379,2$), 27º (20% dos animais, $1,1 \times 10^3 \pm 2504,4$), 45º (80% dos animais, $0,8 \times 10^3 \pm 963,9$), 75º (40% dos animais, $4,9 \times 10^3 \pm 10681,5$) e 90º dpi (20% dos animais, $3,2 \times 10^3 \pm 7,16$).

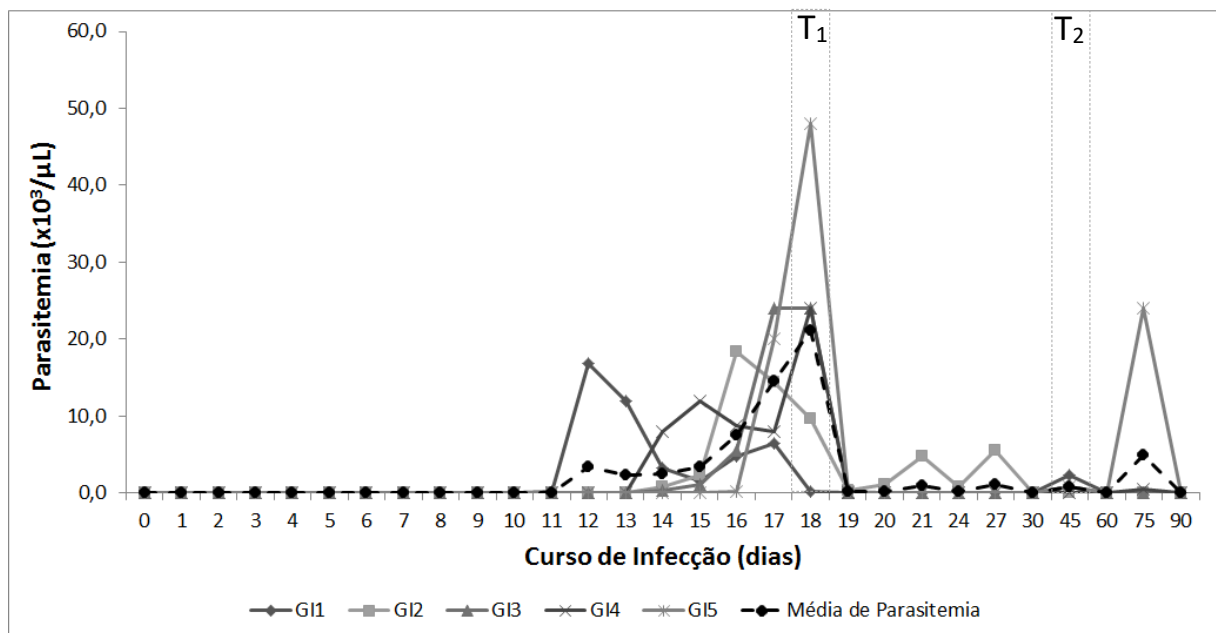


Figura 11. Análise da atividade parasitêmica durante a infecção experimental *T. vivax* nos bovinos do GI. GI1, GI2, GI3, GI4 e GI5 referem-se ao perfil parasitário de cada animal do GI e a linha tracejada refere-se à média da parasitemia. As seleções retangulares (T₁ e T₂), indicam os momentos de tratamento com aceturato de diminazene.

5.2 PERFIL CLÍNICO

As avaliações de temperatura retal realizadas durante todo o período experimental no GC variou de 37,2° C a 39,9° C ($38,6^{\circ} \text{C} \pm 0,46^{\circ} \text{C}$) e no GI de 36,9° C a 39,9° C ($38,5^{\circ} \text{C} \pm 0,49^{\circ} \text{C}$). Ao avaliar o GI e o GC no dia 0, ambos apresentaram média de temperatura retal estatisticamente superiores ao 1º, 2º e 3º dpi ($P < 0,05$). Constatou-se elevação da média nos animais do GI a partir do 11º dpi, até o 18º dpi, sendo que no 15º dpi a média foi estatisticamente superior ao GC (Figura 12).

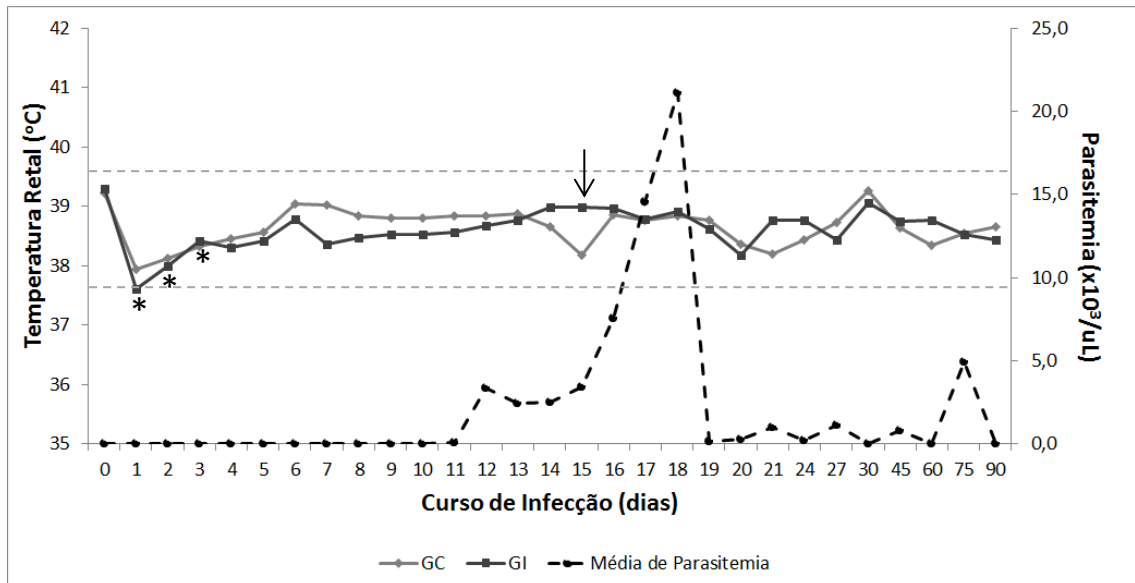


Figura 12. Médias de temperatura retal dos grupos controle (GC) e infectado (GI) durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade de temperatura retal segundo Radostits et al. (2007).

A média da frequência cardíaca do GC variou de 53,4 a 73,2 batimentos cardíacos por minuto ($65,6 \pm 4,6$) e no GI de 56,0 a 78,4 ($67,8 \pm 5,3$). A frequência respiratória do GC variou de 20,0 a 37,6 ($24,0 \pm 3,5$) e no GI de 20,0 a 34,4 ($24,2 \pm 3,0$). Não houve diferença estatística desses parâmetros em comparação aos GC e GI e ao período de infecção ($P > 0,05$).

O escore da condição corporal (ECC) dos animais do GC variou de 3 a 4 ($3,2 \pm 0,22$) e do GI variou de 1 a 3 ($2,6 \pm 0,27$). No GI, a diminuição do ECC coincidiu com o aumento da parasitemia (12-18° dpi). Elevação do ECC foi notada nos GC e GI a partir do 45° dpi. O GC apresentou aumento significativo do ECC no 75° dpi em comparação ao GI ($P < 0,05$) (Figura 13).

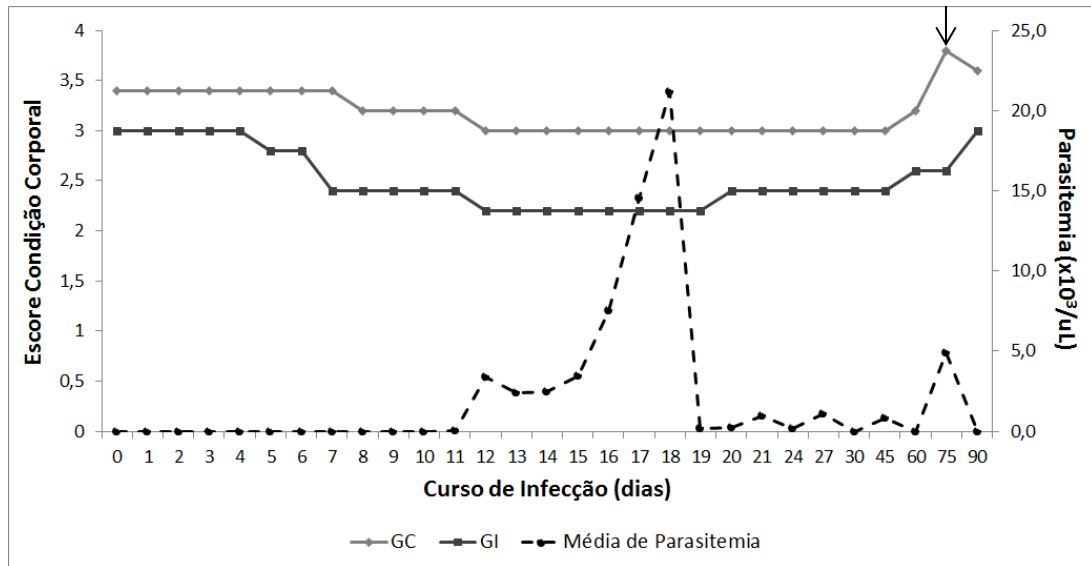


Figura 13. Médias de ECC dos grupo controle (GC) e infectado (GI) durante a infecção experimental por *T. vivax*. 1. caquético 2. magro 3. intermediário. 4. Gordo.

As alterações clínicas (Tabela 2) iniciaram-se no 6º dpi com 40% dos animais apresentando apatia, 20% mucosas pálidas e secreção ocular. Nos 15º dpi e 18º dpi (pico de parasitemia), 100% dos animais apresentaram apatia, mucosas pálidas, secreção nasal e ocular.

Tabela 2. Frequência dos sinais clínicos relacionados com a atividade parasitêmica durante a infecção experimental *T. vivax* em bovinos do GI.

Dias pós-inoculação	Apatia (%)	Mucosas pálidas (%)	Secreção ocular (%)	Secreção nasal (%)	Opacidade de córnea (%)	Diarreia (%)	Claudicação (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
3º	0	0	0	0	0	0	0
6º	40	20	20	0	0	0	0
9º	60	40	40	40	0	0	0
12º	60	80	60	60	0	20	20
15º	100	100	100	100	40	20	20
18º	100	100	100	100	60	20	20
21º	100	100	80	60	100	0	0
24º	40	80	80	20	100	0	0
27º	40	60	60	20	100	0	20
30º	0	60	20	20	100	0	20
45º	20	40	20	0	100	0	20
60º	0	20	20	0	100	0	20
75º	20	60	80	20	100	0	0
90º	40	0	60	0	100	0	0

A partir do 21º dpi, 100% dos animais apresentaram opacidade de córnea (Figura 14).



Figura 14. Opacidade de córnea (seta) em bovino infectado experimentalmente por *T. vivax*.

5.3 PERFIL HEMATOLÓGICO

Em relação a hematologia, as amplitudes máxima e mínima dos parâmetros eritrocitários dos GC e GI observadas durante o período experimental, bem como as médias e desvios padrão estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil eritrocitário e plaquetário dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*.

Parâmetros	Grupo Controle		Grupo Infectado		Valores de Referência ⁽¹⁾
	Amplitude Mín a Máx	Média±dp	Amplitude Mín a Máx	Média±dp	
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	7,8 a 8,5	8,1±0,20	5,9 a 7,2	6,5±0,48	6,63 - 8,81
Hemoglobina (g/dl)	8,8 a 9,6	9,3±0,20	7,5 a 9,4	8,4±0,66	8,69 - 12,29
Hematócrito (%)	21,4 a 36,5	28,1±4,34	17,3 a 32,4	25,1±3,20	26 - 38
VCM (fl)	32,0 a 35,6	33,4±0,86	34,6 a 39,6	38,3±1,18	38,8 - 43,4
CHCM (%)	32,0 a 35,6	33,4±0,86	32,2 a 35,7	33,5±0,85	31,6 - 33,6
HCM (pg)	10,8 a 12,2	11,5±0,32	12,3 a 14,0	12,8±0,41	10,2 - 14,6
Plaquetas (/mm ³)	341800 a 759600	543373,3±121483,05	129200 a 804000	484720±195330,9	100000 - 800000

⁽¹⁾ Radostits et al. (2007).

A média da contagem de hemácias do GI apresentou redução significativa nos 3°, 15°, 18°, 21°, 24°, 27°, 30°, 75°, 90° dpi em comparação ao GC ($P < 0,05$) (Figura 15).

No 18° dpi ($5,9 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mm}^3$) e 21° dpi ($5,9 \pm 0,5 \times 10^6/\text{mm}^3$) o GI apresentou redução significativa da média da contagem de hemácias em relação ao 0 ($7,0 \pm 0,9/\text{mm}^3$), 9° ($7,1 \pm 0,4/\text{mm}^3$), 12° dpi ($7,2 \pm 0,4/\text{mm}^3$) ($P < 0,05$). Os animais do GI apresentaram aumento significativo no 60° dpi ($7,1 \pm 0,8/\text{mm}^3$), em comparação aos dias 18, 21 e 75 ($P < 0,05$). No 75° dpi notou-se redução estatística de hemácias ($5,9 \pm 0,7 \times 10^6/\text{mm}^3$) em relação ao 0, 9°, 12° dpi ($P < 0,05$).

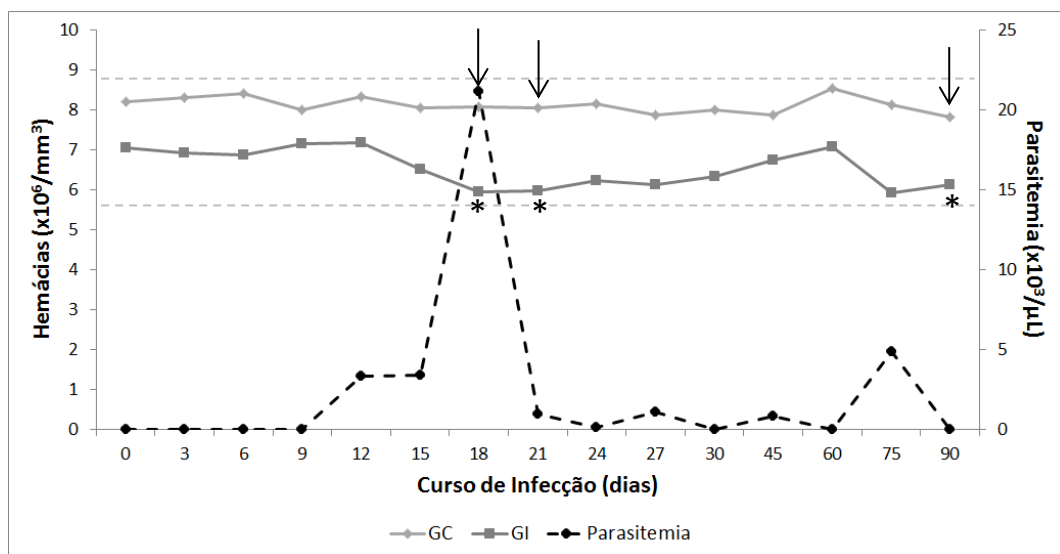


Figura 15. Médias da contagem de hemácias dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

A média do teor de hemoglobina do GI apresentou redução significativa no 18° dpi em comparação ao GC ($P < 0,05$) (Figura 16).

O GI apresentou redução significativa no 18° ($7,56 \pm 1,04\text{g/dL}$), 21° ($7,58 \pm 0,70 \times 10\text{g/dL}$) e 27° dpi ($7,5 \pm 0,29\text{g/dL}$) em comparação com o 0 ($9,4 \pm 1,0\text{g/dL}$), 9° ($9,24 \pm 0,75\text{g/dL}$) e 12° dpi ($9,16 \pm 0,72\text{g/dL}$) ($P < 0,05$). No 60° dpi ($8,98 \pm 1,15\text{g/dL}$), apresentaram elevação significativa em comparação aos dias 18, 21 e 27 ($P < 0,05$). No 75° dpi notou-se redução estatística na concentração de hemoglobina ($7,76 \pm 1,15\text{g/dL}$) em relação ao 12° dpi ($P < 0,05$).

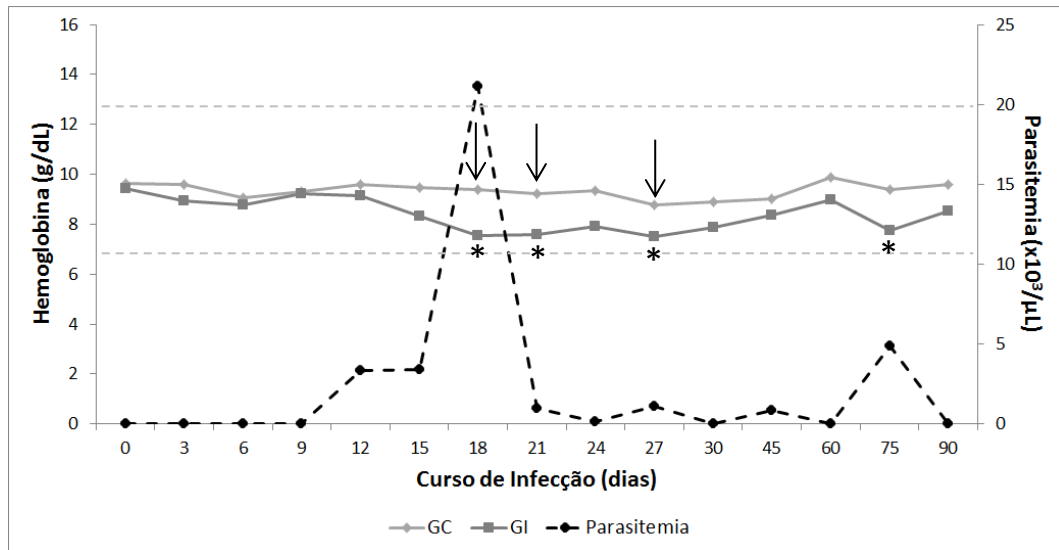


Figura 16. Médias do teor de hemoglobina dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

Ao avaliar o hematócrito, GI apresentou redução significativa no 18° e 75° dpi em comparação ao GC ($P < 0,05$) (Figura 17).

O GI apresentou redução significativa no 18° ($22,6 \pm 3,1\%$), 21° ($22,9 \pm 2,16\%$) e 75° dpi ($22,7 \pm 3,9\%$) em comparação ao 0 ($27,9 \pm 3,8\%$), 9° ($27,8 \pm 2,7\%$) e 12° dpi ($27,6 \pm 2,3\%$) ($P < 0,05$).

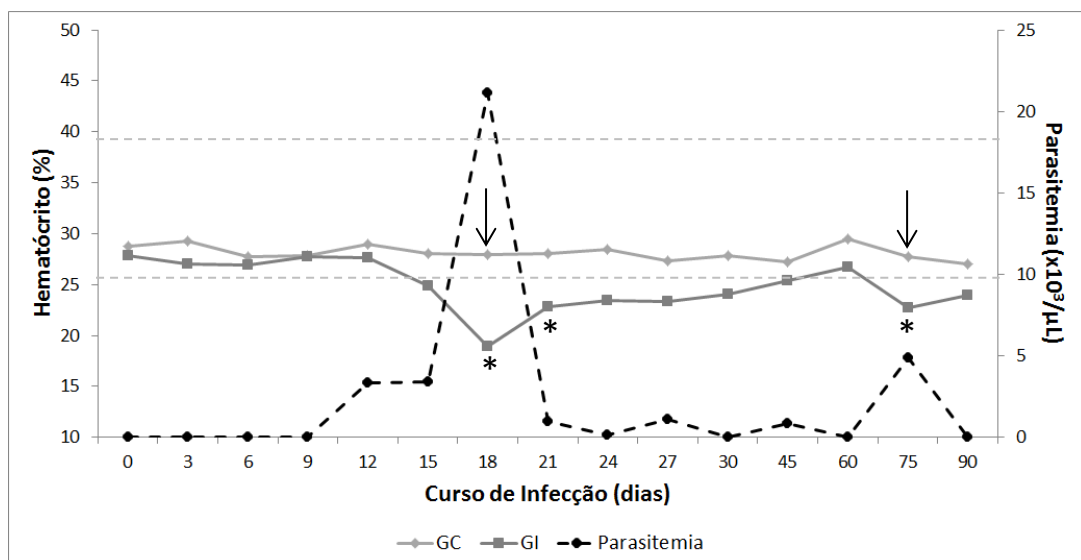


Figura 17. Médias do hematócrito dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

As médias do VCM entre os GI e GC não apresentaram diferença estatística durante o período experimental ($P>0,05$). Entretanto, ao avaliar as médias do GI, o 18º dpi ($37,8\pm 3,2$ fl) observou-se redução significativa em relação ao 0 ($39,6\pm 2,7$ fl) e 90º ($39,5\pm 5,1$ fl) dpi ($P<0,05$) (Figura 18).

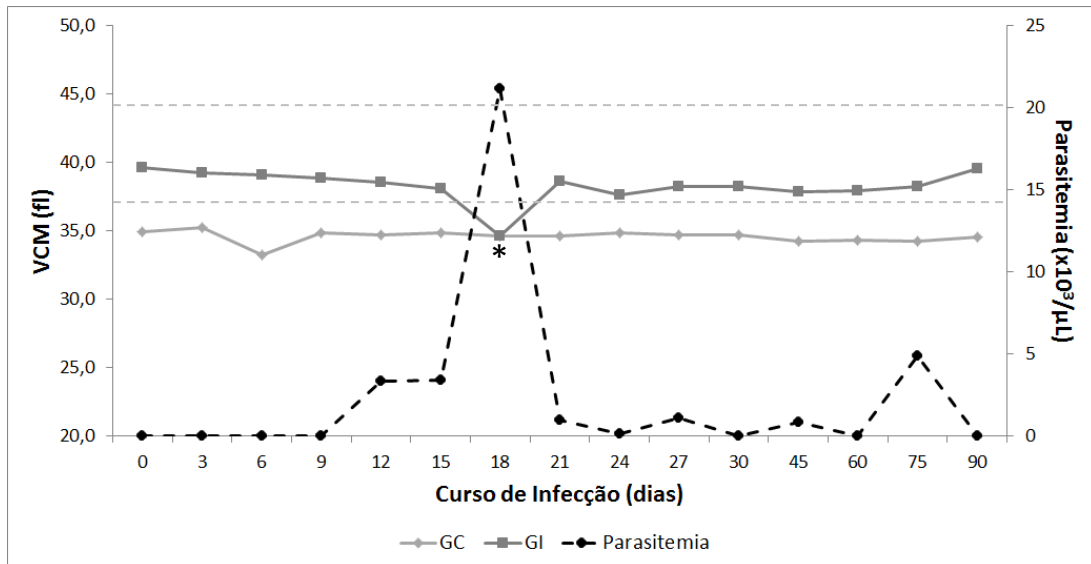


Figura 18. Médias do VCM dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

As médias de CHCM entre os GI e GC não diferiram estatisticamente durante o período experimental ($P<0,05$). Porém, ao avaliar as médias do GI, pôde-se observar aumento significativo no 90º dpi ($35,7\pm 1,1\%$) em comparação ao 6º ($32,6\pm 0,7\%$), 27º ($32,2\pm 1,2\%$) e 30º dpi ($32,7\pm 1,0\%$) ($P<0,05$) (Figura 19).

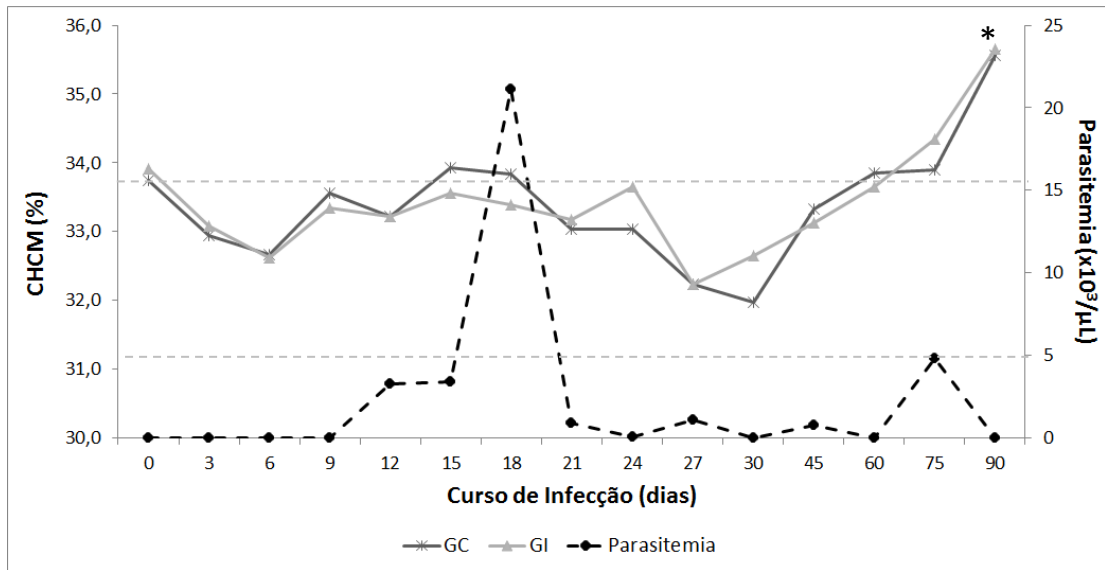


Figura 19. Médias do CHCM dos bovinos dos grupos controle (CC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

Ao avaliar as médias de HCM do GI, foi observado aumentos significativos no 0, 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 18°, 21°, 24°, 30°, 75° e 90° dpi em comparação ao GC ($P < 0,05$). Com exceção do dia 0 ($13,4 \pm 0,7 \text{pg}$), o GI apresentou aumento significativo da média de HCM no 90° dpi ($14,0 \pm 1,5 \text{pg}$) em relação a todos os dias do experimento ($P < 0,05$) (Figura 20).

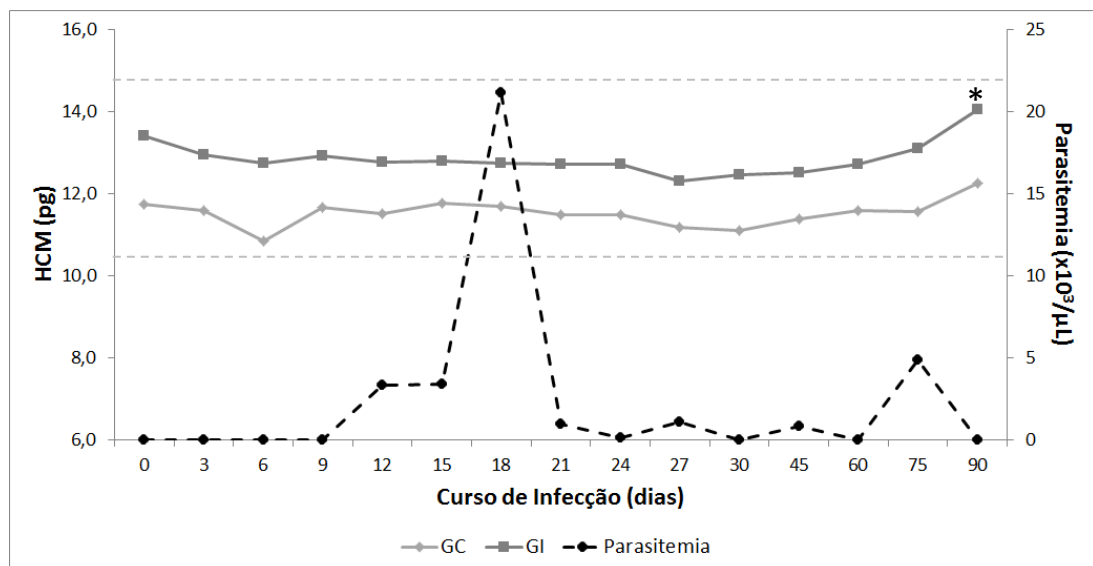


Figura 20. Médias de HCM dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante o período experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

A anemia somente foi observada nos animais do GI a partir do 15º dpi. Entre os 15º-18º dpi, 40% dos animais apresentaram anemia caracterizada por microcitose e normocrômica. Nos 21º dpi e 24º dpi, observou-se microcitose em 60% e 40% dos animais, respectivamente. A microcitose foi constatada em 80% dos animais nos dias 27º e 30º dpi. Entre o 18º dpi e 24º dpi, 20% dos animais apresentaram anemia normocítica normocrômica e nos dias 75º e 90º dpi respectivamente, 20% e 40% dos animais apresentaram anemia normocítica normocrômica (Figura 21).

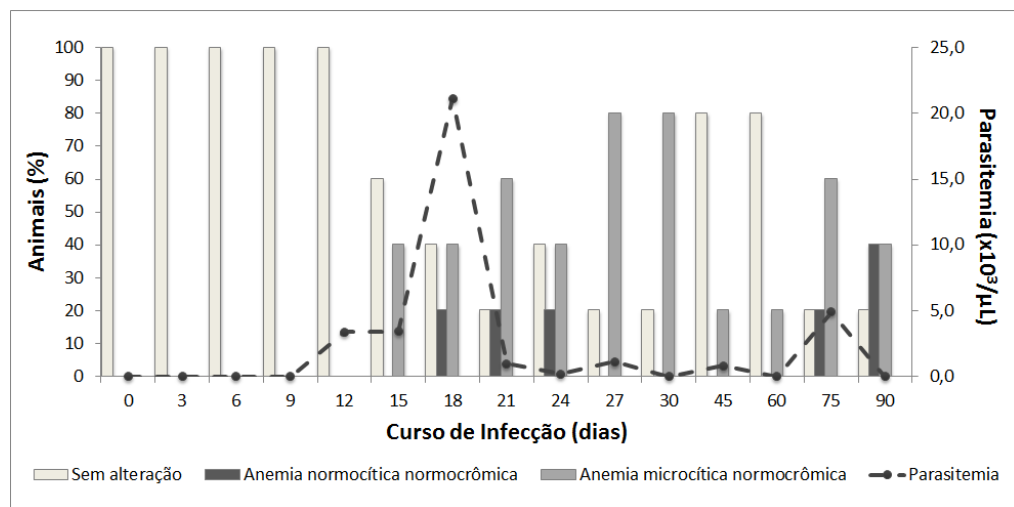


Figura 21. Classificação das anemias dos bovinos do GI, durante a infecção experimental por *T. vivax*.

Em relação a média da contagem de plaquetas, o GI apresentou redução significativa nos 18º, 45º e 75º dpi em comparação ao GC ($P < 0,05$).

No 18º dpi ($129.200 \pm 109.529,4/\text{mm}^3$) e 24º dpi ($214.000 \pm 128.134,6/\text{mm}^3$) o GI apresentou redução significativa da média em relação ao 3º ($690.600 \pm 274.111,8/\text{mm}^3$), 6º ($804.000 \pm 233.025,8/\text{mm}^3$), 9º (\pm/mm^3) e 12º dpi ($671.200 \pm 219.523,8/\text{mm}^3$) ($P < 0,05$). No 75º dpi ($229.600 \pm 146.358,5/\text{mm}^3$) notou-se redução estatística de plaquetas em relação ao 3º, 6º, e 9º dpi ($P < 0,05$) (Figura 22).

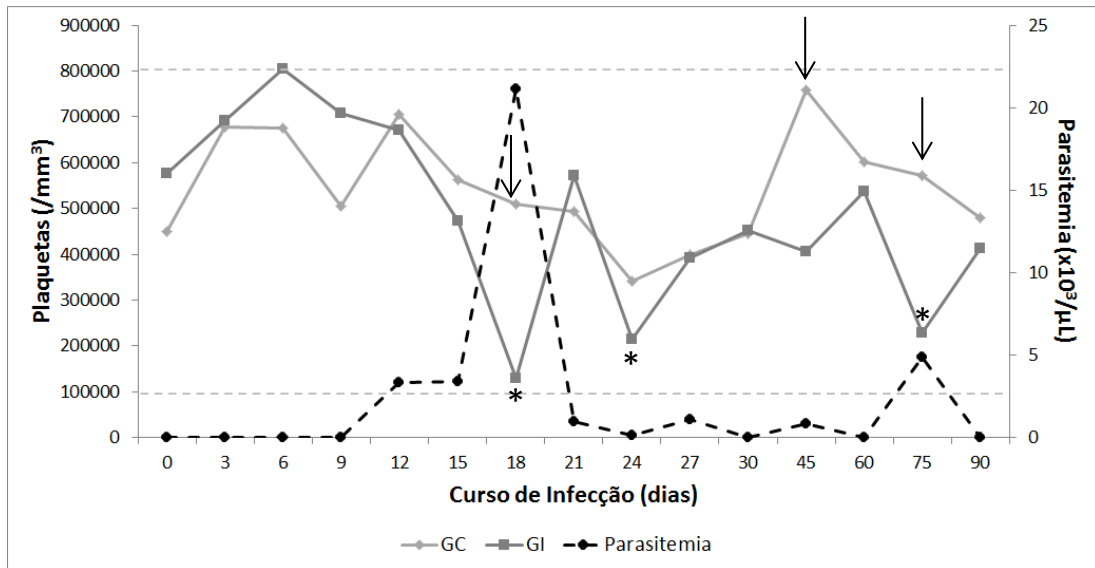


Figura 22. Médias de contagem de plaquetas dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

As amplitudes máxima e mínima, médias e desvios padrão dos parâmetros leucocitários dos GC e GI observadas durante o período experimental, estão apresentadas pela Tabela 4.

Tabela 4. Perfil leucocitário dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*.

Parâmetros	Grupo Controle		Grupo Infectado		Valores de Referência ⁽¹⁾
	Amplitude Mín a Máx	Média±dp	Amplitude Mín a Máx	Média±dp Mín a Máx	
Leucócitos (/mm ³)	9400 a 12440	10712±953,84	7300 a 17740	12986,7±2747,2	4000 -12000
Neutrófilos (/mm ³)	1546,8 a 3806,6	2239,2±581,53	823,2 a 5765,8	2581,1±1242,3	600 - 4000
Linfócitos (/mm ³)	6407,2 a 9892,4	7967,4±778,9	5585,0 a 12474,0	9718,3±1811,3	2500-7500
Monócitos (/mm ³)	81,2 a 375,4	227,5±95,2	48,4 a 959,8	313,5±230,5	25 - 840
Eosinófilos (/mm ³)	33,6 a 543,4	254,6±166,3	97,4 a 545,4	342,7±233,7	0 - 2400
Basófilos (/mm ³)	0 a 77,2	23,0±21,8	0 a 146,6	28,3±37,7	0-200

⁽¹⁾ Radostits et al. (2007).

A média da contagem total de leucócitos dos GC e GI não diferiu estatisticamente durante o período experimental ($P>0,05$). Porém aumento significativo de leucócitos foi notado no 6° ($17740\pm6846,4/\text{mm}^3$) e 30° dpi ($16500\pm10114,1/\text{mm}^3$) em relação aos 15° ($8680\pm1123,4/\text{mm}^3$) e 18° dpi ($7300\pm2623,4/\text{mm}^3$) ($P<0,05$) (Figura 23).

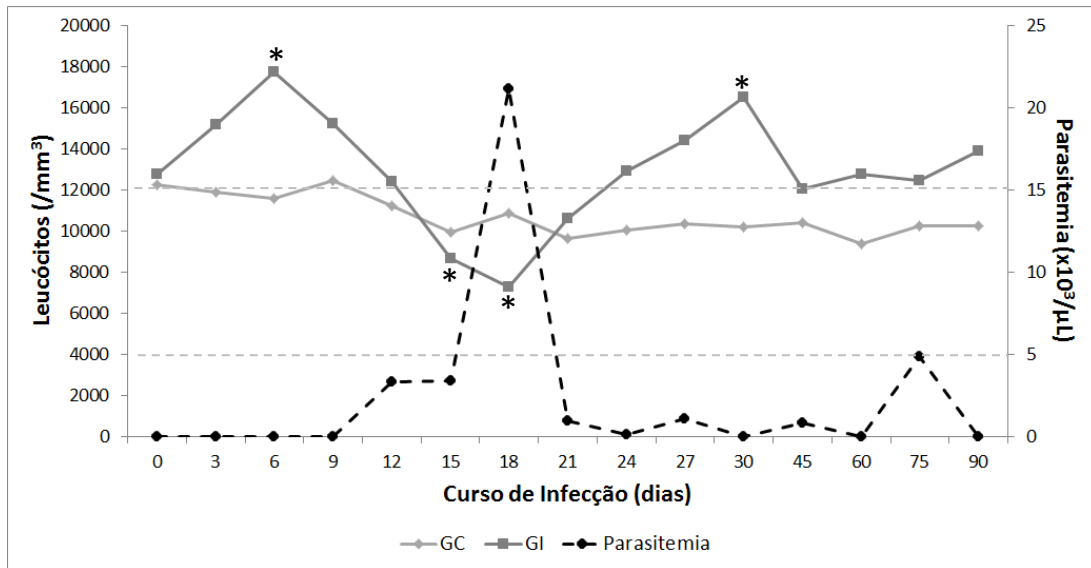


Figura 23. Médias de contagem de leucócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

A média da contagem de neutrófilos não apresentou diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$), porém, ao avaliar o GI durante o período experimental, foi constatado aumento significativo no 6º dpi ($5765,8 \pm 2551,4/\text{mm}^3$) em comparação ao 0 ($1505,2 \pm 707,5/\text{mm}^3$), 15º ($1578,8 \pm 937,7/\text{mm}^3$), 18º ($1420,8 \pm 957,9/\text{mm}^3$), 21º ($823,2 \pm 844,07/\text{mm}^3$), 24º ($1875,4 \pm 1233,4/\text{mm}^3$), 60º ($2266,6 \pm 1461,2/\text{mm}^3$), 75º ($2042,2 \pm 1187,6/\text{mm}^3$) e 90º dpi ($2156,6 \pm 1218,27/\text{mm}^3$) ($P < 0,05$) (Figura 24).

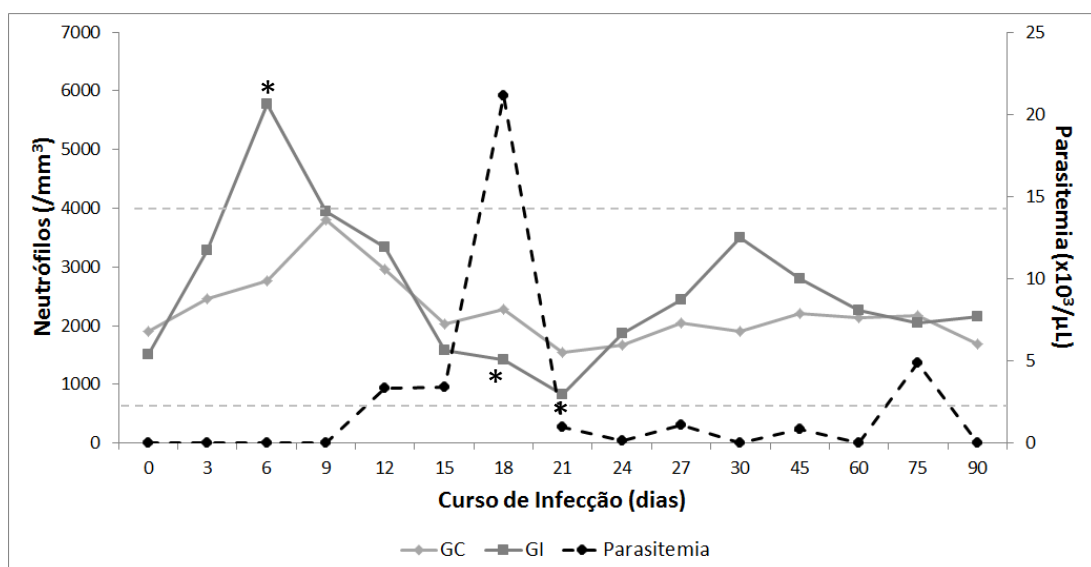


Figura 24. Médias de contagem de neutrófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

A média da contagem de linfócitos nos GC e GI não apresentaram diferença estatística durante o período experimental ($P>0,05$).

Entretanto, ao avaliar o GI, foi constatado maior redução no 18º dpi ($5585\pm 2816,6/\text{mm}^3$) e aumento no 30º dpi ($12474\pm 7523,1/\text{mm}^3$), sendo ambos estatisticamente significativos ($P<0,05$) (Figura 25).

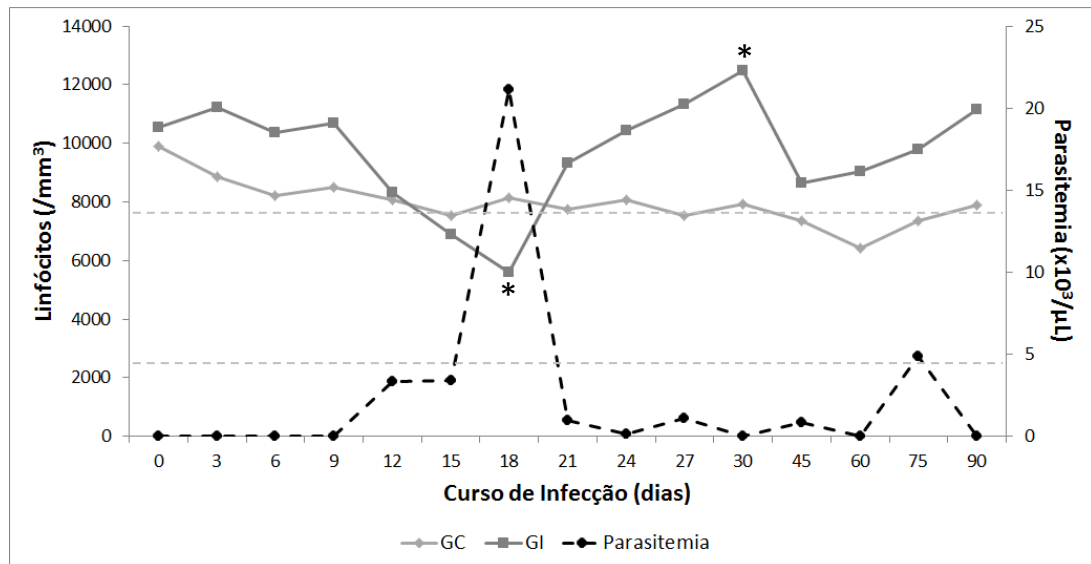


Figura 25. Médias de contagem de linfócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

A média de monócitos do GI apresentou aumento significativo no 6º dpi ($959,8\pm 1016,9/\text{mm}^3$) e redução significativa no 75º dpi ($48,4\pm 53,3/\text{mm}^3$) em comparação ao GC ($P<0,05$). Diferença estatística significativa foi observada no GI nos dias 6 e 75dpi ($P<0,05$) (Figura 26).

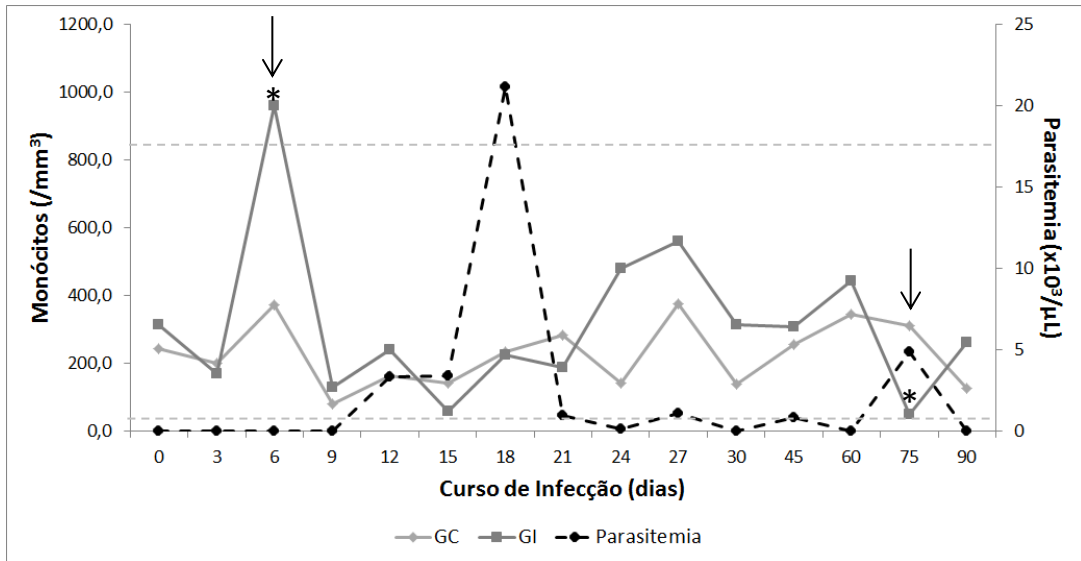


Figura 26. Médias de contagem de monócitos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

As médias das contagens absolutas de eosinófilos (Figura 27) e basófilos (Figura 28) entre os grupos durante o período experimental não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

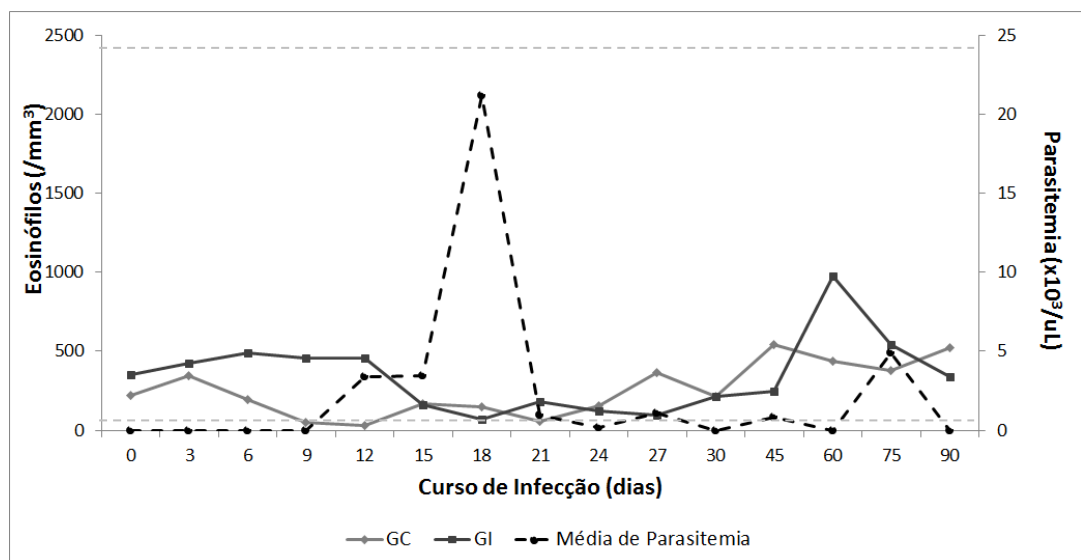


Figura 27. Médias de contagem de eosinófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

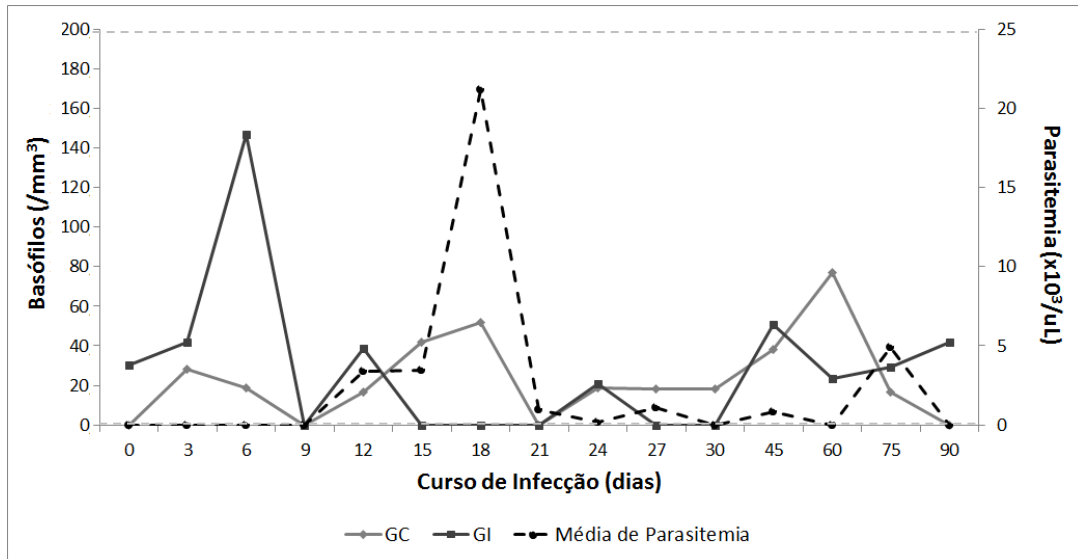


Figura 28. Médias de contagem de basófilos dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Radostits et al. (2007).

5.4 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO

5.4.1 Células envolvidas na resposta imune inata

As amplitudes máxima e mínima, média e desvio padrão dos parâmetros imunofenotípicos referentes à resposta inata dos grupos observada durante o período experimental, estão apresentados pela Tabela 5.

Tabela 5. Perfil imunofenotípico das células da resposta imune inata dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*.

População (%)	Grupo Controle		Grupo Infectado		Valores de Referência
	Amplitude	Média±dp	Amplitude	Média±dp	
	Mín a Máx		Mín a Máx		
CD14 ⁺	3,6 a 6,2	4,8±0,88	3,1 a 7,3	5,0±1,31	5 a 20 ⁽¹⁾
CD335 ⁺	1,7 a 4,4	3,2±0,74	1,4 a 3,5	2,5±0,64	2 a 10 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Buza et al. (2008). ⁽²⁾ Bastos et al. (2008).

O percentual médio monócitos/macrófagos ativados (CD14⁺), no GI, apresentou aumento significativo no 18º e 21º dpi em relação ao GC (P<0,05).

No GI, no 18º dpi (7,3±3,4%) pode-se notar aumento estatístico significativo de células CD14⁺ em comparação ao 6º dpi (3,1±0,5%) (P<0,05) (Figura 29).

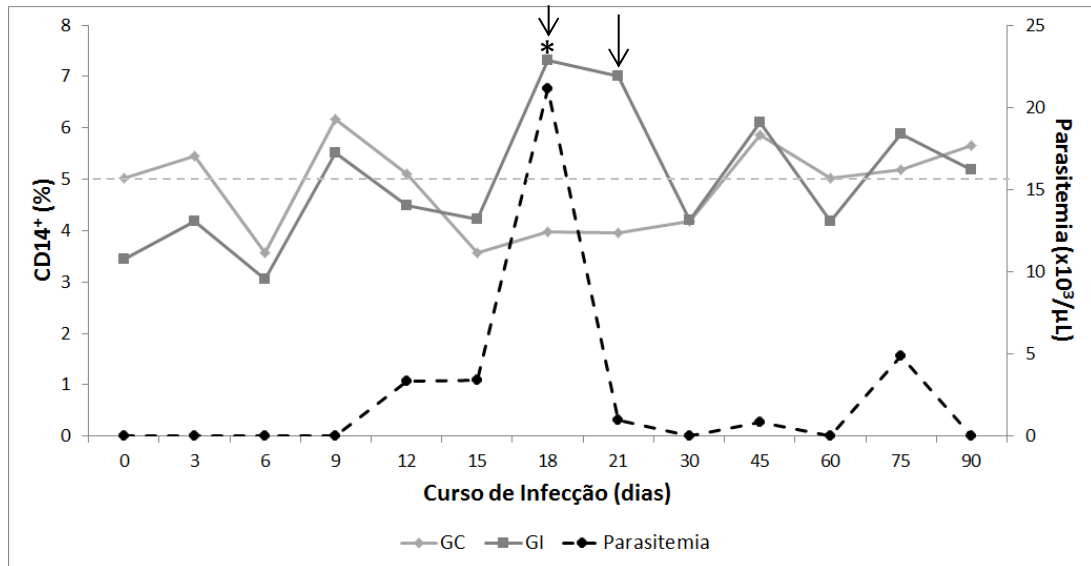


Figura 29. Médias dos monócitos/macrófagos ativados (CD14⁺) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo de normalidade, segundo Buza et al. (2008).

As médias de células NK (CD335⁺) entre os GI e GC não diferiram estatisticamente durante o período experimental ($P > 0,05$), porém ao avaliar as variações do GI, pôde-se observar redução significativa ($1,4 \pm 1,1\%$) no 9º dpi e elevação significativa ($3,5 \pm 0,6\%$) no 21º dpi ($P < 0,05$) (Figura 30).

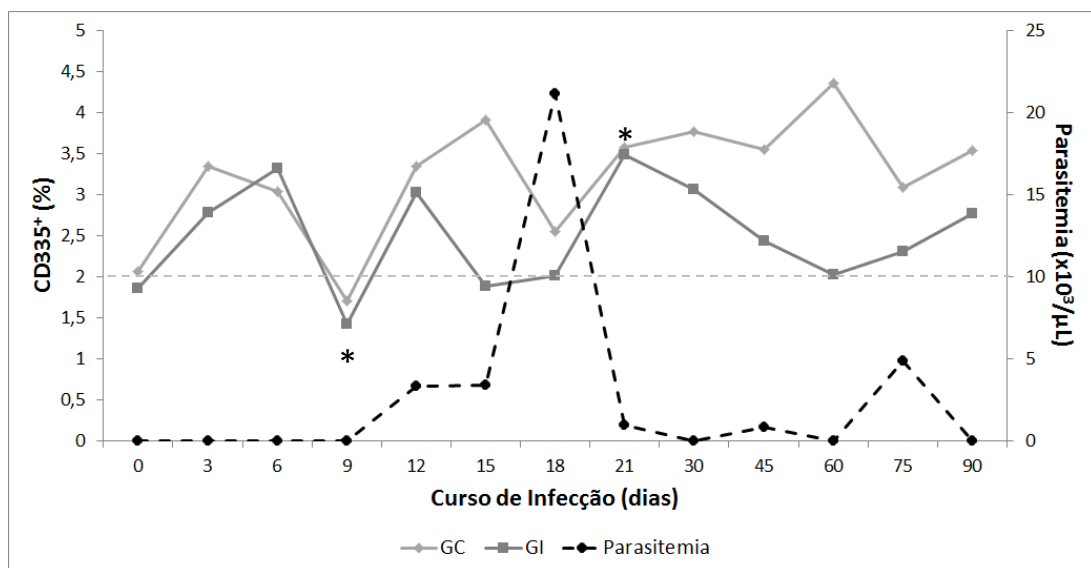


Figura 30. Médias das células NK (CD335⁺) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo da normalidade segundo Bastos et al. (2008).

5.4.2 Células envolvidas na resposta imune adquirida

As amplitudes máxima e mínima, média e desvio padrão do perfil imunofenotípico das células da resposta imune celular dos GC e GI observadas durante o período experimental, estão apresentados pela Tabela 6.

Tabela 6. Perfil imunofenotípico dos LT dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*.

População (%)	Grupo Controle		Grupo Infectado		Valores de Referência
	Amplitude	Média±dp	Amplitude	Média±dp	
	Mín a Máx		Mín a Máx		
CD4 ⁺	11,2 a 19,2	14,5±2,25	9,8 a 18,3	13,6±2,84	8 a 31 ⁽¹⁾
CD8 ⁺	8,5 a 19,3	12,0±3,17	5,2 a 11,3	7,3±2,21	10 a 30 ⁽¹⁾
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,69 a 1,73	1,3±0,25	1,25 a 2,63	1,9±0,45	-
CD25 ⁺	1,8 a 6,2	4,0±1,40	2,1 a 4,6	3,5±0,90	2 a 10 ⁽²⁾
WC1 ⁺ Tγδ	3,2 a 7,9	4,8±1,27*	2,2 a 5,6	3,3±1,13*	4 a 44 ⁽¹⁾

⁽¹⁾Tizard (2012). ⁽²⁾ Sakaguchi et al. (1995)

Durante o período experimental, o percentual médio da população de LT CD4⁺ dos GI e GC não diferiram estatisticamente ($P>0,05$). Entretanto, o GI apresentou redução estatística da média no 3º dpi (10,4±5,3%) em relação ao 9º (18,3±7,8%), 15º (17,1±7,1%), 18º dpi (16,6±7,3%) ($P<0,05$). No 9º dpi, o GI apresentou elevação significativa da média em comparação ao 3º, 30º (10,4±7,9%), 45º (10,9±6,9%), 60º (12,1±7,4%) e 75º (12,8±6,2%) ($P<0,05$) (Figura 31).

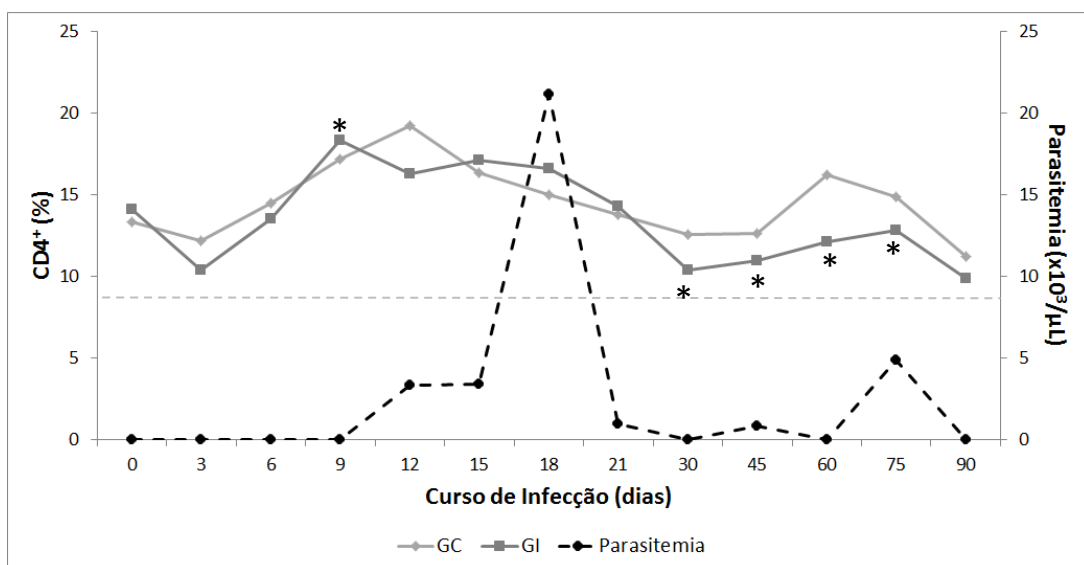


Figura 31. Médias das células LT CD4⁺ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).

A média das LT CD8⁺ do GI apresentou redução significativa nos 0°, 12°, 15°, 18°, 45°, 60°, 75°, 90° dpi em relação ao GC (P<0,05).

Nos 6° dpi (9,2±2,3%), 9° dpi (10,2±2,1%), e 12° dpi (10,3±3,4%) o GI apresentou aumento significativo de LT CD8⁺ em relação ao 30° (5,2±2,9%), 45° (5,2±1,6%), 60° (5,4±1,5%), 75° (5,3±1,7%) e 90° dpi (5,6±1,7%) (P<0,05) (Figura 32).

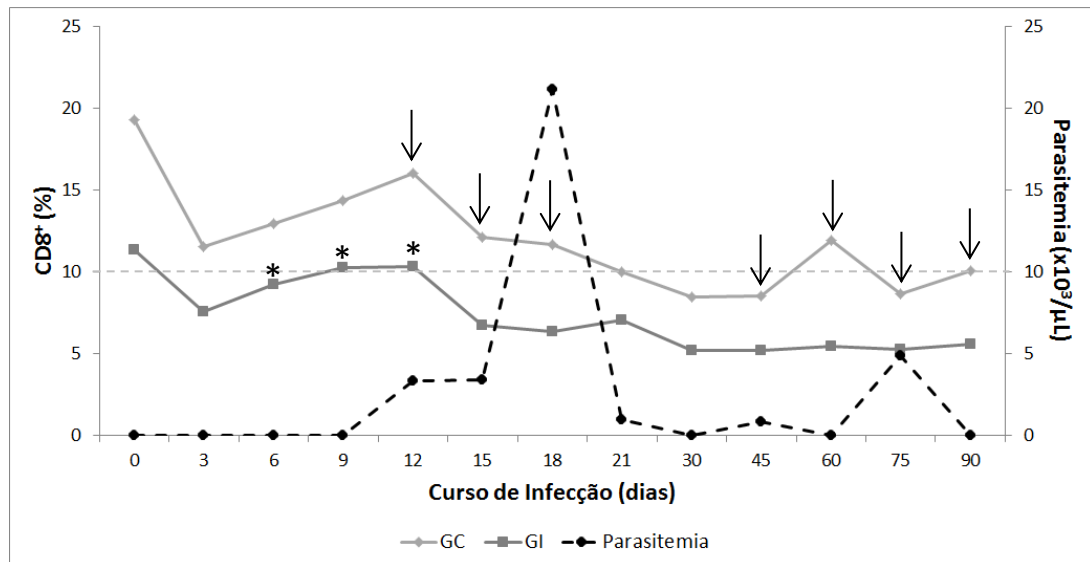


Figura 32. Médias de LT CD8⁺ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo da normalidade segundo Tizard et al. (2012).

A média da relação LT CD4⁺/CD8⁺ do GI apresentou aumento significativo no 15° e 18° dpi em comparação ao GC (P<0,05).

No 15° dpi (2,49±0,78%) e 18° dpi (2,59±0,47%) o GI apresentou aumento significativo de LT CD4⁺/CD8⁺ em relação ao 0 (1,26±0,7%), 3° (1,35±0,49%), 6° dpi (1,52±0,94%) (P<0,05). No 75° dpi notou-se elevação estatística (2,44±0,77%) em relação ao 0 e 3° dpi (P<0,05) (Figura 33).

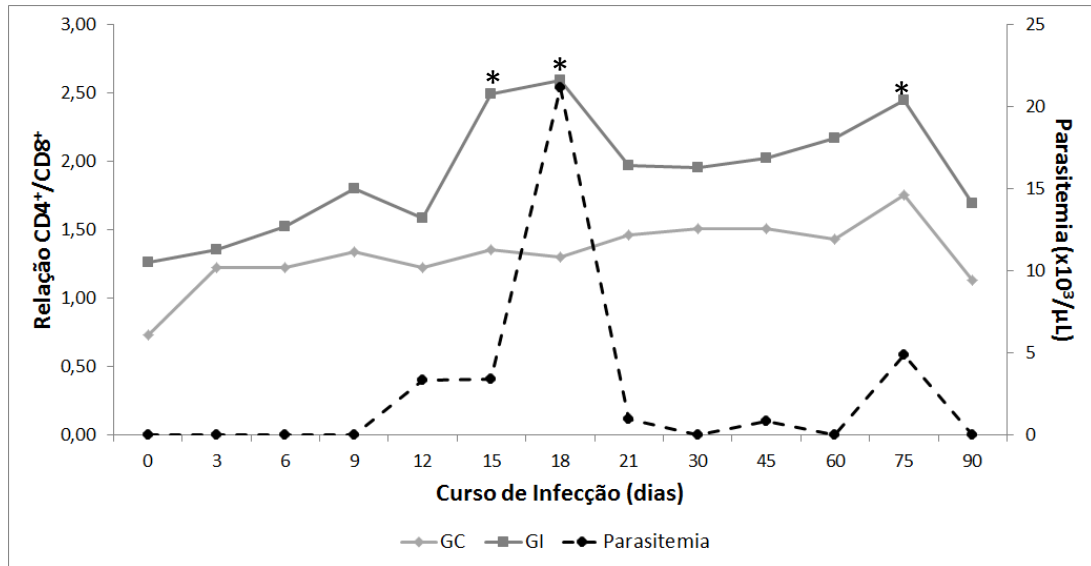


Figura 33. Médias da relação LT CD4⁺/CD8⁺ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*.

Durante o período experimental, a média de LT CD25⁺ do GI apresentou aumento estatístico no 45° e 75° dpi em relação ao GC (P<0,05).

O GI apresentou aumento significativo no 45° dpi (3,96±1,9%), 60° (4,58±2,82%) e 75° dpi (4,62±3,43%) em relação ao dia 0 (2,24±0,64%) (P<0,05) (Figura 34).

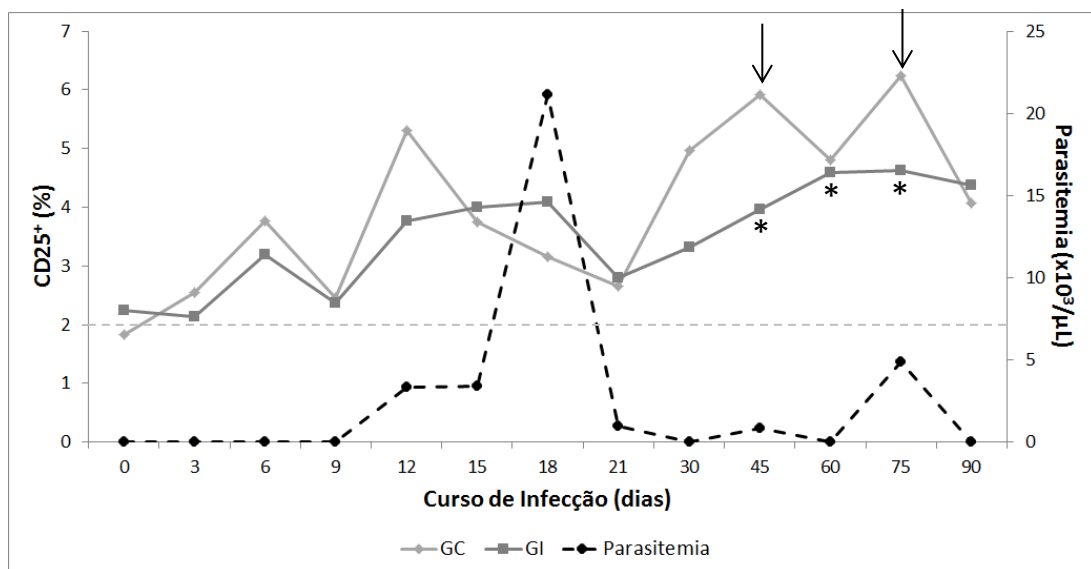


Figura 34. Médias de LT CD25⁺ dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo de normalidade, segundo Sakaguchi et al. (1995).

A média de LTγδ (WC1⁺) do GI apresentou redução significativa no 30° dpi em comparação ao GC (P<0,05).

O GI apresentou aumento significativo no 9º dpi ($5,6 \pm 2,8\%$) em relação ao 60º, ($2,3 \pm 0,7\%$) e 75º dpi ($2,4 \pm 0,8\%$) ($P < 0,05$) (Figura 35).

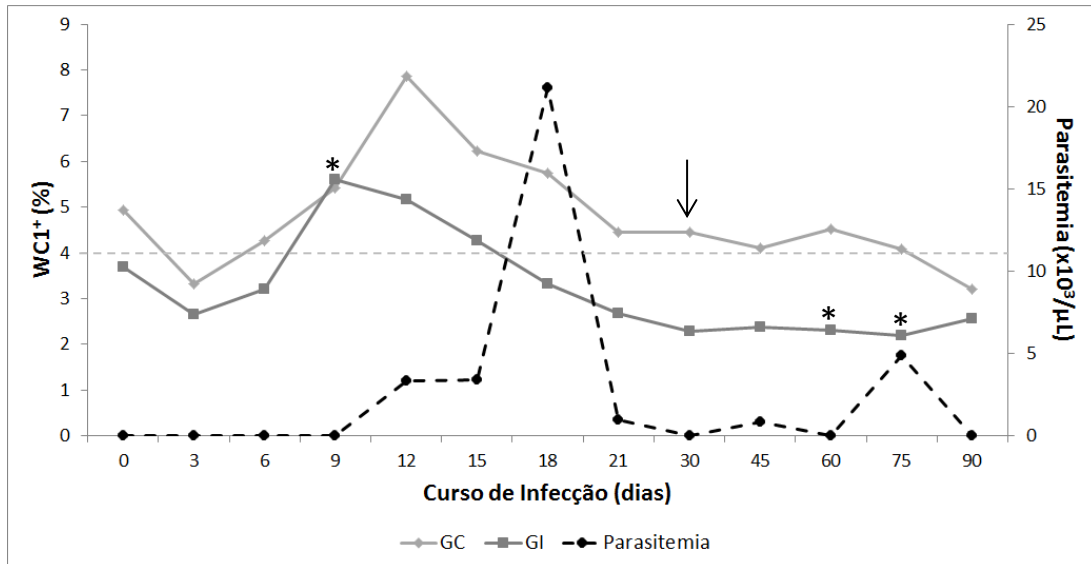


Figura 35. Médias de $LT\gamma\delta$ ($WC1^+$) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. A linha horizontal tracejada representa o limite mínimo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).

A média de $LT\gamma\delta$ ($WC1^+$) no GI apresentou correlação positiva ($r = 0,92$) com a parasitemia sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (Figura 36).

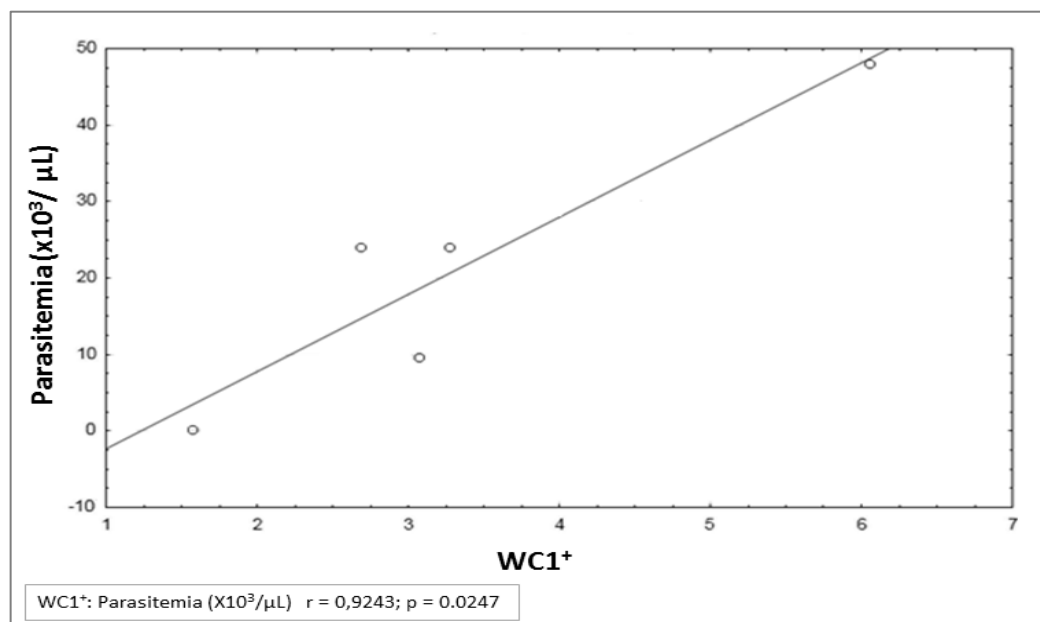


Figura 36. Correlação positiva entre perfil de parasitemia e $LT\gamma\delta$ ($WC1^+$) ($P < 0,05$) no grupo infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*

As amplitudes máxima e mínima, média e desvio padrão dos do perfil imunofenotípico correspondente às células da resposta imune humoral dos GC e GI observadas durante o período experimental, estão apresentados pela Tabela 7.

Tabela 7. Perfil da resposta imune humoral dos bovinos dos grupos controle e infectado, durante infecção experimental por *T. vivax*.

População (%)	Grupo Controle		Grupo Infectado		Valores de Referência
	Amplitude	Média±dp	Amplitude	Média±dp	
	Mín a Máx		Mín a Máx		
CD21 ⁺	16,2 a 30,0	22,3±4,60	18,8 a 35,8	28,2±6,53	16 a 21 ⁽¹⁾
LT/LB	0,78 a 6,22	1,80±0,98	0,15 a 3,04	1,25±0,77	-

⁽¹⁾Tizard (2012).

A média de LB (CD21⁺) não apresentou diferença estatística entre os grupos durante o período experimental (P>0,05).

Entretanto, no 30° (35,8±17,5%), 75° (35,7±18,3%) e 90° dpi (35,6±9,7%) o GI apresentou aumento significativo em relação ao 21° dpi (±%) (P<0,05) (Figura 37).

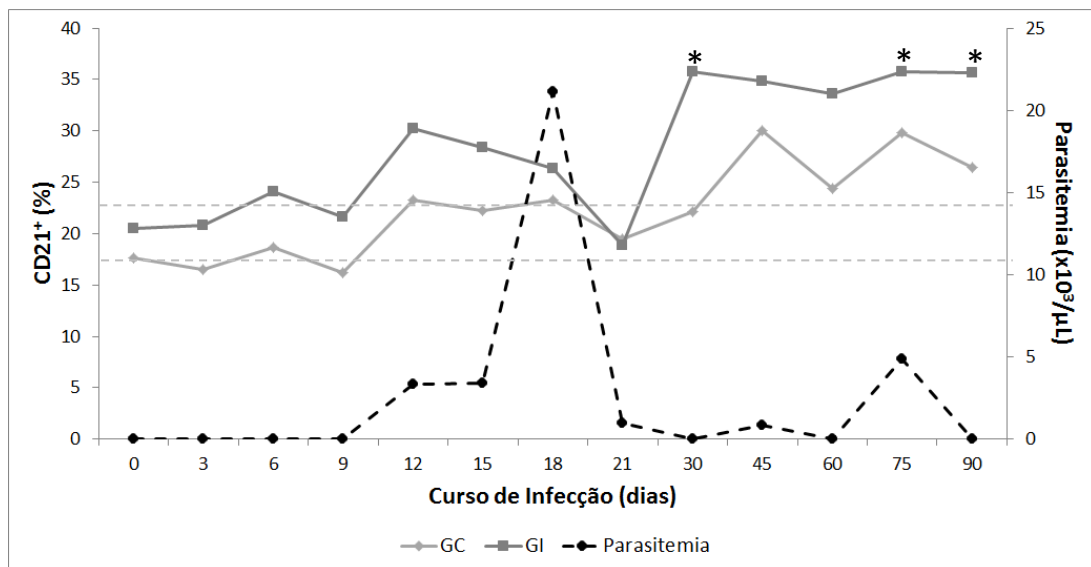


Figura 37. Média de LB (CD21⁺) dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*. As linhas horizontais tracejadas representam os limites mínimo e máximo de normalidade segundo Tizard et al. (2012).

Ao avaliar a média da relação LT/LB (Figura 38), não foi observada diferença estatística entre os GC e GI durante o período experimental, nem durante a avaliação entre grupos (P>0,05).

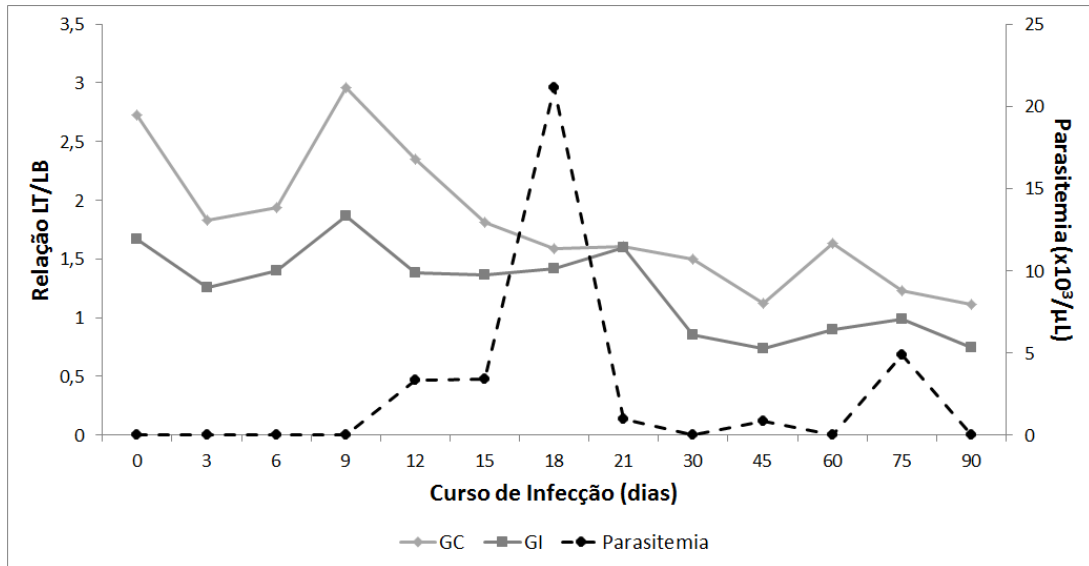


Figura 38. Média da relação LT/LB dos bovinos dos grupos controle (GC) e infectado (GI), durante infecção experimental por *T. vivax*.

5.5 PERFIL SOROLÓGICO

Os anticorpos IgM anti-*T. vivax* foram observados a partir do 3º dpi e IgG anti-*T. vivax* foi observado a partir do 6º dpi (Figura 39).

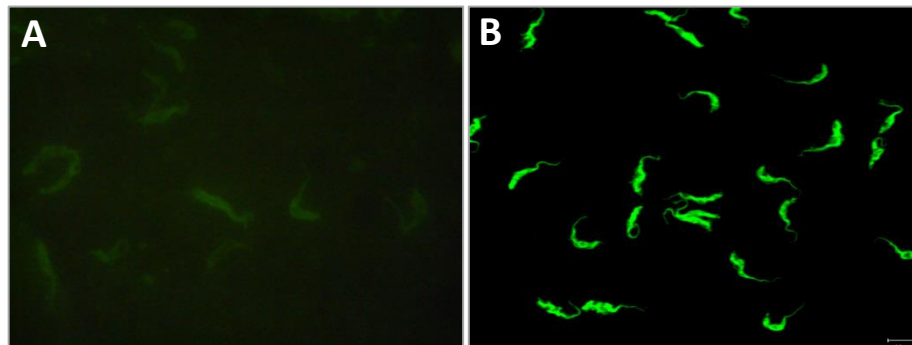


Figura 39 – Lâminas de RIFI mostrando resultado de amostra negativa (A) e amostra positiva (B) com as formas tripomastigotas de *T. vivax* marcadas com isotiocianato de fluoresceína. Imagens obtidas por microscópio confocal (Zeiss® LSM 510 Meta) (1000x).

A titulação de IgM foi observada no 3º dpi em 60% dos animais variando de 40 a 80. No 15º dpi observou-se maior titulação de IgM com 60% dos animais apresentando títulos entre 40 a 640. A titulação de IgG no GI iniciou-se no 6º dpi com 20% dos animais apresentando título 40. A maior titulação ocorreu no 30º dpi, sendo que 100% dos animais apresentaram títulos, variando de 160 a 10240, coincidindo com a redução da parasitemia

(Figura 40). O grupo controle não apresentou titulação contra *T. vivax* durante todo o período experimental.

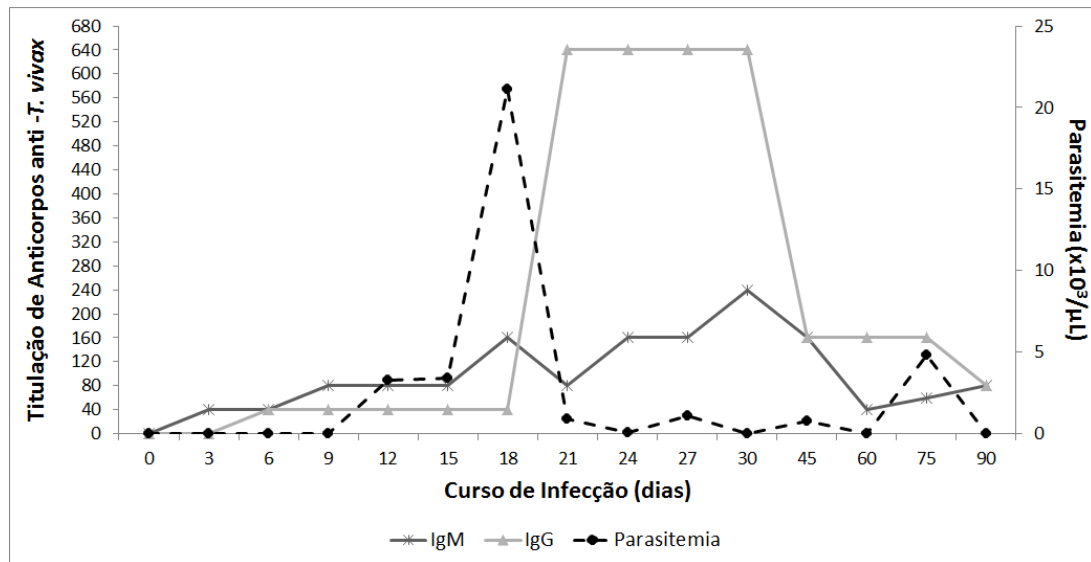


Figura 40. Mediana da titulação de anticorpos IgM e IgG anti-*T. vivax* do grupo infectado durante infecção experimental por *T. vivax*.

5.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Devido à complexidade dos resultados obtidos neste estudo, será apresentado a seguir um resumo com as evidências estatisticamente significativas obtidas no GI após a análise dos resultados (Quadro 2).

Os resultados serão divididos conforme o período de infecção baseado na parasitemia de acordo com Taylor e Authié (2004), como discriminado abaixo:

- Fase pré-patente: período de infecção até o aparecimento das formas tripomastigotas no sangue periférico.
- Fase aguda: aparecimento das formas tripomastigotas até o pico de parasitemia.
- Fase crônica: redução e recidivas de parasitemia

Este tipo de abordagem permitirá uma melhor interpretação dos resultados e a elaboração de propostas referentes aos eventos clínicos, hematológicos e imunológicos desencadeados pela infecção experimental por *T. vivax*.

Parâmetros Avaliados	Fase pré-patente (0-11° dpi)	Fase Aguda (12°-18° dpi)	Fase Crônica (21°-90° dpi)
Sinais clínicos	Apatia Mucosas pálidas Secreção ocular	Apatia Mucosas pálidas/anemia Secreção nasal e ocular Diarreia e claudicação ↓ Escore Corporal ↑ T°C retal	Apatia Mucosas pálidas/anemia Opacidade de córnea ↑ EC
Hemograma	↑ Leucócitos ↑ Neutrófilos ↑ Monócitos	↓ Hemácias ↓ Hemoglobina ↓ Hematócrito ↓ VCM (microcitose) ↓ Plaquetas ↓ Leucócitos ↓ Neutrófilos ↓ Linfócitos	↓ Hemácias ↓ Hemoglobina ↓ Hematócrito ↑ VCM (normocitose) ↑ CHCM ↑ HCM ↓ Plaquetas ↑ Leucócitos ↓ Neutrófilos ↑ Linfócitos ↓ Monócitos
Imunofenotipagem	↓ CD335 ⁺ ↓ CD14 ⁺ ↑ CD4 ⁺ ↑ CD8 ⁺ ↑ WC1 ⁺	↓ CD335 ⁺ ↑ CD14 ⁺ ↑ CD8 ⁺ ↑ CD4/CD8 ⁺	↑ CD335 ⁺ ↓ CD4 ⁺ ↓ CD8 ⁺ ↑ CD4/CD8 ⁺ ↑ CD25 ⁺ ↓ WC1 ⁺ ↑ CD21 ⁺
Sorologia	↑ IgM	↓ IgM ↑ IgG	↑ IgG

Quadro 2. Síntese dos resultados relacionados à interferência da parasitemia e comportamento das variáveis no grupo infectado durante infecção experimental por *T. vivax*. [↓] indica redução significativa e [↑] indica elevação significativa.

6 DISCUSSÃO

6.1 PERFIL PARASITÁRIO

O período pré-patente na infecção por *T. vivax* é muito variável e segundo outros estudos experimentais com bovinos e ovinos, essa variação pode ser decorrente das diferenças na espécie, raça e idade dos animais, na alimentação e nos fatores ambientais, que podem interferir na resposta do hospedeiro ao parasito, demonstrando que uma mesma amostra de *T. vivax* pode apresentar patogenicidade diferente dependendo dos fatores supracitados. (SCHENK et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; BATISTA et al., 2006).

Neste estudo, o período pré-patente (11 dias) e pico de parasitemia (18° dpi) foi maior ao observado por Adamu et al. (2007), que realizou infecção experimental em seis touros zebus na Nigéria e foram identificadas as formas tripomastigotas de *T. vivax* no sangue de touros infectados dentro de 4-5 dias pós-infecção. O pico de parasitemia foi registrado seis dias após a infecção e os touros infectados permaneceram com parasitemia intermitente por 56 dias (curso do experimento), semelhante aos achados deste estudo (90 dias). O período pré-patente superior ao observado por Adamu et al. (2007), pode ser justificado pela amostra de *T. vivax* utilizada (isolado Aquidauana-MS) e ausência do vetor biológico (mosca tsé-tsé).

A especificidade dos testes parasitológicos para detecção das formas tripomastigotas como o BCT é de 100%, porém a sensibilidade é baixa porque não é possível detectar parasitemia abaixo 200-1000 tripomastigotas/mL no sangue (MURRAY et al., 1977; DESQUESNES; TRESSE, 1996). Neste estudo, o BCT permitiu observar as formas de tripomastigota de *T. vivax* nos animais com parasitemia a partir de 16 tripomastigotas/ μ L conforme a metodologia utilizada (Brener, 1961).

A variação da parasitemia nesse estudo ($0,08 \times 10^3$ a $4,8 \times 10^7$ tripomastigotas/mL) foi superior à observada por Batista et al. (2008) ($1,7 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^7$ tripomastigotas/mL) em ovinos infectados experimentalmente por *T. vivax*, Batista et al. (2012), $2,6 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^7$ tripomastigotas/mL em infecção natural em vacas e inferior à média observada Guegan et al. (2013) $1,0 \times 10^9$ tripomastigotas/ml em camundongos infectados experimentalmente (isolado de *T. vivax* patogênico para camundongos).

O tratamento com aceturato de diminazene não foi eficaz na eliminação do parasito (recorrência de tripomastigota após dois dias do tratamento), o que demonstra resistência do

T. vivax é droga utilizada estando de acordo com outros trabalhos realizados (BATISTA et al., 2007, 2008; CADIOLI et al., 2012). Atualmente a droga de eleição é o cloreto de isometamídio, pois além de ação tripanocidas eficaz, diminui a gravidade da doença, aumentando significativamente o hematócrito dos animais e diminui a incidência da doença, mesmo que não evite novas infecções (CADIOLI et al., 2012).

6.2 PERFIL CLÍNICO

A redução significativa da temperatura retal no 1º, 2º e 3º nos GC e GI pode ser justificada pela baixa temperatura ambiental que variou entre 15°C a 18°C. A elevação da temperatura retal observada nos animais do GI no período entre 11º e 18º dpi (39,0-39,2°C) foi caracterizada febre branda, pois segundo Radostidis et al. (2007), a febre branda compreende temperaturas corporais situadas próximas ao limite superior da normalidade e 40°C.

A elevação da temperatura retal (11º ao 18º dpi), bem como o aumento estatisticamente superior no 15º dpi (39,2±0,6°C) coincidiu com o aumento da atividade parasitária corroborando com o estudo realizado por Schenk et al. (2001) que observaram média de 39,3°C após o 5º dpi em infecção experimental de bovinos por *T. vivax*. Almeida et al. (2010) também verificou elevação da temperatura (variando até 41,5°C) entre 10º e 18º dpi em ovinos infectados experimentalmente por *T. vivax*. A febre observada nas tripanossomíases pode estar diretamente relacionada ao aparecimento da anemia, devido à liberação de fator hemolítico pelos tripomastigotas, induzindo a resposta imune com deposição de imunocomplexos e lise de hemácias e a indução da liberação de citocinas como TNF- α pela presença das VSGs das tripomastigotas para controlar a parasitemia quanto às patologias associadas, e como consequência os animais apresentam como sinal clínico anemia e febre (ALMEIDA et al., 2008; BARAL, 2010).

A frequência cardíaca e frequência respiratória neste estudo não sofreram variações entre os grupos, discordando de outros estudos com infecção experimental por *T. vivax* em ovinos, em que as frequências respiratória e cardíaca aumentaram (BATISTA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010).

A redução do ECC do GI (4º dpi) e do GC (7º dpi) pôde ser justificada pela má qualidade do pasto (período seco do ano) e ausência de suporte nutricional. O GI apresentou redução no ECC também a partir do 11º dpi, podendo estar associada à parasitemia. Na fase

final do experimento, a partir do 45º dpi ambos os grupos aumentaram o EC até o 90º dpi devido à suplementação nutricional. Porém foi notado aumento significativo no GC no 75º dpi em comparação ao GI, indicando que durante a elevação da parasitemia no 75º dpi, mesmo com a suplementação, os animais do GI tiveram maior dificuldade no ganho de peso em comparação ao GC. Batista et al. (2006) relatou a ausência de ganho de peso em ovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* até o 60º dpi, constatando a influência negativa da infecção por *T. vivax* sobre o aumento de EC. Vários estudos sobre infecção natural e experimental também apontaram a diminuição do EC, relatando que a perda de peso evidente estava relacionada às infecções agudas e crônicas por *T. vivax* (SILVA et al., 1999; SCHENK et al., 2001; BATISTA et al., 2008, 2012; ALMEIDA et al., 2008).

As alterações clínicas observadas nos animais do GI foram semelhantes aos achados de Silva et al. (1999), Paiva et al. (2000), Batista et al. (2008) e Almeida et al. (2010) que relataram, mucosas pálidas, anorexia, secreção nasal, secreção ocular e opacidade de córnea.

Neste estudo 20% dos animais apresentaram diarreia e claudicação. Segundo Silva et al. (2009), Batista et al. (2012) e Cadioli et al. (2012) a diarreia é um achado incomum. No estudo de Almeida et al. (2010), foi observado no 85º dpi, que todos os ovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* apresentaram diarreia esporádica e dois ovinos apresentaram incoordenação motora.

A claudicação observada era caracterizada por movimentos lentos até a dificuldade de sustentação do próprio peso nos membros pélvicos, podendo estar relacionada à perda de ECC (SCHENK et al., 2001; BATISTA et al., 2008), anemia ou até por deposição de imunocomplexos (ALMEIDA et al., 2008; BATISTA et al., 2012). Almeida et al. (2010) verificou lesão muscular em ovinos infectados experimentalmente com *T. vivax*, associada à diminuição da concentração das enzimas AST e CK. Cadioli et al., (2005), em pesquisa realizada em ratos infectados com *T. evansi*, verificaram que o sistema muscular parecia ser alvo importante do patógeno.

6.3 PERFIL HEMATOLÓGICO

Ao avaliar o perfil hematológico, as reduções nas médias das contagens de hemácias, teor de hemoglobina e hematócrito no GI coincidiram com a elevação da parasitemia, observada no 18º e 75º dpi, o que corrobora com os trabalhos de Batista et al. (2008) e Almeida et al. (2008) que também observaram os ovinos infectados experimentalmente por *T.*

vivax apresentaram diminuição estatisticamente significativa do perfil eritrocitário durante a fase de parasitemia.

Adamu et al. (2007) observaram que valores de hematócrito declinaram rapidamente em touros infectados experimentalmente por *T. vivax* antes da infecção ($29,0 \pm 0,5\%$) e no 20º dpi ($19,3 \pm 0,5\%$), sendo significativamente menor do que em touros do grupo controle ($27,3 \pm 1,5\%$) ($P < 0,05$). Segundo Chamond et al. (2010) essa redução dos valores hematológicos ocorre pela hemólise extravascular, ou pela apoptose devido a um processo autoimune desencadeada pela infecção por *T. vivax*. Com o aumento de tripomastigotas na circulação sanguínea, há também o aumento da deposição de imunocomplexos, ocasionando lise de hemácias pelas células NK e eritrofagocitose pelos macrófagos, levando à queda da contagem de hemácias e consequentemente levando a diminuição da concentração de hemoglobina e hematócrito (ANDRIANARIVO et al., 1995; BARAL, 2010; GUEGAN et al., 2013).

A anemia foi a principal alteração encontrada neste estudo e corrobora com diversos trabalhos relacionados à infecção por *T. vivax* (ADAMU et al., 2007; SILVA et al., 1999; SCHENK et al., 2001; PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2007, CUGLOVICI et al., 2010; CHAMOND et al., 2010; CADIOLI et al., 2012). A anemia observada no GI neste estudo foi classificada sendo principalmente microcítica e normocrômica, devido à redução significativa de VCM no pico de parasitemia (18º dpi). Foi observado aumento do VCM no 75º dpi em que houve nova elevação da parasitemia, porém, mesmo com reduções dos parâmetros eritrocitários, não foi observado macrocitose. Estes dados se assemelham aos estudos realizados por Silva et al. (1999) e Almeida et al. (2008), que observaram inicialmente a anemia como microcítica normocrômica, passando para macrocítica por um período de tempo e, posteriormente, tornou-se microcítica, no final do experimento, segerindo um quadro de anemia crônica pela redução significativa da concentração de ferro.

Foi observada, no GI, trombocitopenia associada à atividade parasitêmica por *T. vivax*, concordando com outros estudos (ASSOKU; GARDINER, 1989; ESPINOZA et al., 2000; CHAMOND et al., 2010). Nas infecções por *T. vivax* foi relatado diminuição de plaquetas e eritrócitos devido à atividade fagocitária pelos macrófagos (MURRAY; DEXTER 1988; GARDINER, 1989), concordando com a elevação das determinações de CD14⁺ verificadas no 18º e 75º dpi neste estudo. Buratai et al. (2006) relataram que estas alterações de plaquetas podem estar associadas à liberação de uma enzima denominada trans-sialidase pelo *T. vivax* na circulação sanguínea do hospedeiro, e sua atividade é mediada pela lise das hemácias e agregação plaquetária, levando a fagocitose.

Analisando o perfil leucocitário pode-se observar que no período pré-patente (0-11°dpi), a maioria dos animais do GI apresentaram leucocitose por neutrofilia. A neutrofilia na fase inicial da infecção também foi constatada na literatura (ESPINOZA et al., 2000; CHAMOND et al., 2010). Espinoza et al. (2000) verificaram aumento significativo no número total de neutrófilos, e, por serem as primeiras células que tentam destruir o parasito, indica processo de resposta imune inata. Sua atividade aumenta devido à hemólise causada pelo *T. vivax*.

Houve também presença de monocitose em 40% dos animais nesta fase inicial, concordando com Silva et al. (1999) e Chamond et al. (2010), que verificaram monocitose, sendo esta constatação consistente nas infecções agudas relatados em *T. vivax*.

Durante a parasitemia (12° e 18° dpi), observou-se redução da atividade leucocitária o que corrobora com os estudos realizados por Silva et al. (1999), Espinoza et al. (2000) e Chamond et al. (2010). Alguns estudos observaram, nessa fase, leucopenia com linfocitose (SILVA et al., 1999; BATISTA et al., 2006, 2008; CHAMOND et al., 2010).

Na infecção por *T. brucei*, com o aumento de parasitemia, aumenta a atividade fagocitária pelo macrófagos ativados, resultando em diminuição significativa das populações de leucócitos (BARAL, 2010). Esta constatação está de acordo com o aumento significativo de CD14⁺ durante a elevação da parasitemia (18° dpi) neste estudo.

Esievo e Saror (1983) sugerem que a leucopenia na fase aguda da infecção por *T. vivax* pode ser devido à diminuição das células provocada pela presença persistente do tripanosoma na circulação, liberando fatores tóxicos aos leucócitos após terem processado os antígenos do tripanosoma, além de sofrer leucofagocitose massiva no fígado. No presente estudo, na fase de parasitemia, não foi observada leucopenia, nem linfocitose, porém, notou-se redução significativa dos leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos.

Após o declínio da parasitemia, os valores de leucócitos neste estudo retornaram aos valores observados na pré-infecção, sendo observados leucocitose por linfocitose, corroborando com Espinoza et al. (2000), que observaram leucocitose por linfocitose após três semanas da infecção, indicando tipo de resposta imune adaptativa, principalmente humoral, pela produção de anticorpos, além de relatar neutropenia. Neste estudo, também foi observado linfocitose principalmente pela proliferação de LB CD21⁺ e aumento de IgG.

A neutropenia e monocitopenia também foram observadas na fase final no experimento em concordância ao aumento da parasitemia. Essa alteração leucocitária pode ser atribuída aos mecanismos lentos da resposta dos neutrófilos nos bovinos e aumento do

consumo pela mobilização destes para os locais de inflamação além da reparação celular e tecidual causada pelos macrófagos (ESIEVO; SAROR, 1983; MURRAY; DEXTER, 1988).

As alterações das médias de eosinófilos e basófilos observadas nos GI, não foram específicas e não demonstraram relação com a infecção por *T. vivax* (ESIEVO; SAROR, 1983).

É importante ressaltar que a média de linfócitos em ambos os grupos apresentou aumento durante o período experimental. Isso pode ser justificado pela leucocitose fisiológica apresentada pelos animais, pois segundo McGavin e Zachary (2009), a linfocitose está relacionada à liberação de epinefrina devido ao estresse (início do experimento), e da redistribuição de linfócitos no compartimento sanguíneo circulante, como também pela idade dos animais, pois os animais jovens normalmente apresentam concentrações mais elevadas de linfócitos que os animais mais velhos, além de ter contagens que excedam os valores de referência para adultos.

6.4 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO

6.4.1 Células envolvidas na resposta imune inata

Observou-se aumento da população de monócitos do GI no 6º dpi pelo hemograma, porém não se notou elevação de CD14⁺, isso pode ser explicado pela liberação de monócitos não ativados cuja ativação foi observada a partir do 9º dpi. O aumento de CD14⁺ foi consistente e significativo no 18º e 21º dpi, sugerindo que a ativação dos monócitos/macrófagos ocorreu principalmente na fase aguda refletindo em redução e controle da parasitemia. Buza et al. (2008) verificaram que a ativação de monócitos/macrófagos está associada à parasitemia e que o aumento de IFN- γ e IL-12 e inibição da proliferação de LT auxiliam no controle da parasitemia, estando de acordo com o presente estudo que também verificou menores concentrações de LTCD4⁺ e LTCD8⁺ durante o 18º (pico de parasitemia) e 21º dpi. Os autores ainda apontam que a ativação de monócitos e/ou macrófagos também está relacionados com diminuição dos parâmetros eritrocitários e leucocitários devido ao processo fagocitose pela inflamação, também de acordo com os resultados de CD14⁺ em concentrações elevadas no 18º e 21º podem estar relacionados às diminuições significativas aos parâmetros eritrocitários e leucocitários nestes dias.

Segundo Baral (2010), quando há presença de tripomastigotas de *T. brucei* na corrente sanguínea, há o reconhecimento das VSGs e liberação de DNA tripanossomal pelos parasitos mortos, levando a ativação clássica de macrófagos, resultando em fagocitose dos parasitos opsonizados e liberação de citocinas e substâncias tripanotóxicas que estão envolvidas no controle do primeiro pico de parasitemia.

Após o efetivo controle da parasitemia, os animais apresentaram sinais clínicos menos evidentes e isto pode estar relacionado com a diminuição de CD14⁺. Após o controle, ocorre ativação alternativa pelos monócitos/macrófagos para se tornarem anti-inflamatórios, pois a persistência da inflamação pode ser maléfica para o hospedeiro, causando lesão tecidual e persistindo os sinais clínicos mais graves (BUZA et al., 2008).

A diminuição nas percentagens de células NK (CD335⁺) apresentado pelo GI durante o período experimental pode ser explicado pela menor eficiência das células NK na resposta contra parasitos extracelulares. Segundo Bastos et al. (2008), as células NK nos bovinos adquirem atividade citotóxica e produção de IFN- γ após estimulação *in vitro* na infecção por *Micobacterium bovis* e *Babesia bovis*. No estudo de Boda et al. (2009) foi demonstrado que a proporção de células NK não foi maior nos infectados, sugerindo que este subconjunto de células da resposta imune inata não influencia na infecção por *T. brucei*.

Mesmo em baixas concentrações no GI, foi observado aumento das células NK no 6^o dpi, coincidindo com o aumento de neutrófilos e monócitos indicando relação com a sua atividade na resposta imune inata influenciando sobre a apresentação de antígenos pelos macrófagos, sendo demonstrado pelo aumento de CD14⁺ posteriormente (9^o dpi).

No 21^o dpi, as células NK apresentaram aumento podendo também estar relacionadas à ativação de monócitos/macrófagos (CD14⁺) e início da ativação linfocitária justificada pelo aumento nas contagens de linfócitos observados neste dia pelo hemograma. Este dia também coincidiu com aumento da titulação de anticorpos IgG anti-*T. vivax*. E de acordo com Pastoret et al. (1998), as células NK tem como característica auxiliar na resposta adquirida promovendo maturação de células dendríticas e regulação de respostas mediadas de LT e LB.

6.4.2 Células envolvidas na resposta imune adquirida

As variações de LT CD4⁺ (redução 3^o, 30^o, 45^o, 60^o e 75^o dpi e aumento 9^o dpi) observadas nos animais do GI durante o período experimental corroboram com os estudos de Boda et al. (2009), que mostraram variações de aumento inicial e redução significativa de

LTCD4⁺ em pacientes infectados por *T. brucei* sugerindo que o curso da doença variou consideravelmente devido às complexidades da interação parasito-hospedeiro.

A redução significativa de LT CD4⁺ na fase crônica da infecção observada nos animais do GI pode ser explicada pela disfunção de resposta por LT possivelmente devido à contínua estimulação do sistema imune, resultando em uma diminuição de linfócitos de memória e efetores em fase crônica da doença (BODA et al. (2009). Naessens et al. (2002), que afirmaram que o controle da parasitemia por *T. congolense* ocorreu independente de LT CD4⁺, e indicaram que resposta imune inata participa mais ativamente na capacidade dos animais tripanotolerantes para controlar parasitemia como observado no presente estudo.

A redução de LT CD8⁺ observada no 45°, 60°, 75° e 90° dpi os animais do GI pode ser explicada com base nos trabalhos de Sakaguchi et al. (1995) e Pastoret et al. (1998) que apontaram vários fatores, como carga de tripomastigotas na circulação sanguínea, duração da infecção, quantidade de LT CD4⁺, LT reg, e células apresentadoras de antígenos afetando na intensidade da exaustão de LT CD8⁺. Segundo Boda et al. (2009), os pacientes infectados por *T. brucei* não apresentaram aumento na porcentagem de LT CD8⁺ ativado (HLA-DR⁺, CD69⁺ ou CD25⁺), mas os níveis de LT CD8⁺ de memória (CD8⁺CD45RA⁻) eram significativamente menores em pacientes infectados do que nos controles, tal como os níveis de LT CD8⁺ efetores (CD8⁺CD45RA⁺ CD62L⁻), e concluíram que não foi encontrado relação entre estes imunofenótipos do sangue e a gravidade da doença.

O aumento da relação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ no a partir do 9° dpi, com aumentos significativos no 15°, 18° e 75° dpi, sugeriram maior atividade na fase aguda da doença ou recorrência de parasitemias, concordando com os achados de Hill et al. (2005), em que após a detecção de *T. congolense* em sangue periférico de bovinos, a relação CD4⁺/CD8⁺ aumentou, acompanhada por aumento de LB (CD21⁺) e diminuição da contagem total de LT. Ellis et al. (1987), justifica que a relação de LT CD4⁺/CD8⁺ aumenta no início da infecção por *T. congolense* e as proporções das diferentes populações e subpopulações de linfócitos também sofrem alterações, ou seja, o aumento da relação CD4⁺/CD8⁺ indica infecção aguda.

Ao avaliar o grau de ativação dos linfócitos provocado pelos tripanossomas, pela expressão de superfície de ativação (IL-2R α) utilizando o marcador CD25⁺, foi observado que o aumento na fase inicial (12° e 18°) e diminuição após (21° dpi) coincidiu com o aumento de CD14⁺ e redução da parasitemia. Segundo Baral (2010), o aumento de CD14⁺, é caracterizado pela ativação do monócitos/macrófagos com indução da produção de uma prostaglandina independente de mecanismo para a abolição do receptor e expressão de IL-2 pela diminuição de CD25⁺. O aumento significativo na fase crônica (45°, 60° e 75°) pode estar relacionada à

atividade parasitária e sua recorrência. O aumento da expressão de IL-2R α , sugeriu que, estas alterações de ativação celular parecem ser auto controladas, também pela atividade fagocítica dos monócitos/macrófagos e produção de IL-2, demonstrada nas infecções por *T. brucei* (BARAL, 2010). Nas infecções por *T. congolense* em bovinos, a imunossupressão induzida pela infecção mostrou estar associado com a supressão da IL-2 e IL-2R α (FLYNN; SILEGHEM, 1991).

Redução de LT $\gamma\delta$ foi observada nos primeiros dias pós-inoculação, sugere que estas células poderiam estar relacionadas com a forma de inoculação (via SC e IM). Flynn et al. (1994) também observaram reduções dessas células devido a sua ativação e migração para pele, e aumento nas áreas da picada da mosca tsé-tsé. A função precisa destas células em ruminantes é desconhecida, embora seja provável que eles estão envolvidos na proteção de superfícies epiteliais. O aumento significativo de LT $\gamma\delta$ no 9º dpi também está de acordo com Flynn et al. (1994) em estudo com *T. congolense* que relataram o LT $\gamma\delta$ sendo uma primeira linha de defesa para a imunidade de LT, por reconhecerem as células alteradas por estímulo desfavorável incluindo agentes infecciosos, malignidade, substâncias tóxicas, radiação e choque térmico.

Além dessas observações, os animais do GI apresentaram correlação significativa de WC1⁺ em relação à parasitemia, podendo ser justificado pelos achados de Guzman et al. (2012), que realizaram estudos sugerindo que essa classe de células pode ter um papel importante na regulação das LT e a apresentação de antígeno. Estas células parecem ser "pré-ativadas", como mostrado pela expressão de memória e marcadores de ativação, o que pode permitir rápida indução de funções efetoras na fase inicial. A redução significativa posterior a parasitemia (30º, 60º e 75º dpi), pode ser explicada por uma mudança nas subpopulações de linfócitos durante esta fase de infecção. Nas infecções por *T. congolense* e *T. brucei*, a resposta imune adaptativa ocorre principalmente pela ativação policlonal das células, proliferação e produção de anticorpos (HILL et al., 2005; BARAL, 2010). Isto também pôde ser justificado neste estudo, pois o GI apresentou aumento significativo de LB com aumento da titulação de anticorpos anti-*T. vivax*, além da diminuição da relação LT/LB nesta fase de infecção.

O aumento significativo de LB CD21⁺, observado no GI no 30º, 75º, 90º dpi, também foram observados nas tripanossomíases por *T. congolense* e *T. brucei* (FLYNN et al., 1994; NAESSENS et al., 2002; HILL et al., 2005, BODA et al., 2009). Em consonância com o sistema imunológico, este tipo de resposta é caracterizado pela ativação policlonal das LB suscetíveis em proliferar e a secretar grandes quantidades de anticorpos (PASTEURET et al.,

1998). No estudo imunofenotípico nas infecções por *T. brucei*, os pacientes infectados tinham maiores quantidades de LB do que os controles, sendo consistente com a grande ativação policlonal. Em pacientes imunossuprimidos, a resposta de LB durante a infecção pode afetar a homeostase de subconjuntos de LT levando a sua baixa regulação (BODA et al., 2009).

6.5 PERFIL SOROLÓGICO

Os anticorpos anti-*T. vivax* foram observados somente no GI. A ausência de anticorpos anti *T.vivax* no GC comprova que a separação dos grupos em piquetes, a utilização de *pour on* nos animais para evitar moscas e a coleta de sangue separadamente, primeiro o GC e depois o GI com troca de agulhas para cada animal auxilia no controle da transmissão de *T. vivax*. Os animais infectados produzem anticorpos para lisar o parasito e auxiliam na fixação do complemento. Segundo Black et al. (2001), os tripanossomas (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*) desenvolvem anticorpos que são específicos para a VSG, lisando os parasitos, e tem capacidade de fixar o complemento.

A titulação por IgM durante a fase aguda na infecção por *T. vivax* não foi capaz de reduzir a parasitemia, nem controlar os sinais clínicos, concordando com Williams et al. (1996), que afirma que após a infecção por *T. congolense*, o hospedeiro desenvolve imunoglobulina bovina específica M (IgM), a qual é dirigida para a VSG e antígenos de superfície não variantes. A IgM específica do tripanosoma é transitória e seus níveis são menores e semelhantes em bovinos tanto tripanotolerante e tripanosuscetível.

A detecção do aumento de IgG (a partir do 6º dpi com elevação no 30º dpi) está de acordo com achados de Assoku e Gardiner (1989), que descreveram infecção experimental por *T. vivax* em bovinos da raça Ayrshire em uma área do Quênia, onde não havia tripanossomíase e detectaram aumento dos níveis de anticorpos após o pico de parasitemia (10-15 dias após a infecção) e atividade de anticorpo foi máxima de 30-35 dias após a infecção. A persistência de anticorpos pode ocorrer por vários meses, mesmo após o tratamento paliativo dos animais (DELAFOSSÉ et al., 2006). Segundo Desquesnes e Tresse (1996), altos níveis de anticorpos foram descritos como mecanismos eficazes para manter baixos níveis de parasitemia, que podem explicar os resultados deste estudo, que demonstrou o aumento dos níveis de anticorpos principalmente por IgG e conseqüentemente diminuição da parasitemia e dos sinais clínicos. O aumento de IgG pode também mediar neutralização de produtos de parasitas que são responsáveis pela redução dos sinais clínicos, contribuindo assim para o aumento da resistência do hospedeiro à doença.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os animais infectados experimentalmente por *T. vivax* apresentam sinais clínicos anteriormente a detecção de tripomastigotas no sangue periférico.
- *T. vivax* é resistente ao aceturato de diminaneze.
- O tratamento com aceturato de diminaneze não interferiu no desenvolvimento da resposta imune dos animais do GI.
- A parasitemia interfere negativamente nos parâmetros eritrocitários, leucocitários e plaquetários.
- A fase inicial da infecção por *T. vivax* está associada ao aumento de LT CD4+, LT CD8+, LT $\gamma\delta$ (WC1+) e IgM.
- A elevação de monócitos/macrófagos ativadas (CD14+), relação LT CD4+/CD8+, IgG e redução de IgM parecem estar relacionadas com a redução da parasitemia.
- A manutenção da baixa parasitemia parece estar associada à elevação da relação LT CD4+/CD8+, ativação linfocitária (CD25+), LB CD21+ e de IgG, e redução de LT CD4+, LT CD8+ e LT $\gamma\delta$ (WC1+).

REFERÊNCIAS

- ADAMU, S.; FATIHU, M.Y.; USEH, N.M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V.O.; ESIEVO K.A.N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 29–34. 2007.
- ALMEIDA, K. A.; FREITAS, F. L. C.; JORGE, R. L. N.; NOGUEIRA, C. A. S.; MACHADO, R.Z.; NASCIMENTO, A.A. Aspectos hematológicos da infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n. 4, p. 1121-1127. 2008.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO, R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 669-676. 2010.
- ANDRIANARIVO, A.G.; MUYRA, P.; OPOLLO, M.M.; LOGAN-HEMFREY, L.L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of primary infection on bone marrow progenitor cells from N'dama and Boran cattle. **Experimental Parasitology**, v.80, p.407-414. 1995.
- AQUINO, L.P.C.; MACHADO, R.Z.; LEMOS, K.R.; MARQUES, L.C.; GARCIA, M.VALERIO.; BORGES, G.P. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010.
- ASSOKU, R.K.G.; GARDINER, P.R. Detection of antibodies to platelets and erythrocytes during haemorrhagic *Trypanosoma vivax* infection of Ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology**, v.31, p.199-216. 1989.
- BARAL, T. N. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, artigo n.389153, 24 p. 2010.
- BASTOS, R.G; JOHNSON, W.C.; MWANGI, W.; BROWN, W.C.; GOFF, W.L. Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN- γ after stimulation by *Mycobacterium bovis* BCG- or *Babesia bovis*-exposed splenic dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.124, p. 302–312. 2008.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.; GUERRA, J.L. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 31-37. 2006.
- BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**. v.143, p.174-181. 2007.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; ROSADO NETO, A. M.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 63-69. 2008.

BATISTA, J. S.; OLIVEIRA, A. F.; RODRIGUES, C. M. F.; DAMASCENO, C. A. R.; OLIVEIRA, I. R. S.; ALVES, H. M.; PAIVA, E. S.; BRITO, P. D.; MEDEIROS, J. M. F.; RODRIGUES, A. C.; TEIXEIRA, M. M. G. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semi-arid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.131-135. 2009.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; GARCÍA., H. A.; BEZERRA, F. S. B.; OLINDA, R. G.; TEIXEIRA, M. M. G.; SOTO-BLANCO, B. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Veterinary Research**, v.42:63 7p. 2011.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C. L.; REBOUÇAS, R. E. S.; BEZERRA, F. S. B.; GARCÍA, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, p.73–80. 2012.

BENGALY, Z.; KASBARI, M.; DESQUESNES, M.; SIDIBE, I. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 101-113, 2001.

BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P.; MARTINS-FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.107-110. 2004.

BLACK, S. J.; SICARDA, E. L.; MURPHY, N.; NOLAN, D. Innate and acquired control of trypanosome parasitaemia in Cape buffalo. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p.562-565. 2001.

BODA, C.; COURTIUOX, B.; ROQUES, P.; PERVIEUX, L.; VATUNGA, G.; JOSENANDO, T.; AYENENGOYE, C. R.; BOUTEILLE, B.; JAUBERTEAU M. O.; BISSER, S. Immunophenotypic lymphocyte profiles in Human African Trypanosomiasis. **PLoS ONE**. v. 4, n.7, 7p., e6184. 2009.

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 1961. Tese (Livre Docência) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 1961.

BURATAI, L.B.; NOK, A.J.; IBRAHIM, S.; UMAR, I.A.; ESIEVO, K.A. Characterization of sialidase from bloodstream forms of *Trypanosoma vivax*. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, p.71–77. 2006.

BUZA, J.; BENJAMIN, P.; ZHU, J.; WILSON, H. L.; GRAYSON, L.; KRIEG, A. M.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. K. CD14⁺ cells are required for IL-12 response in bovine blood mononuclear cells activated with Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 ligands. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.126, p. 273–282. 2008

CADIOLI, F. A. **Estudos metabólicos, hematológicos e anatomopatológicos em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma evansi***. 2005, 92 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2005.

CADIOLI, F.A.; BARNABÉ, P.A.; MACHADO, R.Z.; TEIXEIRA, M.C.A.; ANDRÉ, M.R.; SAMPAIO, P.H.; FIDÉLIS JÚNIOR, O.L.; TEIXEIRA, M.M.G.; MARQUES, L.C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.118-124. 2012.

CARVALHO, A. U., ABRÃO, D. C., FACURY FILHO, E. J., PAES, P. R. O., RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.769–771. 2008.

CHAMOND, N.; COSSON, A.; BLOM-POTAR, M.C.; JOUVION, G.; D'ARCHIVIO, S.; MEDINA, M.; DROIN-BERGE'RE, S.; HUERRE, M.; GOYARD, S.; MINOPRIO, P. *Trypanosoma vivax* Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. **Neglected Tropical diseases**, v.4, n.8, p.1-10. 2010.

COLLER, S. P.; MANSFIELD, J. M.; PAULNOCK, D. M. Glycosylinositolphosphate soluble variant surface glycoprotein inhibits IFN- γ -induced nitric oxide production via reduction in STAT1 phosphorylation in African trypanosomiasis. **Journal of Immunology**, v.171, n. 3, p.1466–1472. 2003.

CUGLOVICI, D. A., BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, p.320-326. 2010.

D'ETEREN, G.D.M.; AUTHI'E, E.; WISSOCQ, N.; MURRAY, M. Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v.17, n.1, p.154–175. 1998.

DÁVILA, A. M. R., RAMIREZ, L., SILVA R. A. M. S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.357-358. 1997.

DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S. S.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v.117, p.1–13. 2003.

- DAYO, G.K.; BENGALY, Z.; MESSAD, S.; BUCHETON, BRUNO.; SIDIBE, I.; CENE, B.; CUNY, G.; THEVENON, S. Prevalence and incidence of bovine trypanosomosis in an agro-pastoral area of southwestern Burkina Faso. **Research in Veterinary Science**, v.88, n. 3, p.470–477. 2010.
- DELAFOSSÉ, A.; THEBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p.108–119. 2006.
- DESQUESNES, M.; GARDINER, P. R. Epidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.46, n.3, p.463-470. 1993.
- DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.49, n.315-321. 1996.
- DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.213–231. 2002.
- DESQUESNES, M. **Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America**. OIE & CIRAD, Paris, 2004. 190 pp.
- DESQUESNES, M.; DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, v.119, p.9-19. 2004.
- ELLIS, J.A.; SCOTT, J.R.; MACHUGH, N.D.; GETTINBY, G.; DAVIS, W.C. Peripheral blood leucocytes subpopulation dynamics during *Trypanosoma congolense* infection in Boran and N'Dama cattle: an analysis using monoclonal antibodies and flow cytometry. **Parasite Immunology**, v.9, p.363–378. 1987.
- ESIEVO, K. A. N.; SAROR, D. I. Leukocyte response in experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v.93, p.165-169. 1983.
- ESPINOZA, E.; GONZÁLEZ, N.; ASO, P.; CABALLERO, H.; FUENMAYOR, J.; HIDALGO, L. Leucograma en novillas y becerros (Holstein) Infectados con una cepa venezolana de *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.647-652. 2000.
- FLYNN, J. N.; SILEGHEM, M. The role of the macrophage in induction of immunosuppression in *Trypanosoma congolense*-infected cattle. **Immunology**, v.74, p.310-316. 1991.
- FLYNN, J. N.; MCKEEVER, D. J.; SILEGHEM, M.; NAESSENS, J. Modulation of the phenotype and function of bovine afferent lymph cells during infection with *Trypanosoma congolense*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 40, p.17-29. 1994.

FRANGE, R.C.C. **Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba – MG: Estudo Soroepidemiológico e Relato de Surto**. 2013, 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2013.

GARDINER P.R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317. 1989.

GÓMEZ-PIÑERES, E., TAVARES-MARQUES, L., REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.19, n.3, p.225 – 229. 2009.

GUEGAN, F.; PLAZOLLES, N.; BALTZ, T.; COUSTOU, V. Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Cellular Microbiology**. V.15, n.8, p.1285–1303. 2013.

GUZMAN, E.; PRICE, S.; POULSOM, H.; HOPE, J. Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.148, p.161– 167. 2012.

HARRIS, T. H.; COONEY, N. M.; MANSFIELD J. M.; PAULNOCK D. M. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. **Infection and Immunity**, v.74, n.8, p.4530–4537. 2006.

HILL, E.W.; O’GORMAN, G.M.; AGABA, M.; GIBSON, J.P.; HANOTTE, O.; KEMP, S.J.; NAESSENS, J.; COUSSENS, P.M.; MACHUGH, D.E. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, p.105, p. 247–258. 2005.

HOARE, C. A. **The Trypanosomoses of mammals**, Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

HOOF, L.; VAN HENRARD, C.; PEEL, E. Quelques observations sur les trypanosomes des grands mammifères au Congo Belge. **Acta Trop**, v.5, p.327. 1948.

JONES, T.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitology**, v.2, n.17, p.99-101. 2001.

KIMETO, B. A.; MUGERA, G. M.; NYAGA, P. N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.295-301.1990.

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

MACIEL, A.B.B. **Proposta de avaliação da condição corporal em vacas holandesas e nelores**. 2006, 103f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2006.

- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER,, I.B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P. S.; ALMEIDA, R. F. C.; LIMA J. R, M.M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7. 2006.
- MAGEZ, S.; RADWANSKA, M.; DRENNAN, M.; FICK, L.; BARAL, T. N.; BROMBACHER, F.; DE BAETSELIER, P. Interferon- γ and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during *Trypanosoma congolense* Tc13 infections. **Journal of Infectious Diseases**, v.193, n. 11, p. 1575–1583. 2006.
- MAGONA, J. W.; WALUBENGO, J.; ODIMIN, J. T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica**, v.107, p.186–191. 2008.
- MASAKE, R.A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **Veterinary Record**, v.107, p.551–557. 1980.
- MATTIOLI, R. C.; WILSON, R. T. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in Tropical Africa. **Parassitologia**, v. 38, p. 531-535. 1996.
- MATTIOLI, R.C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.25–35. 2001.
- MELÉNDEZ, M. F.; WILLIAM, F. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Journal of Parasitology**, v.79, p.293–294. 1993.
- McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476p.
- MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.4, p.325-326. 1977.
- MURRAY, M.; DEXTER, T. M. Anaemia in bovine African trypanosomiasis: A review. **Acta Tropica**, v.45, p.389-432. 1988.
- NAESSENS, J.; TEALE, A.J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, p.187-194. 2002.
- NAMANGALA, B.; DE BAETSELIER, P.; NOEL, W.; BRYNS, L.; BESCHIN, A. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 3, p. 387–396. 2001.
- OSÓRIO, A. L. A. R., MADRUGA, C. R., DESQUESNES, M., SOARES, C. O., RIBEIRO, L. R. R. AND DA COSTA, S. C. G. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 1–13.

OGWU, D.; NURU, S. Transplacental transmission of trypanosomes in animals and man. **Veterinary Bulletin**, v.51, p.381-384. 1981.

PAIVA, P.; LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; MORI, A. E.; BRUM, K. B.; BERNARDO, C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n. 2, p. 135-141. 2000.

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of Vertebrate Immunology**. Published by Academic Press, 1998. 439-484p.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L.C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.286-289. 2012.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Reference laboratory values**. In: RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine*. Philadelphia: Saunders, 10.ed. 2007, p. 2065.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of Immunology**, v.155, p.1151–1164. 1995.

SANDOVAL, E.; ESPINOZA, E.; VALLE, A. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. **Veterinaria Tropical**, v.21, n.1, p.13-33. 1996.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S. M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p. 655-663. 2003.

SCHENK, M. A.M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.4, p. 157-161. 2001.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. 4.ed. New Jersey: Wiley-Liss, 2003. 681 p.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p.25-32. 1972.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R.; DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.87–93. 1999.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– **Biologia, diagnóstico e controle**. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.

SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Embrapa, Corumbá-MS, 2004, 21p.

SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S. G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554. 2009.

TABEL, H.; WEI, G.; SHI, M. T cells and immunopathogenesis of experimental African trypanosomiasis. **Immunological Reviews**, v.225, n. 1, p. 128–139. 2008.

TAYLOR, K. A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.219-240. 1998.

TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E.M.-L. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M. **The Trypanosomiasis**. 1. ed, Wallingford: CABI Publishing, 2004. cap. 18, p. 334.

TIZARD, I. **Veterinary Immunology**. Philadelphia: Saunders, 9. ed. 2012, 568 p.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37–48. 2001.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.4, p.645-665. 2006.

WILLIAMS, D. J. L.; TAYLOR, K. A.; NEWSON, J.; GICHUKI, B. The role of anti-variable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. **Parasite Immunology**, v.18, p. 209-218. 1996.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v.27, p.384-386, 1970.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (UNIUBE)



UNIUBE
Educação e Responsabilidade Social

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-022/2013

Uberaba, 06 de junho de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 001/2013 relativo ao projeto intitulado "**Caracterização do perfil sorológico e imunofenotípico de linfócitos periféricos de bovinos infectados experimentalmente por Trypanosoma vivax**" que tem como responsável **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 006/2013 related to the project entitled "**Serological and immunological profile of peripheral lymphocyte bovine experimentally infected with trypanosome vivax**", under the supervision of **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,


Prof. Dr. André Bellico de Vasconcelos
Vice-Coordenador do CEEA-UNIUBE