

RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *TRYPANOSOMA EVANSI* (SARCOMASTIGOPHORA: TRYPANOSOMATIDAE).

*(Humoral immune response of goats experimentally infected with
Trypanosoma evansi (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae))*

*(Respuesta inmune humoral de hembras caprinas experimentalmente
infectadas com Trypanosoma evansi (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae))*

**T. H. C. PATELLI¹, L. C. MARQUES², R. Z. MACHADO³, T. M. F. S. OLIVEIRA⁴,
P. B. PASSOS¹.**

RESUMO

As tripanossomíases constituem uma das mais importantes doenças mundiais do homem e de outros vertebrados. No Brasil, a doença é endêmica no Pantanal mato-grossense. O presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta imunológica humoral de cabras experimentalmente infectadas com *T. evansi*. Foram utilizadas dez fêmeas caprinas, com vários graus de mestiçagem, com idade aproximada de quatro meses, clinicamente sadias e sorologicamente negativas para a presença de anticorpos anti-*T. evansi* (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI). Os animais foram divididos em dois grupos: seis foram inoculados (G1) via intravenosa com $2,38 \times 10^6$ tripomastigotas de *T. evansi* e quatro animais foram utilizados como testemunho (G2). A pesquisa de anticorpos anti-*T. evansi* foi realizada diariamente até o 14º dia após as inoculações (DAI), semanalmente até o 98º DAI e a cada quinze dias até o 364º DAI. Anticorpos anti-*T. evansi* foram identificados no soro dos ovinos inoculados a partir do 14º DAI. Os títulos variaram, sendo a maior titulação obtida $\geq 1:1280$.

PALAVRAS CHAVE: *Trypanosoma evansi*. Tripanossomíase. Caprinos. Resposta imune.

RESÚMEN

Las tripanosomiasis constituyen una de las mas importantes enfermedades mundiales del hombre y de otros vertebrados. En Brazil, la enfermedad es endêmica em el pantanal mato-grossense. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la respuesta inmunológica humoral de cabras experimentalmente infectadas con *T. evansi*. Fueron utilizadas diez hembras caprinas, con vários grados de mestizaje, con edad aproximada de 4 meses, clinicamente sanas e sorológicamente negativas para la presencia de anticuerpos anti-*T. evansi* (Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta – RIFI). Los animales fueron divididos en dos grupos: seis fueron inoculados (G1) via intravenosa con $2,38 \times 10^6$ tripomastigotas de *T. evansi* y cuatro animales fueron utilizados como testimonio (G2). La búsqueda de anticuerpos anti-*T. evansi* fue realizada diariamente hasta el 14º dia después de las inoculaciones (DAI), semanalmente hasta el 98º DAI y cada quince dias hasta

1 Médica Veterinária, Doutoranda em Clínica Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – Unesp, Campus de Jaboticabal, SP. End.Eletrôn.: tpatelli@hotmail.com.br

2 Médico Veterinário, Professor Titular do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – Unesp.

3 Médica Veterinária, Professora Titular do Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – Unesp.

4 Médica Veterinária, Doutoranda em Patologia Veterinária – FCAV – Unesp.

el 364° DAI. Anticuerpos anti-*T. evansi* fueron identificados en el suero de los caprinos, siendo que la mayor titulación obtenida fue $\geq 1:1280$.

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma evansi*. Tripanosomiasis. Caprinos. Respuesta inmune.

SUMMARY

The tripanosomiasis constitutes one of the man's most important world diseases and of another vertebrates, being in Brazil, an endemic disease in the Pantanal regions. The present work had as objective investigated the humoral immune response in goats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Ten crossbreed female goats clinically healthy and serum negative for the presence of antibodies anti-*T. evansi* (IFAT) with approached of 4 months age, were used. The animals were divided in two groups: six were inoculated (G1) intravenous with $2,38 \times 10^6$ tripomastigotes of *T. evansi* and four were kept as non-infected controls (G2). The research of antibodies anti-*T. evansi* was accomplished daily until the 14th day after the inoculations (DAI), weekly up to the 98th (DAI) and to every fifteen days up to the 364th (DAI). Antibodies anti-*T. evansi* were detected in the serum of the goats inoculated starting from the 14th (DAI) and the titles to varied and reaching maximal $\geq 1:1280$.

KEY WORDS: *Trypanosoma evansi*. Tripanosomiasis. Goats. Immune response.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os tripanossomos patogênicos, o *T. evansi* foi o primeiro descoberto em mamíferos. Pertencente ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Trypanozoon*, este protozoário afeta grande número de animais. Griffith Evans, em 1881, isolou e descreveu pela primeira vez a presença dele em sangue de eqüinos e camelos da região de Punjab, na Índia, e sua classificação como pertencente ao gênero *Trypanosoma*, deu-se por Balbiani em 1888, (WOO, 1977).

O *T. evansi* infecta a maioria dos animais domésticos, porém, a evolução, os aspectos clínicos, hematológicos e patológicos nas diferentes espécies animais variam de acordo com a virulência da cepa, a suscetibilidade do hospedeiro e as condições epizooticas (HOARE, 1972). Queiroz et al. (2000) e Queiroz et al. (2001) concluíram que, a despeito da homogeneidade das cepas isoladas, há significativa diferença no padrão de virulência dos isolados de *T. evansi*.

O curso da doença causada por este protozoário pode ser subagudo, agudo e crônico (SINGH e CHAUDRI, 2002). A infecção é caracterizada pelo aparecimento de febre, anemia, seguida por edema e caquexia (HOARE, 1972).

A tripanosomíase geralmente está associada com a supressão da resposta imune, evidenciada pelo avanço da parasitemia. Na imunossupressão ocorre elevação repentina da atividade fagocitária, o que leva a acreditar que não há bloqueio do sistema fagocitário mononuclear (VILLA et al., 2002).

Durante o curso da infecção as ondas de parasitemia são acompanhadas de mudanças na antigenicidade das populações de tripanossomos (WOO, 1977). O hospedeiro

desenvolve uma resposta aos antígenos de superfície dos tripanossomos, que é importante no controle da infecção. Entretanto, essa resposta em eliminar o agente torna-se comprometida pela capacidade do tripanossomo em alterar a matriz de glicoproteínas de sua superfície (VICKERMAN, 1978). Conhecido como variação antigênica, esse fenômeno capacita o parasita a evadir-se da resposta imune do hospedeiro. Portanto, a cada resposta de anticorpos, os parasitas passam a modificar seus antígenos de superfície, fazendo com que o hospedeiro produza uma nova resposta de anticorpos, induzindo, assim, ondas sucessivas de parasitemia e, por sua vez, populações de tripanossomos antigenicamente diferentes (SINGH et al., 1995).

Os métodos imunológicos, ao demonstrarem as reações antígeno-anticorpo, adquirem importância especial no diagnóstico da enfermidade. Dentre esses, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é amplamente utilizada para o diagnóstico das tripanosomíases, tanto no homem quanto nos animais.

Diante da importância de maiores elucidações a respeito da resposta imunológica de *T. evansi* em animais domésticos, esse trabalho teve como objetivo estudar o comportamento da resposta imunológica humoral em caprinos experimentalmente infectados com esse protozoário.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 fêmeas caprinas, com idade aproximada de quatro meses, com variados graus de mestiçagem, clinicamente sadias e sorologicamente negativas (RIFI) para a presença de anticorpos anti-*T. evansi*. Os

animais foram mantidos em baias devidamente teladas, no setor de grandes animais do Laboratório de Pesquisas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp. Durante toda fase experimental os animais receberam água, sal mineralizado, silagem de milho (*Zea mays*) e feno de “coast cross” (*Cynodon dactylon* L.) *ad libitum* e ainda foram suplementados com ração composta por milho (70%) e soja (30%) na proporção de 500g animal/dia. Antes do início do experimento, os animais foram desverminados e submetidos a exames clínicos e laboratoriais, seguindo os mesmos padrões do experimento.

Desses 10 animais, quatro foram mantidos como testemunho e os seis restantes foram inoculados experimentalmente com *T. evansi*.

A cepa de *T. evansi* utilizada foi isolada por Moreira e Machado (1985) de um cão naturalmente infectado. Tripomastigotas sangüícolas desse parasita foram colhidos em solução de Alsever, adicionada de Dimetil sulfoxido (DMSO)⁵ a 10% e criopreservada em nitrogênio a -196°C.

Os caprinos do grupo G1 (02, 06, 07, 08, 09 e 10) foram inoculados, por via intravenosa, com 1 mL do inóculo padronizado, de maneira que cada animal recebeu cerca de $2,38 \times 10^6$ tripomastigotas de *T. evansi*.

Alíquotas de sangue para obtenção de soro foram colhidas, por punção da veia jugular externa, imediatamente antes das inoculações, diariamente até o 14º DAI (dias após a inoculação), semanalmente até o 98º DAI e quinzenalmente até o 364º DAI.

A pesquisa de anticorpos da classe IgG, anti-*T. evansi*, foi realizada pela RIFI, de acordo com a técnica preconizada por Aquino (1997). Os soros foram testados em sucessivas diluições a partir de 1:80. O conjugado empregado foi a gamaglobulina de camundongo anti-IgG de caprino acoplada ao isotiocianato de fluoresceína (IgG de camundongo anti-IgG de caprino – molécula total - Sigma).

Durante o experimento foi realizada prova biológica em ratos no 10º, 40º, 70º, 100º, 130º, 160º, 190º, 220º, 250º, 280º, 310º, 340º, 365ºDAI que constou da inoculação intraperitoneal de 1 mL de sangue de parasitado de cada animal do G1 (inoculado) em ratos Wistar. Após a inoculação, a cada dois dias colheu-se uma gota de sangue da ponta da cauda de cada roedor, visando determinar a presença dos tripanossomos em exame de lâmina direta. Também foram realizados exame da gota espessa e método de concentração de Strout para a confirmação da presença do agente nos animais inoculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa de anticorpos anti-*T. evansi* permitiu

verificar que as primeiras titulações positivas para os anticorpos da classe IgG anti-*T. evansi* ocorreram nos animais 09 e 10 do grupo inoculado no 14º DAI com títulos $\geq 1:80$; nos animais 02 e 06 no 21º DAI com títulos $\geq 1:160$ e nos animais 7 e 8 no 28º DAI com títulos $\geq 1:160$ (Tabela 01).

As titulações variaram nos diferentes dias, sendo o maior título de anticorpos obtido de 1:1280, verificado no grupo inoculado nos seguintes animais: 02 no 49º e 70º DAI; 07 no 98º DAI; 08 no 77º DAI e 09 no 56º e 85º DAI.

Todos os animais do grupo inoculado reagiram positivamente à pesquisa de anticorpos anti-*T. evansi* até o final do experimento. Nos animais do grupo testemunho, em nenhum momento foi detectada a presença desses anticorpos.

No presente trabalho, observou-se que os caprinos inoculados apresentaram resposta imune a partir do 14º DAI. Entretanto, somente os animais 09 e 10 iniciaram a resposta imunológica com titulação $\geq 1:80$, mas os demais animais inicialmente responderam com titulações $\geq 1:160$. No entanto, é importante salientar que a partir do 14º DAI as colheitas passaram a intervalos semanais, podendo os animais que iniciaram com titulação $\geq 1:160$, ter expressado titulações $\geq 1:80$ neste intervalo. Em caprinos infectados com *T. brucei* e *T. vivax*, Luckins (1988) detectou anticorpos no 7º dia após a inoculação, sendo os maiores títulos observados entre 10 e 40 dias pós infecção. Aquino et al. (1999) em estudo experimental em cães observaram anticorpos a partir do 4º DAI, com titulação positiva ($\geq 1:80$) e aumento progressivo e uniforme. Em eqüinos experimentalmente infectados com *T. evansi*, Marques et al. (2001) observaram anticorpos anti *T. evansi* (títulos $\geq 1:50$) a partir do 8º DAI, elevando-se significativamente até a 4ª semana após a inoculação e mantendo-se até o final do experimento.

No grupo de animais inoculados desse experimento, observou-se que os títulos de anticorpos anti-*T. evansi* apresentaram-se elevados, embora tenham oscilado durante todo o período de avaliação (Tabela 01). Esses títulos elevados são oriundos da presença do parasita, confirmada tanto pela parasitemia quanto pelas provas biológicas. A oscilação das titulações observadas neste trabalho pode estar relacionada com a característica antigênica dos tripanossomos, desenvolvendo a capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro. Resultado semelhante foi obtido por Espinoza et al. (2002) que utilizando o método ELISA observaram que em cabras experimentalmente inoculadas com esse hematozoário ocorreu aumento dos anticorpos anti-*T. evansi* a partir do 11º DAI, mantendo-se durante os 36 dias de observação. Entretanto, discordam dos achados de Ghouri et al. (1998) que, em coelhos experimentalmente inoculados com *T. evansi*, observaram que os títulos de anticorpos antitripanossomal elevaram-se até a 7ª semana após a inoculação, posteriormente tendendo ao declínio e

⁵ Labsynth produtos para laboratórios Ltda.

discordam com as observações de Passos (2004) que verificou títulos de anticorpos estabilizados a partir do 90° DAI em ovinos inoculados experimentalmente com esse parasita, sofrendo apenas variações pontuais.

Embora ainda existam amplas lacunas na compreensão da interação hospedeiro-parasita, há indícios de que os anticorpos participem como limitantes da infecção. A resposta imunológica ao *T. evansi* apresenta caráter individual e, portanto, não existe um padrão de resposta definida, dificultando, dessa forma, a compreensão das oscilações das titulações observadas neste experimento. Salienta-se ainda a importância da espécie aqui estudada, uma vez que na literatura compilada

não se encontra bem definido o comportamento dela diante da infecção por *T. evansi*.

Este trabalho permitiu concluir que as cabras experimentalmente infectadas com cepas de *T. evansi* apresentaram titulações de anticorpos anti-*T. evansi* a partir do 14° DAI, sofrendo variações até o final do experimento e comprovando a presença do parasita. Entretanto, necessita-se salientar a importância de ampliar estudos da resposta imunológica dessa tripanossomíase, uma vez amplamente distribuída em diversos países tropicais, como no Brasil, que possam contribuir com a compreensão dos fenômenos nela observados.

TABELA 01 - Títulos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em soros de caprinos inoculados (G1) com *T. evansi* e nos do grupo testemunho (G2) (Jaboticabal, 2006).

DAI*	Caprinos inoculados (G1)							Testemunhos (G2)				
	2	6	7	8	9	10	1	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14	0	0	0	0	80	80	0	0	0	0		
21	160	160	0	0	80	160	0	0	0	0		
28	640	320	160	160	320	320	0	0	0	0		
35	640	320	160	320	320	640	0	0	0	0		
42	640	640	320	320	320	640	0	0	0	0		
49	1280	320	320	640	320	640	0	0	0	0		
56	640	640	160	320	1280	320	0	0	0	0		
63	640	320	160	320	320	640	0	0	0	0		
70	1280	160	160	320	160	320	0	0	0	0		
77	640	320	640	1280	640	640	0	0	0	0		
85	320	160	320	640	1280	640	0	0	0	0		
91	640	320	320	640	320	1280	0	0	0	0		
98	640	320	1280	640	640	640	0	0	0	0		
113	160	160	160	640	640	640	0	0	0	0		
127	640	320	160	160	320	640	0	0	0	0		
141	320	160	320	320	160	160	0	0	0	0		
154	160	320	160	320	160	80	0	0	0	0		
168	320	640	160	160	320	160	0	0	0	0		
182	320	320	160	80	0	80	0	0	0	0		
196	160	320	320	80	80	160	0	0	0	0		
210	160	160	160	160	160	320	0	0	0	0		
223	160	80	160	160	320	320	0	0	0	0		
237	160	80	320	80	320	320	0	0	0	0		
251	80	160	320	320	320	160	0	0	0	0		
265	80	160	160	80	160	80	0	0	0	0		
279	320	320	320	320	160	320	0	0	0	0		
294	320	160	320	160	320	160	0	0	0	0		
308	160	640	320	160	640	320	0	0	0	0		
322	80	320	640	160	80	160	0	0	0	0		
336	80	80	160	80	/	80	0	0	0	0		
350	80	80	160	80	/	80	0	0	0	0		
364	80	0	160	160	/	160	0	0	0	0		

*DAI – dias após a inoculação; / animal 09 sacrificado no DAI 322.

ARTIGO RECEBIDO: Agosto/2006
APROVADO: Outubro/2007

REFERÊNCIAS

- AQUINO, L. P. C. T. **Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da infecção experimental em cães por *Trypanosoma evansi***. 1997. 93f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.
- AQUINO, L. P. C. T., MACHADO, R. Z., ALESSI, A. C., MARQUES, L. C., CASTRO, M. B., MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, n.2, p.255-60, 1999.
- ESPINOZA, E., GONZALEZ, N. PRIMERA, G., RIVERO, E., HIDALGO, L., GONZALES, B. Effects of *Trypanosoma evansi* in goats (*Capra hircus*) infected experimentally. **Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias**, v.12, n.2, p.103-107, 2002.
- GHORUI, S. K., SRIVASTAVA, R. V. N., BANSAL, G. C., BANSAL, M. P. Humoral immune response in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.68, n.6, p.515-517, 1998.
- HOARE, H. E. **The trypanosomiasis of mammals**: a zoological monograph. Oxford: Blackwell, 1972. p.555-93.
- LUCKINS, A. G. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitology Today**, Cambridge, v.4, p.137-142, 1988.
- MARQUES, L. C., MACHADO, R. Z., ALESSI, A. C., AQUINO, L. P. C. T. Humoral immune of horse experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Semina Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.131-133, 2001.
- MOREIRA, R. D., MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do Município de Camapuã, M.S. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 10., 1985, Jaboticabal. **Resumos...**p.66.
- PASSOS, P. B. **Infecção experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcocystis sp.: Sarcocystidae)**. 2004. 236 f. tese (Doutorado em Medicina Veterinária – área de Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- QUEIROZ, A. O., LEGEY, A. P., XAVIER, S. C., JANSEN, A. M. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.965-72, 2001.
- QUEIROZ, A. O., CABELLO, P. H., JANSEN, A. M. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso –Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.92, p.107-18, 2000.
- SINGH, A., CHAUDHRI, S. S. Comparison of efficiency of parasitological methods with Ag-ELISA in *Trypanosoma evansi* infected crossbred calves. **Indian Journal Animal Science**, v.72, n.2, p.117-119, 2002.
- SINGH, V., CHAUDHARI, S. S., KUMAR, S., CHHABRA, M. B. Polyclonal antibody-based antigen detection immunoassay for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in buffaloes and horses. **Veterinary Parasitology**, v.56, p.261-267, 1995.
- VILLA, S. Z., BORJAS, R. D., CARRERO, J. C., ORTIZ, O. L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v.18, n.6, p.272-278, 2002.
- VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, v.273, p.803-813, 1978.
- WOO, P. T. K. Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-Saharan Africa. In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v.1, p.270-295.