

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 02/02/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS  
DE JABOTICABAL**

**TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA  
AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO TRATAMENTO CONTRA  
*Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADOS**

**Paulo Henrique Sampaio**

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS  
DE JABOTICABAL**

**TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA  
AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO TRATAMENTO CONTRA  
*Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADOS**

**Paulo Henrique Sampaio**

**Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli**

Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária)

2017

S192t Sampaio, Paulo Henrique  
Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados / Paulo Henrique Sampaio. -- Jaboticabal, 2017  
xi, 75 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Fabiano Antonio Cadioli  
Banca examinadora: Thais Helena Constantino Patelli, Júlio Augusto Naylor Lisboa, Daniela Bernadette Rozza, Marcos Rogério André

Bibliografia

1. Resistência a drogas. 2. Sinais clínicos neurológicos. 3. Tripanossomíases. 4. Cloridrato de isometamidium. 5. Diacetato de diminazeno. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

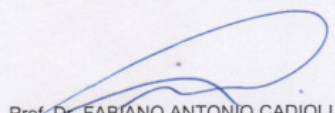
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO TRATAMENTO CONTRA *Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

AUTOR: PAULO HENRIQUE SAMPAIO

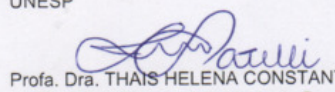
ORIENTADOR: FABIANO ANTONIO CADIOLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:



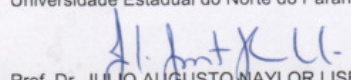
Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



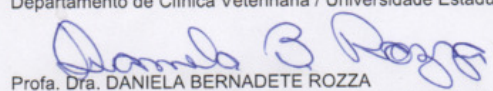
Profa. Dra. THAIS HELENA CONSTANTINO PATELLI

Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes, PR



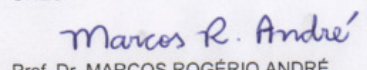
Prof. Dr. JULIO AUGUSTO NAYLOR LISBOA

Departamento de Clínica Veterinária / Universidade Estadual De Londrina, PR



Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Henrique Sampaio, casado, nascido em 17 de setembro de 1986 em Turiúba – SP ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária no Centro Universitário de Rio Preto no ano de 2006, colando grau em janeiro de 2010. Foi bolsista do Programa Universidade Para Todos (PROUNI), participou de projeto de iniciação científica intitulado “Padronização de protocolo de antibioticoterapia no Hospital Veterinário Dr. Halin Atique” e do programa de monitoria junto à disciplina de Bioquímica Metabólica. Em 2011 ingressou no programa de pós-graduação Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo número 2011/03302-2) sob orientação do professor Dr. Fabiano Antonio Cadioli. Defendeu dissertação intitulada “Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax*”, em 18 de fevereiro de 2013. Em março de 2013 ingressou no Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal sob orientação do professor Dr. Fabiano Antonio Cadioli. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo número 2014/11600-1). Durante o curso de mestrado e doutorado participou como colaborador de seis projetos de pesquisa da instituição e de dois projetos de cooperação internacional, tendo publicado 11 artigos científicos.

“Deus não nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,  
capacita os escolhidos.”

**Autor desconhecido**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a meu filho Pedro Henrique Silva Sampaio por representar uma nova fase de minha vida, um motivo a mais para alcançar meus objetivos, um presente de Deus em minha vida que me alegra e inspira com seus simples abraços e carinho. Também dedico a minha esposa Edilene da Costa Silva Sampaio. A meus pais Eva Aparecida dos Santos Sampaio e Alfeu Albino de Sampaio e a minha irmã Maria Estela Sampaio, pois são a base que me mantém firme em momentos de dificuldades durante o árduo caminho da busca por novos conhecimentos que é a essência da ciência.



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pois sem eles nada conseguiria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de doutorado (processo número 2014/11600-1) concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao professor Dr. Fabiano Antonio Cadioli, pela amizade e confiança em me aceitar como orientado desde o mestrado, me proporcionando um grande aprendizado durante a orientação na pós-graduação e consequentemente me tornando um melhor profissional.

À professora Dr<sup>a</sup> Rosangela Zacarias Machado, pelo conhecimento que me doou e pelos caminhos que me guiou na pesquisa científica, a fim de me tornar um melhor profissional.

Ao professor Dr. Marcos Rogério André pela amizade, confiança e conhecimento que me proporcionou durante a pós-graduação.

Aos professores Antonio Carlos Alessi e Rosimeri de Oliveira Vasconcelos pela contribuição em minha tese e, na minha formação durante a pós-graduação.

Ao pós-graduando Otavio Luiz Fidélis Junior e aos estagiários Leticia Bonato e Pedro Henrique Mesquita que me ajudaram na condução do experimento, auxiliando no dia a dia com a coleta de material dos caprinos.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, UNESP – Jaboticabal e Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária Luiz Ricardo Gonçalves, Carlos Antônio de Mattos, Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto, Keyla Carstens Marques de Sousa, Jyan Lucas Benevenuto, Priscila Preve Pereira, Priscila Ikeda, Renan Bressianini do Amaral, Simone de Jesus Fernandes, Rafaela Beraldo e Inalda Ramos, pela amizade e ajuda durante minha permanência no laboratório e fora dele.

A todos aqueles que não citei anteriormente, mas que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico direta ou indiretamente.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 Introdução .....	1
2 Revisão de literatura .....	3
Referências .....	8
CAPÍTULO 2 – <i>Trypanosoma vivax</i> resistente ao tratamento com diaceturato de diminazeno e cloridrato de isometamidium em caprinos experimentalmente infectados .....	15
Resumo .....	15
1 Introdução .....	16
2 Material e métodos.....	17
2.1 Comissão de ética.....	17
2.2 Animais e período experimental .....	17
2.3 Determinação da parasitemia.....	18
2.4 Testes sorológicos.....	18
2.4.1 RIFI.....	18
2.4.2 ELISA .....	19
2.5 Testes moleculares .....	20
2.5.1 cPCR e LAMP .....	20
2.6 Análise estatística.....	21
3 Resultados .....	22
3.1 Parasitemia .....	22
3.2 Testes sorológicos.....	22
3.2.1 RIFI.....	22
3.2.2 ELISA .....	23

3.3 Testes moleculares .....	23
3.3.1 cPCR e LAMP .....	23
3.4 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do ELISA .....	24
4 Discussão.....	24
5 Conclusão .....	29
Conflito de interesse.....	30
Agradecimentos .....	30
Referências .....	30
CAPÍTULO 3 – Resistência ao diaceturato de diminazeno e cloridrato de isometamidium e implicações na recuperação do perfil hematológico de caprinos infectados por <i>Trypanosoma</i> <i>vivax</i> .....	
	40
Resumo .....	40
1 Introdução .....	41
2 Material e métodos.....	41
2.1 Comissão de ética.....	41
2.2 Animais e período experimental .....	42
2.3 Análise hematológica e determinação da parasitemia .....	42
2.4 Análise estatística.....	43
3 Resultados .....	43
4 Discussão e conclusão.....	45
Conflito de interesse.....	47
Agradecimentos .....	47
Referências .....	48
CAPÍTULO 4 – <i>Trypanosoma vivax</i> causa lesões no encéfalo mesmo na ausência de sinais neurológicos .....	
	60
Resumo .....	60
1 Introdução .....	61
2. Material e métodos.....	62
2.1 Comissão de ética.....	62
2.2 Grupos experimentais .....	62

2.3 Infecção experimental .....	62
2.4 Tratamento .....	62
2.5 Eutanásia .....	63
2.6 Análise histopatológica.....	63
3 Resultados .....	63
4 Discussão.....	64
5 Conclusão .....	68
Conflito de interesse.....	68
Agradecimentos .....	69
Referências .....	69

## TÉCNICAS SOROLÓGICAS E MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO TRATAMENTO CONTRA *Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

**RESUMO** – *Trypanosoma vivax* é hemoparasita que infecta ruminantes e causa grandes perdas econômicas na pecuária, reduzindo os índices produtivos e reprodutivos dos animais. A principal alteração causada pelo parasita é anemia, podendo em alguns casos levar a sinais clínicos neurológicos e eventualmente levar o animal ao óbito. Os sinais clínicos são inespecíficos, fato que dificulta seu diagnóstico. O correto diagnóstico e tratamento são fundamentais para o efetivo controle da doença. Desta forma, o presente trabalho objetivou utilizar a LAMP, cPCR, RIFI e ELISA como ferramentas diagnósticas para verificar a cura parasitológica e soronegativação de caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax* após o tratamento com o diaceturato de diminazeno (DM) ou cloridrato de isometamidium (ISM), além de avaliar as alterações histopatológicas do encéfalo para esclarecer melhor os mecanismos que levam a manifestações neurológicas. No presente trabalho detectamos anemia nos animais experimentalmente infectados por *T. vivax* e o parasita apresentou resistência a ambos os medicamentos, a qual foi comprovada por métodos sorológicos e moleculares. Também foram detectadas alterações na celularidade do neurópilo de animais infectados, o que pode resultar em danos aos neurônios e no desenvolvimento dos sinais clínicos neurológicos nos animais cronicamente infectados. Concluímos que o isolado testado no experimento foi resistente aos quimioterápicos testados, sendo a melhor forma de diagnóstico a associação dos métodos sorológicos e moleculares, e que *T. vivax* causa alteração da celularidade do neurópilo.

**Palavras-chave:** Resistência a drogas, sinais clínicos neurológicos, tripanossomias, cloridrato de isometamidium, diaceturato de diminazeno.

**SEROLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES IN TREATMENT  
EFFECTIVENESS EVALUATION AGAINST *Trypanosoma vivax* IN GOATS  
EXPERIMENTALLY INFECTED**

**ABSTRACT** - *Trypanosoma vivax* is a hemoparasite that infects ruminants and causes huge economic losses in livestock, reducing animals productive and reproductive indexes. The main alteration caused by this parasite is anemia and may eventually lead animal to death. The clinical signs are nonspecific which explains the correct diagnosis difficult. Correct diagnosis and treatment are essential for the effective control of this disease. Thus, the goals of this present work was use tools diagnostics molecular (LAMP and PCR) and serological (ELISA and IFAT) to verify the parasitological cure and seronegativation of goats experimentally infected with *T. vivax* after treatment with diminazene diaceturate (DM) or isometamidium hydrochloride (ISM), besides assess histological alterations in ruminants' brains to elucidate the mechanism that cause neurologic disorders. In our study we detected anemia and, parasitic resistance to both drugs in animals experimentally infected with *T. vivax*, which was confirmed by serologic and molecular methods. Additionally, we detected alterations in neuropyl cells of infected animals, which may cause injuries in neuron and consequently neurologic signs in chronic infected animals. Therefore, we conclude that the tested *T. vivax* isolate was resistant to both drugs, being the best way of diagnosis is the association of serologic and molecular methods and *T. vivax* cause alterations in neuropyl cells.

**Keywords:** Drugs-resistance, neurologic signs, trypanosomiasis, isometamidium hydrochloride, diminazene diaceturate.

## LISTA DE ABREVIACÕES

A6-ATPase - Subunidade A6 da ATP sintase  
B3 - Oligonucleotídeo externo anti-sense  
BCA - Ácido bicincôninico  
BHE - Barreira hematoencefálica  
BIP - Oligonucleotídeo interno anti-sense  
BST - DNA polimerase do *Bacillus stearothermophilus*  
CatL-Like - Catepsina L-like  
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média  
cPCR - Reação em cadeia pela polimerase convencional  
DAI - Dias após a inoculação  
DM - Diacetato de diminazeno  
DNA - Ácido desoxiribonucléico  
DNase - Desoxirribonuclease  
DP - Desvio padrão  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA - Ensaio de Imunoadsorção enzimático  
F3 - Oligonucleotídeo externo sense  
FIP - Oligonucleotídeo interno sense  
GAPDH - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase  
GVS - Glicoproteínas variantes de superfície  
HCM - Hemoglobina corpuscular media  
IC - Intervalo de confiança  
ISM - Cloridrato de isometamidium  
K - Coeficiente Kappa de Cohen (1960)  
LAMP - Amplificação circular isotérmica de DNA  
LoopB - Oligonucleotídeo circular anti-sense  
LoopF - Oligonucleotídeo circular sense  
OD - Densidade óptica  
PB - Prova biológica  
PBS – Solução salina tamponada  
PC - Ponto de corte  
qPCR - Reação em cadeia pela polimerase em tempo real  
RIFI - Reação de imunofluorescência indireta  
RNA - Ácido ribonucleico  
RNase - Ribonuclease  
RPS12 - Proteína ribossomal S12  
SNC - Sistema nervoso central  
VGM - Volume globular médio

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 2

Tabela 1	Descrição detalhada dos resultados da RIFI para o diagnóstico de <i>T. vivax</i> referente às amostras de soros dos grupos ISM e DM durante todo o período experimental.....	38
Tabela 2	Descrição detalhada dos resultados da RIFI para o diagnóstico de <i>T. vivax</i> referente às amostras de soros do grupo PB durante todo o período experimental.....	38
Tabela 3	Descrição detalhada dos resultados da cPCR para diagnóstico de <i>T. vivax</i> baseada em um fragmento de 177 pares de base da região gênica do domínio catalítico CatL-Like referente às amostras dos grupos ISM e DM durante todo o período experimental.....	39
Tabela 4	Descrição detalhada dos resultados da LAMP baseada em um fragmento da sequência de DNA satélite específica para o diagnóstico de <i>T. vivax</i> referente às amostras dos grupos ISM e DM durante todo o período experimental.....	39

### CAPITULO 4

Tabela 1	Achados histopatológicos em diferentes regiões do encéfalo de ruminantes infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> nas fases aguda e crônica da infecção.....	75
----------	---	----



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Delineamento experimental da infecção de caprinos pelo isolado Lins de <i>T. vivax</i> para avaliação da efetividade do tratamento com os quimioterápicos ISM e DM.....	36
Figura 2	Média da parasitemia (tripomastigotas/mL) em caprinos dos grupos ISM e DM experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> (isolado Lins), em cada dia da infecção experimental.....	36
Figura 3	Variação da densidade óptica pelo ELISA das amostras de soro de caprinos experimentalmente infectados com <i>T. vivax</i> e tratados com cloridrato de isometamidium durante todo período experimental.....	37
Figura 4	Variação da densidade óptica pelo ELISA das amostras de soro de caprinos experimentalmente infectados com <i>T. vivax</i> e tratados com diaceturato de diminazeno durante todo período experimental.....	37
Figura 5	Variação da densidade óptica pelo ELISA das amostras de soro de caprinos utilizados como prova biológica dos caprinos experimentalmente infectados com <i>T. vivax</i> e tratados com cloridrato de isometamidium e diaceturato de diminazeno durante todo período experimental.....	38

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Média da parasitemia (tripomastigotas/mL) em caprinos dos grupos ISM e DM experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> (isolado Lins), em cada dia da infecção experimental.....	53
Figura 2	Média e desvio padrão dos valores de eritrócitos, hematócrito e teores de hemoglobina de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> na fase aguda. Asterisco (*) na parte superior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1.....	54
Figura 3	Média e desvio padrão dos valores dos índices VGM, HCM e CHCM de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> na fase aguda. Asterisco (*) na parte superior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1.....	55
Figura 4	Média e desvio padrão dos valores absolutos de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> na fase aguda.	

	Asterisco (*) na parte superior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1.....	56
Figura 5	Média e desvio padrão de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> dos grupos ISM e DM no período pré-infecção (D-1) e no período pós-tratamento (16-45 DAI). Asterisco (*) na parte inferior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo ISM e $\mp$ na parte superior do momento indica ausência de diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo DM.....	57
Figura 6	Média e desvio padrão dos valores dos índices VGM, HCM e CHCM de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> dos grupos ISM e DM no período pré-infecção (D-1) e no período pós-tratamento (16-45 DAI). Asterisco (*) na parte inferior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo ISM e $\mp$ na parte superior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo DM.....	58
Figura 7	Média e desvio padrão de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de caprinos experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> dos grupos ISM e DM no período pré-infecção (D-1) e no período pós-tratamento (16-45 DAI). Asterisco (*) na parte inferior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo ISM e $\mp$ na parte superior do momento indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do referido momento em relação a D-1 no grupo DM.....	59
<b>CAPITULO 4</b>		
Figura 1	Fotomicrografias de encéfalos de ruminantes infectados por <i>T. vivax</i> . A/B - Encéfalos de caprinos (C) infectados por <i>T. vivax</i> na fase aguda. Hemorragia (seta) em córtex (A); Gliose em pedúnculo cerebelar (B). C/H - encéfalos de bovinos (grupo N) cronicamente infectados. C - Hemorragia (seta) em tronco encefálico; D - Manguitos perivascularares (seta) em córtex; E - Tumefação axonal (seta) em pedúnculo cerebelar; F - Gliose (*) em substância cinzenta cerebelar; G - Tumefação axonal (seta) em óbex; H - Cromatólise (seta) em córtex. Objetiva 40X. HE.....	73

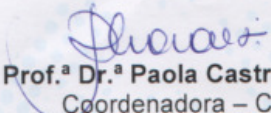
## Figura 2

Esquema mostrando a possível patogenia da infecção por *T. vivax* no SNC de ruminantes. A: SNC normal. Entrada do *T. vivax* (seta) no SNC via hematogena. B: Provável liberação de proteases do parasita leva a quebra da BHE (edema, hemorragia e infiltrado inflamatório), aumento da permeabilidade vascular (cabeça de seta: Tight-junctions) e da celularidade do neurópilo (astrocitose e microgliose), em resposta ao parasita, resultando em neuronofagia, devido à necrose neuronal.....

**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 023783/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de dezembro de 2014.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.



**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1 Introdução

Tripanossomíases são doenças cosmopolitas que acometem humanos e animais. *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* causam importantes prejuízos econômicos em rebanhos animais, sendo *T. vivax* responsável por vultosas perdas econômicas na bovinocultura da África, Ásia, Américas Central e do Sul (DÁVILA e SILVA, 2000; DESQUESNES et al., 2013).

No Brasil, infecções por *T. vivax* em ruminantes têm ocorrido com frequência cada vez maior, sendo que nas duas últimas décadas já foram observados surtos na Paraíba (BATISTA et al., 2008), Maranhão (FEITOSA JÚNIOR et al., 2004), Tocantins (LINHARES et al., 2004), Minas Gerais (CUGLOVICI et al. 2010), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Pernambuco (PIMENTEL et al., 2012), São Paulo (CADIOLI et al., 2012) e Santa Catarina (FÁVERO et al., 2016). O impacto econômico desta doença ainda não está completamente esclarecido, muito embora os trabalhos acima relacionados indiquem grandes prejuízos à produção de carne, leite, reprodução, além da alta mortalidade no rebanho.

A transmissão do *T. vivax* pode ser feita ciclicamente por moscas *Glossina* sp. na África ou aciclicamente por tabanídeos e moscas hematófagas na América Latina e em áreas livre de tsé-tsé na África (JONES e DAVILA, 2001), além da transmissão iatrogênica, por fômites, e provavelmente por via transplacentária (CADIOLI et al., 2012; BATISTA et al., 2012).

A sintomatologia é inespecífica (CADIOLI et al., 2012), incluindo casos de animais com desordens neurológicas (BATISTA et al., 2007; CADIOLI et al., 2012). Entretanto, não está esclarecido qual o mecanismo fisiopatológico que leva a tais alterações neurológicas. A inespecificidade dos sinais clínicos leva a dificuldade do diagnóstico desta enfermidade, sendo necessário o emprego de ferramentas diagnósticas que auxiliem esse processo.

Os métodos de diagnóstico parasitológicos são de valor limitado nos casos de baixa parasitemia ou aparasitemia (NANTULYA, 1990). Desta forma, o diagnóstico

sorológico, baseado na resposta imunológica, como RIFI e ELISA, são métodos de escolha para triagem nos rebanhos afetados, indicando contato prévio com o parasita, mas não necessariamente infecção ativa (SAMPAIO et al., 2015). Por muito embora, devam ser combinados a métodos moleculares para o diagnóstico em animais cronicamente infectados, em período aparasitêmico (CADIOLI et al., 2015).

Depois da confirmação do diagnóstico, o tratamento pode ser realizado com diaceturato de diminazeno (DM) ou cloridrato de isometamidium (ISM), que são os fármacos aprovados para uso contra trypanosomas no Brasil, embora haja relatos de resistência a DM em isolados brasileiros (CADIOLI et al., 2012) e, até o presente momento, não há indícios de resistência ao ISM em isolados brasileiros.

Em razão das dificuldades no estabelecimento do diagnóstico deste protozoário, da necessidade da correta detecção de animais verdadeiramente curados da infecção por *T. vivax*, bem como, melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas desordens neurológicas de animais infectados por *T. vivax* o presente estudo é justificado.

Com esse objetivo foram utilizadas técnicas sorológicas e moleculares como ferramentas diagnósticas para verificar a cura parasitológica de caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax* após o tratamento com o DM e ISM. Além disso buscou-se investigar a presença de DNA de *T. vivax* pela amplificação circular isotérmica de DNA (LAMP) e reação em cadeia pela polimerase convencional (cPCR) em amostras de sangue de caprinos experimentalmente infectados antes e após o tratamento com ISM e DM, detectar anticorpos anti-*T. vivax* pela RIFI e ELISA em amostras de soro de caprinos experimentalmente infectados antes e após o tratamento com ISM e DM, analisar o perfil hematológico de caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax* antes e após o tratamento com DM e ISM e avaliar alterações histopatológicas do encéfalo de ruminantes infectados por *T. vivax* para esclarecimento da fisiopatologia nas desordens neurológicas.