

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO PARA INOS,
CARGA PARASITÁRIA, PARASITEMIA E LESÕES
EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS WISTAR
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM
*Trypanosoma evansi***

**Priscila Prêve Pereira
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO PARA INOS,
CARGA PARASITÁRIA, PARASITEMIA E LESÕES
EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS WISTAR
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM
*Trypanosoma evansi***

Priscila Prêve Pereira

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli

**Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutora em
Medicina Veterinária, área: Clínica Médica
Veterinária**

2017

P436r Pereira, Priscila Préve
Relação entre imunomarcção para iNOS, carga parasitária, parasitemia e lesões em diferentes órgãos de ratos Wistar experimentalmente infectados com Trypanosoma evansi / Priscila Préve Pereira. -- Jaboticabal, 2017
iv, 38 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Fabiano Antonio Cadioli

Banca examinadora: Paulo César Ciarlini, Rosangela Zacarias Machado, Adriana Coelho de Souza, Geórgia Modé Magalhães

Bibliografia

1. Imunohistoquímica. 2. Óxido Nítrico. 3. Parasitemia. 4. radicais livres. 5. Trypanosomiasis. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:599.323


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO PARA INOS, CARGA PARASITÁRIA, PARASITEMIA E LESÕES EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS WISTAR EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi*

AUTORA: PRISCILA PRÉVE PEREIRA

ORIENTADOR: FABIANO ANTONIO CADIOLI


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



Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FMVA/UNESP - Araçatuba



Prof. Dra. ADRIANA COELHO DE SOUZA
Departamento de Patologia Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Prof. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES
Departamento de Medicina Veterinária / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais / Muzambinho/MG

Jaboticabal, 20 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PRISCILA PREVE PEREIRA – nascida em vinte seis de fevereiro de 1987, na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, filha de Wanderley Antônio Pereira e Valdete Préve Pereira. Formou-se em Medicina Veterinária em dezembro do ano de 2010, pela Universidade do Estado De Santa Catarina, Centro de ciências Agroveterinárias CAV/ UDESC/LAGES. Durante a graduação foi aluna de iniciação científica de fevereiro de 2008 a julho de 2010, na área de patologia clínica veterinária. Realizou o curso de Mestrado, no programa de Medicina Veterinária em ciência animal pela Faculdade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária FMVA/UNESP/Araçatuba entre fevereiro de 2012 a janeiro 2014, período em que realizou o estudo intitulado “Efeito das toxinas urêmicas e ácido guanidinoacético sobre o metabolismo oxidativo e apoptose em neutrófilos de cães”. Em março de 2014, ingressou no curso de Doutorado no programa de Medicina Veterinária na área de Clínica Medica Veterinária.

EPÍGRAFE

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior do que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança.”

Stephen Hawking

A Deus,

E, aos meus pais, Valdete Prêve Pereira e Wanderley Antônio Pereira, pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Obrigado por me ensinarem que a verdadeira felicidade é aquela que vem através de nossas reais conquistas.

E a todos os animais que foram utilizados nesse trabalho, que serão importantes na saúde humana e de outros animais.

Dedico

*“Passa uma borboleta por diante de mim
e pela primeira vez no universo eu reparo
que as borboletas não têm cor nem
movimento,
assim como as flores não têm perfume nem
cor.*

*A cor é que tem cor nas asas da borboleta,
no movimento da borboleta o movimento é que
se move, o perfume é que tem perfume no
perfume da flor.
A borboleta é apenas borboleta
e a flor é apenas flor.”*

Fernando Pessoa (Passa uma Borboleta)

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

Aos meus pais, por todo apoio emocional que me deram nesse período.

Ao Professor Fabiano Antonio Cadioli pela orientação e por acreditar no meu trabalho.

À professora Rosangela Zacarias Machado, por me auxiliar na execução do meu projeto e sempre dividir seu conhecimento e carinho nesse período importante.

À professora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por sua disponibilidade em sempre compartilhar seu conhecimento e permitir que eu utilizasse o laboratório de imunohistoquímica.

Ao professor Marcos Rogério André, por me orientar no estágio de docência e permitir que eu executasse meu experimento no laboratório de imunoparasitologia do departamento de patologia veterinária.

A todos os meus colegas de trabalho do departamento de patologia veterinária, em especial Mayara Caroline Rosolem que me auxiliou nas técnicas de imunohistoquímica e nas leituras das lâminas histopatológicas, e Otavio Luiz Fidelis Junior e Paulo Henrique Sampaio que além de amigos, compartilharam conhecimento e me auxiliaram nesse projeto.

SUMÁRIO

	Páginas
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	ii
RESUMO	iii
Palavras-chave.....	iii
ABSTRACT	iv
Keywords.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Objetivos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Grupos experimentais	8
3.2. Análise histopatológica	8
3.3. Análise Imuno-histoquímica.....	9
3.4. Análise Estatística.....	11
4. RESULTADOS	12
5. Discussão	30
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS.....	35

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



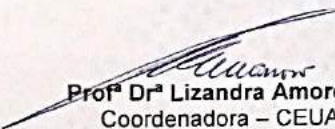
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Estresse oxidativo tecidual em ratos Wistar diabéticos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi***", protocolo nº 23074/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/06/2016 a 01/06/2017
Espécie / Linhagem	Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Nº de animais	100
Peso / Idade	100 gramas / 30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério da UNESP de Botucatu

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

RELAÇÃO ENTRE AS IMUNOMARCAÇÃO PARA iNOS, CARGA PARASITÁRIA, PARASITEMIA E SUAS LESÕES EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS WISTAR EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM TRYPANOSOMA EVANSI

RESUMO-*Trypanosoma evansi* acomete diversas espécies de animais em todo o mundo. A infecção se caracteriza por intensa parasitemia associada a anemia, que evolui para lesões teciduais atribuídas à resposta autoimune do hospedeiro. O objetivo desse estudo foi avaliar a evolução da infecção experimental pelo *Trypanosoma evansi* até as fases mais tardias da infecção, a partir das lesões patológicas, estresse oxidativo tecidual, parasitemia e parâmetros hematológicos. Para tal, os ratos infectados com *T. evansi* foram eutanasiados aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação (DAI), os animais foram anestesiados, e posteriormente colhidos 5 ml de sangue intracardíaco com anticoagulante etileno diamino tetra acetato de sódio (EDTA). Os achados histopatológicos foram avaliados de acordo com o tipo de lesão e a incidência de *T. evansi*, sendo descrita a localização da lesão e determinada a intensidade por escores. O estresse oxidativo foi avaliado a partir da resposta imune celular por imunomarcações da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de imunohistoquímica. A carga parasitária foi detectada pela imunomarcação do parasita pela mesma técnica. Foi notada uma acentuada anemia no DAI 21. No baço, a hiperplasia linfóide em todos os momentos, evidenciando-se no DAI 35. No coração, presença de parasitas no interior de vasos e câmaras ventriculares, no DAI 21 e infiltrado inflamatório polimorfonuclear em todos os momentos, porém, extremamente acentuado no DAI 28. Nos rins notou-se a presença do parasita a partir do DAI 14 associado a uma nefrose tóxica. Nos pulmões poucos parasitas, espessamento de septos alveolares, hemorragia em todo período da infecção e infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Nos linfonodos poplíteos com parasitas a partir do DAI 28 e intensa presença de mastócitos (MCs) em DAI 21. No encéfalo, foi observado a descontinuidade da barreira hematoencefálica, em DAI 21. Os resultados foram importantes para elucidar a infecção por tripanossomíases, e o hospedeiro nos diferentes momentos diante desse cenário. Em todos os órgãos foram detectados a presença de parasita por imuno-histoquímica, apresentando maior intensidade em DAI21, e nos próximos momentos reduzindo significativamente. Assim como a intensidade de células imunomarcadas para o óxido nítrico foi alta entre DAI14 e DAI 21 e após esse momento reduziram. Os dados mostram que o óxido nítrico pode lesionar os tecidos do hospedeiro como o parasita, e assim reduzindo a carga parasitária.

Palavras-chave: imunohistoquímica, óxido nítrico, parasitemia, radicais livres, trypanossomíases

RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNOMARKEYS IN iNOS, PARASITIC CHARGE, PARASITEMIA AND ITS INJURIES IN DIFFERENT WISTAR RAT ORGANS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH TRANSPANOSOMA EVANSI

ABSTRACT-Trypanosoma evansi affects several species of animals worldwide. The infection is characterized by intense parasitemia associated with anemia, which evolves to tissue lesions attributed to the host's autoimmune response. The objective of this study was to evaluate the evolution of the experimental infection by Trypanosoma evansi until the later stages of the infection, from the pathological lesions, tissue oxidative stress, parasitemia and hematological parameters. To that end, mice infected with T. evansi were euthanized at 7, 14, 21, 28 and 35 days after inoculation (DAI), animals were anesthetized, and 5 ml of intracardiac blood was then collected with anticoagulant ethylene diamine tetraacetate sodium (EDTA). The histopathological findings were evaluated according to the type of lesion and the incidence of T. evansi. The location of the lesion was described and the intensity determined by scores. Oxidative stress was evaluated from the cellular immune response by immunostaining of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunohistochemistry. The parasite load was detected by immunolabeling the parasite by the same technique. It was noted a marked anemia in DAI 21. In the spleen, lymphoid hyperplasia at all times, evidenced in DAI 35. In the heart, presence of parasites inside vessels and ventricular chambers, in DAI 21 and polymorphonuclear inflammatory infiltrate in all. However, the presence of the parasite from the DAI 14 associated with a toxic nephrosis was observed in the kidneys. In the lungs few parasites, thickening of alveolar septa, hemorrhage throughout the infection period and polymorphonuclear inflammatory infiltrate. In popliteal lymph nodes with parasites from DAI 28 and intense presence of mast cells (MCs) in DAI 21. In the brain, the discontinuity of the blood-brain barrier was observed in DAI 21. The results were important to elucidate the infection by trypanosomiasis, and the different moments in front of this scenario. In all organs the presence of parasite was detected by immunohistochemistry, showing a greater intensity in DAI21, and in the next moments reducing significantly. As well as the intensity of cells immunolabelled for nitric oxide was high between DAI14 and DAI 21 and after that time reduced. The data show that nitric oxide can injure host tissues like the parasite, and thus reduce parasitic burden.

Keywords: immunohistochemistry, nitric oxide, parasitemia, free radicals, trypanosomiasis

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi possui ampla distribuição mundial, ocorrendo na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul (DESQUESNES et al., 2013). Embora anteriormente *T. evansi* não fosse considerado uma zoonose, recentemente surgiram confirmações de seu potencial zoonótico (JOSHI et al., 2006). Há inúmeros relatos de infecções em animais domésticos como equídeos, bovinos, cães, gatos e pequenos ruminantes, além de camelos, capivaras, quatis, veados e coelhos (Biswas et al. 2001; Cadioli et al. 2006; Verdillo et al. 2012).

Ratos Wistar são altamente susceptíveis ao *T. evansi*, o que os torna modelos experimentais importantes (Silva et al. 2007; Gressler et al. 2009). Em ratos experimentalmente infectados foram observadas anemia intensa, caquexia e sinais clínicos neurológicos (CADIOLI et al., 2006).

Há muito tempo supõe-se que as lesões relacionadas à infecção pelo *T. evansi*, ocorrem de modo indireto, pela capacidade deste hemoparasita em substituir suas glicoproteínas variantes de superfícies (GVS), um importante mecanismo de evasão do sistema imune, mas que conduz à autoimunidade (MACGREGOR et al., 2013), levando a danos teciduais por imunocomplexos.

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um dos mecanismos para fisiopatogenia de doença causada por *T. evansi* (MURRAY et al., 2008). Assim, entre os marcadores de estresse oxidativo o óxido nítrico (NO) é considerado importante por reagir com moléculas biológicas e outras espécies reativas de oxigênio (TATSCH et al., 2011). Já se sabe que o NO plasmático se apresenta elevado em infecções experimentais por *T. evansi* e torna-se genotóxico tanto para o hospedeiro como para o parasita (BALDISSERA et al, 2016).

No exame anatomopatológico em ratos, podem ser observadas mucosas pálidas, edema do tecido subcutâneo e órgãos linfoides (OHAERI, 2010). Em coelhos, esplenomegalia, hepatomegalia, congestão acentuada dos pulmões e presença de líquido na cavidade peritoneal (RAYULU e REDDY, 2015). No exame histopatológico realizado em órgãos de equídeos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* podem ser detectadas alterações no cérebro, cerebelo e

medula espinhal, relacionados a meningoencefalite e mielite (CADIOLI et al., 2006), lesões similares foram observadas em ratos Wistar (SILVA; CEOLIN; OLIVEIRA, 2007) e em outros roedores, nos quais há predomínio de lesões degenerativas em baço, fígado, pulmão, coração e rins (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001). Outros órgãos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi* como adrenais e encéfalo também são seriamente afetados, apresentando degeneração, trombose e infiltrados inflamatórios, além do esgotamento das reservas de tecido adiposo (RAYULU; REDDY, 2015).

Os estudos realizados com *T. evansi* nas diferentes espécies de animais avaliaram a infecção em apenas um momento da infecção. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar o estresse oxidativo de acordo com a evolução da infecção por *T. evansi* em diferentes momentos de acordo com a parasitemia, parâmetros hematológicos e lesões patológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Trypanosoma evansi é um protozoário responsável pela doença conhecida como “mal das cadeiras” ou “Surra” (DESQUESNES et al., 2013), sendo considerado recentemente uma zoonose, em 2005 na Índia foi relatado o primeiro caso de infecção por *T.evansi* em humanos (JOSHI et al., 2006). Há inúmeros relatos de infecções por este parasita em animais domésticos como equídeos (RODRIGUES et al., 2005), bovinos (SILVA; OLIVEIRA, 2007), cães (DE AQUINO et al., 1999), gatos (TARELLO, 2005; DA SILVA et al., 2009), coelhos (UCHE; JONES, 1992; SILVA et al., 2008) e ratos Wistar (BALDISSERA et al., 2016b).

O *Trypanosoma evansi* tem origem Africana, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, seção Salivaria, pelo fato do parasita se desenvolver na parte anterior do trato digestivo do inseto (BRUN; HECKER; LUN, 1998). A transmissão do *T. evansi* é principalmente mecânica através dos insetos hematófagos dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxis* e *Haematobia* além do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (DESQUESNES et al., 2013).

Trypanosoma evansi possui ampla distribuição mundial, ocorrendo na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul (DESQUESNES et al., 2013). Surtos recentes do *T. evansi* na Europa indicam que as áreas de ocorrência desse hemoprotozoário estão em expansão (GUTIERREZ et al., 2010).

No Brasil, o Pantanal mato-grossense é considerado região endêmica, na qual o parasita gera prejuízos da ordem US\$ 2,4 milhões anuais, afetando 6.462 equinos por ano de uma população de 49.000 animais (SEIDL et al., 1998). Infecções por tripanossomos patogênicos em rebanhos animais têm ocorrido com frequência maior fora das áreas endêmicas, sendo os últimos casos relacionados ao *T. evansi*, relatados na região Sul do Brasil (RODRIGUES et al., 2005).

O curso da infecção é variável e depende de seu isolado e do hospedeiro afetado (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001). A doença causada por *T. evansi*

é caracterizada por rápida perda de peso, febre intermitente, anemia, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo e fraqueza progressiva. Em equídeos causa lesões no sistema nervoso central, que culmina com incoordenação dos membros pélvicos, fato que originou sua denominação popular de “mal das cadeiras” (RODRIGUES et al., 2009). Os animais afetados podem morrer dentro de semanas, entretanto as infecções crônicas duram meses (CADIOLI et al., 2006).

Ratos são altamente susceptíveis ao *T. evansi* o que os torna modelos experimentais importantes para a doença causada por este tripanossomo (DA SILVA et al., 2009). Em ratos Wistar experimentalmente infectados pelo *T. evansi* foram observadas anemia intensa e marcada perda de peso, incluindo sinais clínicos neurológicos (CADIOLI et al., 2006). Adicionalmente, o *T. evansi* é ávido consumidor da glicose plasmática, sendo capaz de causar hipoglicemia severa, achado comum nos animais infectados (CADIOLI et al., 2006)

Há muito tempo supõe-se que as lesões relacionadas à infecção pelo *T. evansi*, ocorrem de modo indireto, pela capacidade deste hemoparasita em substituir suas glicoproteínas variantes de superfícies (GVS), um importante método de evasão do sistema imune, mas que conduz à autoimunidade (MACGREGOR; MATTHEWS, 2012) levando a danos teciduais por imunocomplexos.

No exame anatomopatológico em ratos Wistar podem ser observadas mucosas pálidas, edema do tecido subcutâneo, de órgãos linfoides, atrofia serosa da gordura (OHAERI, 2010), esplenomegalia, hepatomegalia, congestão acentuada dos pulmões, a presença de líquido na cavidade peritoneal (RAYULU; REDDY, 2015).

No exame histopatológico em equídeos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* podem ser detectadas alterações no cérebro, cerebelo e medula espinhal, também podem ser encontrados meningoencefalite e mielite moderada difusa, comprovável envolvimento dos nervos (CADIOLI et al., 2006), lesões similares foram observadas em ratos Wistar (DA SILVA et al., 2012).

Outros órgãos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi* como adrenais, fígado, baço, coração, rins e encéfalo também são seriamente afetados, apresentando degeneração, trombose e infiltrados inflamatórios, além do esgotamento das reservas de tecido adiposo (RAYULU; REDDY, 2015). *T. evansi* já foi detectado em tecidos do encéfalo de cavalo naturalmente infectado por técnica de imunohistoquímica utilizando o complexo avidina- biotina-peroxidase (RODRIGUES et al., 2009), também foi observado em cérebro de *Cervus porcinus* utilizando o complexo estreptoavidina-biotina (TUNTASUVAN et al., 2000). Embora, não há relatos de sua imunomarcagem em outros tecidos, há diversos trabalhos demonstrando lesões em diferentes tecidos em decorrência da infecção por *T. evansi* (CADIOLI et al., 2006); (RAYULU; REDDY, 2015); (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001); (DA SILVA et al., 2012).

Poucos estudos demonstram o tipo de resposta celular tecidual utilizando imunohistoquímica em infecções por este hematozoário. (LEMOS et al., 2008) demonstraram a importância das células da glia na infecção experimental de equinos com *T. evansi*, na fase crônica da infecção. Por outro lado, não foi estudada a variação desta celularidade em momentos distintos da infecção, muito embora em infecções por *Trypanosoma brucei* fossem observadas ativação da micróglia durante a infecção, sendo mais evidente em fases crônicas e que o padrão de resposta pode estar relacionado a manifestações neurológicas (CHIANELLA et al., 1999).

A infecção pelo *T. evansi* gera estresse oxidativo no hospedeiro por estes apresentarem menor capacidade atenuante aos radicais livres gerados pela resposta autoimune induzida pela infecção (MURRAY et al., 2008), desta forma, a ação direta das espécies reativas de oxigênio (EROs) na peroxidação das membranas celulares e proteínas, causam efeitos funcionais deletérios nos animais infectados produzindo lesões que anteriormente eram atribuídas à resposta imunológica policlonal (HABILA et al., 2012).

A anemia causada pelo *T. evansi*, por exemplo, sempre foi atribuída à eritrofagocitose (MOHAMMED, 2014)(BALOGUN et al., 2014) (GUEGAN et al., 2013), porém estudos recentes indicam a participação do estresse oxidativo no

desenvolvimento desta (OMER; MOUSA, 2007; HABILA et al., 2012; ANSCHAU; DAFRÉ; PERIN, 2013) et al., 2013). OMER; MOUSA (2007), observaram que em ratos infectados experimentalmente com *T. evansi* há redução da ação da glutathiona peroxidase e da glicose-6-fostato desidrogenase, que são antioxidantes atenuantes dos radicais livres, logo sua redução pode causar danos nas membranas dos eritrócitos e conseqüentemente anemia. Fato confirmado por Wolkmer et al. (2009) que notaram aumento da peroxidação de lipídeos da membrana de eritrócitos. Estudos com camelos naturalmente infectados com *T. evansi* também indicaram redução do *status* antioxidante e aumento na peroxidação lipídica tanto no soro quanto nas membranas de eritrócitos (SALEH; AL-SALAHY; SANOUSI, 2009). (ANSCHAU; DAFRÉ; PERIN, 2013), notaram *in vivo*, estresse oxidativo em hemácias de ratos Wistar experimentalmente infectados por *T. evansi* e seus resultados mostraram aumentos no teor de ferro, fragilidade osmótica, índice de peroxidação lipídica e redução na glutathiona.

DA SILVA et al., (2012), encontrou um desequilíbrio redox em ratos experimentalmente infectados com *T. evansi*, sendo que na presença de baixa parasitemia houve aumento dos níveis séricos de óxido nítrico associado ao aumento de enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido dismutase.

Embora existam alguns estudos sobre o estresse oxidativo na infecção causada pelo *T. evansi*, poucos são os estudos que propõem a avaliação do estresse oxidativo tecidual. Similarmente, trabalhos utilizando a imunohistoquímica para marcação celular envolvida na resposta a infecção por *T. evansi* em diferentes tecidos são escassos e estão restritos ao sistema nervoso central. Por esses aspectos, acreditamos que o presente projeto possa gerar observações valiosas na elucidação da fisiopatogênica das tripanosomíases.

2.1. Objetivos

- Verificar parasitemia e lesões em fígado, baço, rins, linfonodo poplíteo, coração, pulmão e encéfalo de ratos Wistar

experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* no decorrer do período experimental.

- Observar a imunomarcagem de iNOS (enzima óxido nítrico sintetase induzível) e carga parasitária em fígado, baço, rins, linfonodo poplíteo, coração, pulmão e encéfalo de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* no decorrer do período experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Campus de Jaboticabal-SP, sob o protocolo número 23074/15.

3.1. Grupos experimentais

Foram utilizados 42 ratos Wistar machos, com peso médio de 250 gramas, divididos em dois grupos: grupo controle (GC, n=12) e inoculado (GI, n=30). Todos os animais foram acondicionados em caixas plásticas apropriadas, respeitando-se a proporção de 330 cm² para cada rato e separados de acordo com seus respectivos grupos. A alimentação consistiu de ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais do grupo GI foram inoculados por via peritoneal com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas de *T. evansi* provenientes de uma cepa criopreservada isolada de um cão naturalmente infectado. O descongelamento da amostra ocorreu em banho-maria a 37°C e a mesma foi homogeneizada com solução de Alsever na proporção de 1:1. A contagem do número de parasitas viáveis por mililitro de solução sangue/conservante foi feita pelo método descrito por BRENER (1961), de modo a padronizar a amostra.

Os ratos foram submetidos à eutanásia aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação (DAI), com o uso de cloridrato de quetamina (80mg/kg, IM) em associação a cloridrato de xilazina (10mg/kg, IM). Foram colhidos 5 ml de sangue, por meio de punção do ventrículo esquerdo, procedimento que resultou em eutanásia dos animais. As amostras de sangue foram transferidas para tubos com EDTA, para a realização do hemograma. No dia 0 DAI, foram eutanasiados 12 animais do GC e posteriormente, seis animais do GI, a cada sete dias.

3.2. Análise histopatológica

Após eutanásia, os ratos Wistar foram imediatamente submetidos à necropsia e à colheita de linfonodo poplíteo, baço, coração, encéfalo, fígado, músculos esqueléticos (semimembranoso/ semitendinoso), pulmões e rins. Os fragmentos dos

órgãos foram imediatamente fixados por 24 horas em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,2). Os fragmentos foram transferidos para solução de etanol a 70%, por 24 horas, sendo posteriormente processados segundo técnicas histológicas convencionais até a inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados a 3-5 µm de espessura e posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior análise das lesões em microscopia de luz.

Os achados histopatológicos foram avaliados de acordo com o tipo de lesão (degenerativa/inflamatória) e a incidência de *T. evansi*, sendo descrita a localização da lesão e determinada a intensidade por escores que variaram: 0 (ausente), 1.0 (discreto), 2.0 (moderado) e 3.0 (acentuado).

3.3. Análise Imuno-histoquímica

O procedimento geral para os anticorpos anti-iNOS e carga parasitária foi: desparafinização dos cortes de baço e linfonodos em estufa a 60°C por 1 hora e dois banhos em xilol por 10 minutos cada. Após essa etapa, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de álcool, até um banho em água destilada. Posteriormente, fez-se a recuperação antigênica (Tabela 8), o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura e o bloqueio das reações inespecíficas (Protein Block, Dako cytomation, cód. X0909), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários, cada um com sua diluição e tempo de incubação específico (Tabela 8). Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (Spring). Entre cada um dos passos descritos fizeram-se banhos em água destilada e em solução salina tamponada, pH 7,4. Para a visualização da reação, utilizaram-se os cromógenos DAB (3,3-diaminobenzidina – Spring), contra-coloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com Entellan Novo (Merck, Germany).

Tabela 1. Recuperação antigênica e diluições e tempos dos anticorpos primários utilizados nos cortes de baço e linfonodos de camundongos BALB/c.

Anticorpos primários	Células imunomarcadas	Espécies de origem	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação
Anti- <i>T. evansi</i>	Forma tripomastigota de <i>T.evansi</i>	Rato Wistar	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:200	18horas (T*)
Anti-iNOS da região C-terminal	Células expressando iNOS	Camundongo, humano e rato (Thermo Scientific, cód. PA5-16855)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:3000	2 horas (TA*)

1 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0; 2 – Solução de Tris-EDTA (EDTA - 4mM; Tris – 40mM), pH 9,0.

*TA – Temperatura ambiente.

*T- Temperatura de -2 a 8° C

Os controles negativos para as imunomarcações foram realizados com o diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário. E os controles positivos com tecidos, segundo os fabricantes de cada anticorpo.

A contagem das células foi realizada por porcentagem de células imunomarcadas, utilizando-se cinco campos microscópicos (Olympus, BX60), na objetiva de 40 x, utilizando-se o programa *Image-Pro Plus*, versão 4.5 (Figura 1.). No baço, foram consideradas as regiões de polpa branca e polpa vermelha. No linfonodo, foi feita pelas regiões medular e cortical. Em ambos, os órgãos, prevaleceram as regiões *hot spot* para captura das imagens, ou seja, nos locais onde havia maior quantidade de células imunomarcadas. A partir dos valores obtidos nesses campos, fez-se uma média da porcentagem de células imunomarcadas por fragmentos de tecido de cada animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo experimental (Controle, DAI07, DAI14, DAI21, DAI28, DAI35).

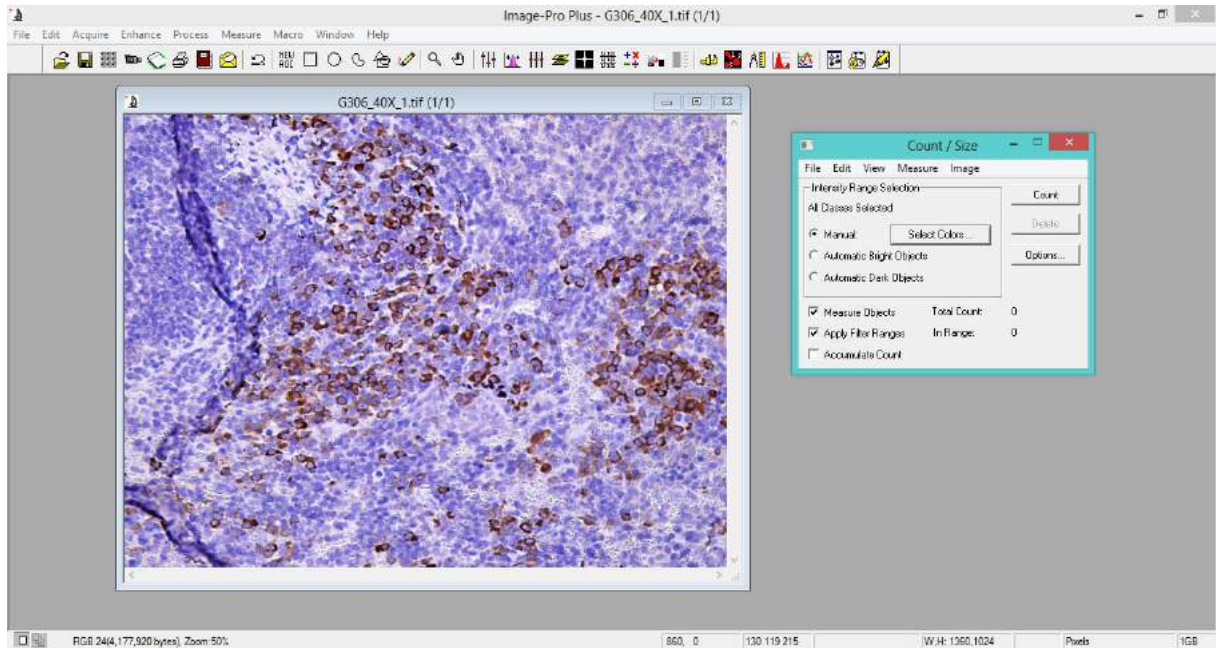


Figura 1. Captura Digital de Imagem. Imagem capturada com a utilização do programa Image Pro Plus versão 4.5 e análise da seção histológica (imuno-histoquímica anti-iNOS, 40X).

3.4. Análise Estatística

Análise estatística foi realizada comparando cada momento com os anteriores, utilizando-se o teste de Mann-Whitney para o par, com correção para taxas de falsa descoberta (FDR), utilizando-se o software R Project versão 3.2.5 (GNU Project) para tratamento dos dados. Os resultados foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante (-) para $p > 0.10$.

4. RESULTADOS

No hemograma notou-se intensa anemia no momento DAI 21, com baixos valores de hemácias, hemoglobina e volume globular. Além disso, notou-se também, leucocitose com aumento associado monocitose, eosinofilia e linfócitose significativa, principalmente no DAI 21 e 28 (Figura 2).

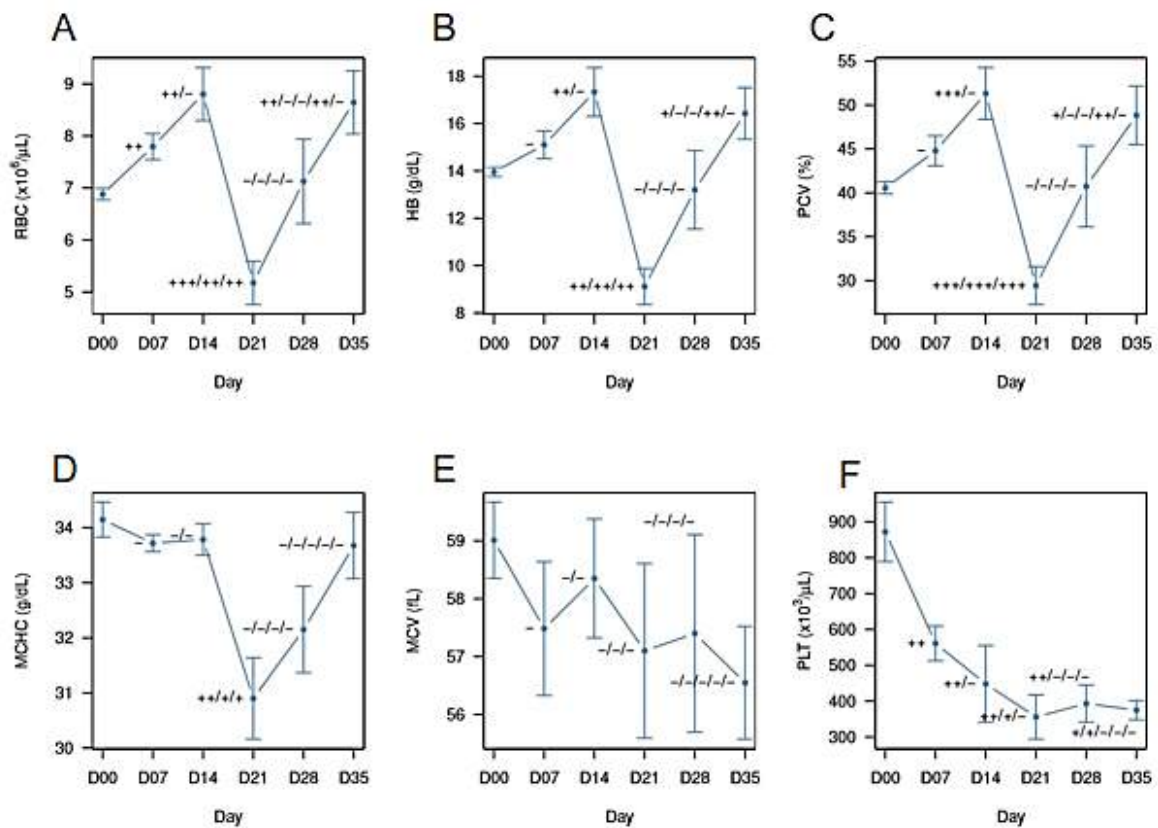
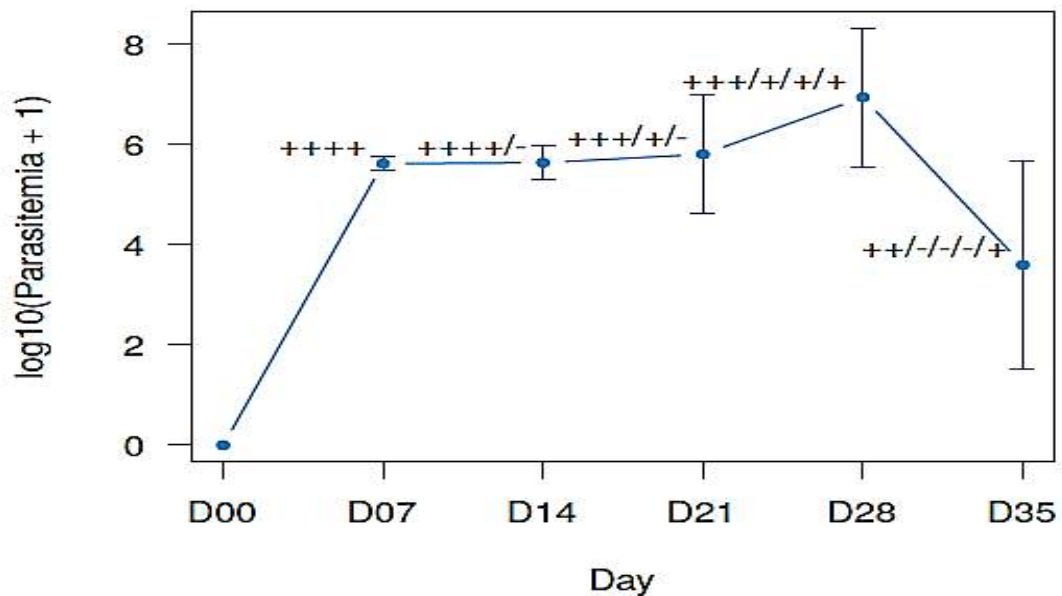


Figura 2. Comparação de cada momento (DAI) com os anteriores entre os DAI dos parâmetros hematológicos de ratos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. Hemácias (A), Hemoglobina (B), Volume Globular (C) Volume de hemoglobina corpuscular média (D), volume corpuscular médio (E), Plaquetas (F). Os resultados foram considerados sugestivos () para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; (-) não significante para $p > 0.10$.

Os animais do GC não apresentaram nenhuma alteração macro ou microscópica evidente, nem foram observadas a presença de *T. evansi* em

quaisquer órgãos ou esfregaços. Os animais GI com maior parasitemia pertenciam ao momento DAI 28 nos quais observou-se parasitemia média de $19,88 \cdot 10^7$ tripomastigotas.mL⁻¹, após esse momento notamos a diminuição da parasitemia. A parasitemia variou de acordo com o tempo de infecção nos diferentes órgãos quando comparada ao momento D0 (Figura. 3).

A



B

Órgãos	Dias após infecção					
	0	7	14	21	28	35
Coração	-	++	+	+++	+++	++++
Rins	-	-	+	++++	+++	+++
Fígado	-	-	-	+++	+++	+++
Músculo	-	-	-	+++	++	-
Encéfalo	-	-	-	++	+++	-
Linfonodo	-	-	-	-	++	++
Pulmão	-	-	-	-	-	-

Figura 3. (A) Comparação entre as médias das parasitemias de ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi* em diferentes momentos do período experimental. (B) Comparação entre as médias das parasitemias observadas em diferentes órgãos ao longo do período experimental. Os

resultados foram considerados sugestivos (+) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$ (-).

No fígado, nos primeiros momentos (DAI 07 e 14), observou-se de moderada a acentuada necrose de hepatócitos, tumefação e degeneração em zona 3 e ausência de parasitas (Figura.4). No momento DAI 21, notou-se considerável presença de *Trypanosoma evansi* nos sinusóides e no interior de vasos. (Figura. 5F). Nos próximos momentos (DAI 28 e 35) degeneração dos hepatócitos juntamente com focos de necrose em zona 3 e diminuição na intensidade de parasitas (Figura.4).

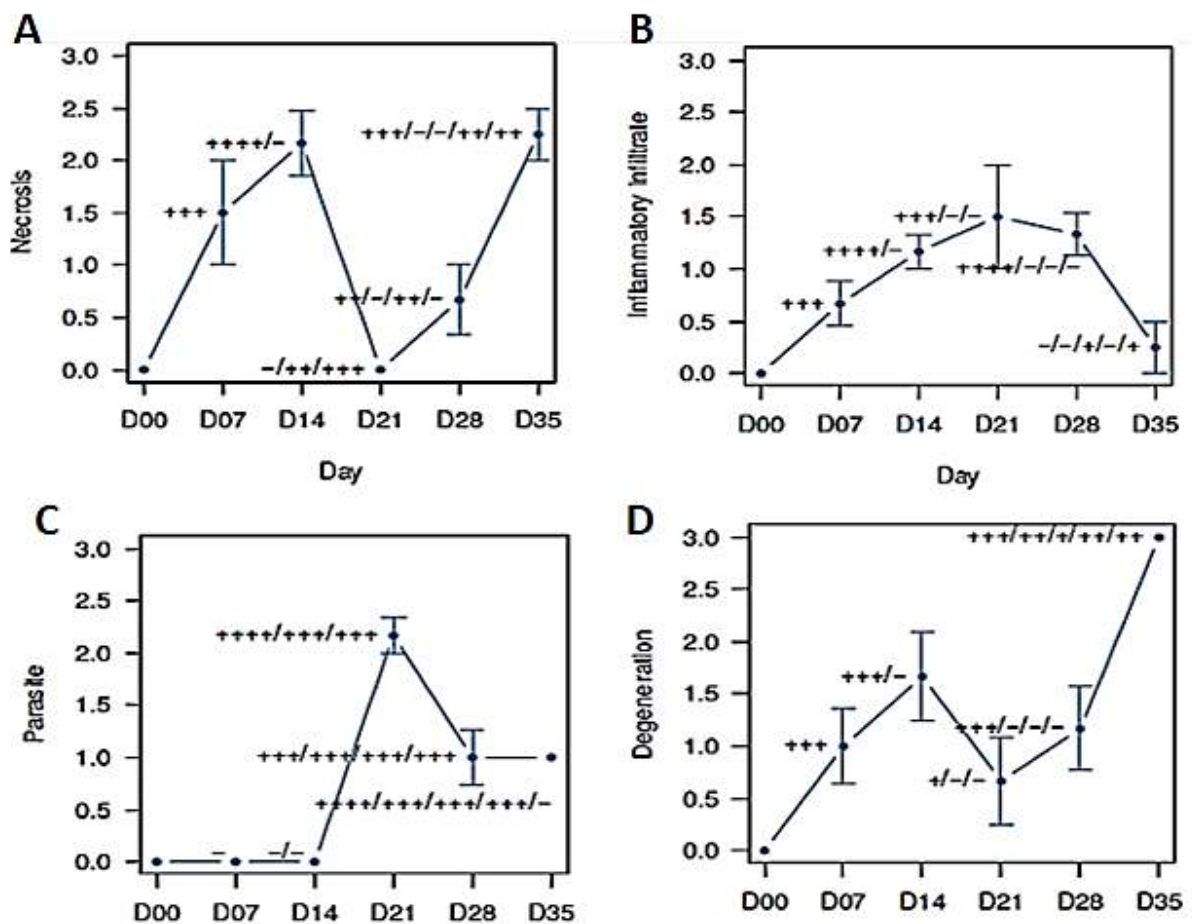


Figura 4. Comparação de cada momento (DAI) com os anteriores entre os DAI das principais lesões histopatológicas encontradas no fígado de ratos infectados com *Trypanosoma evansi*. Necrose (A), Infiltrado inflamatório

(B), presença de parasitas (C) e Degeneração (D). Os resultados foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

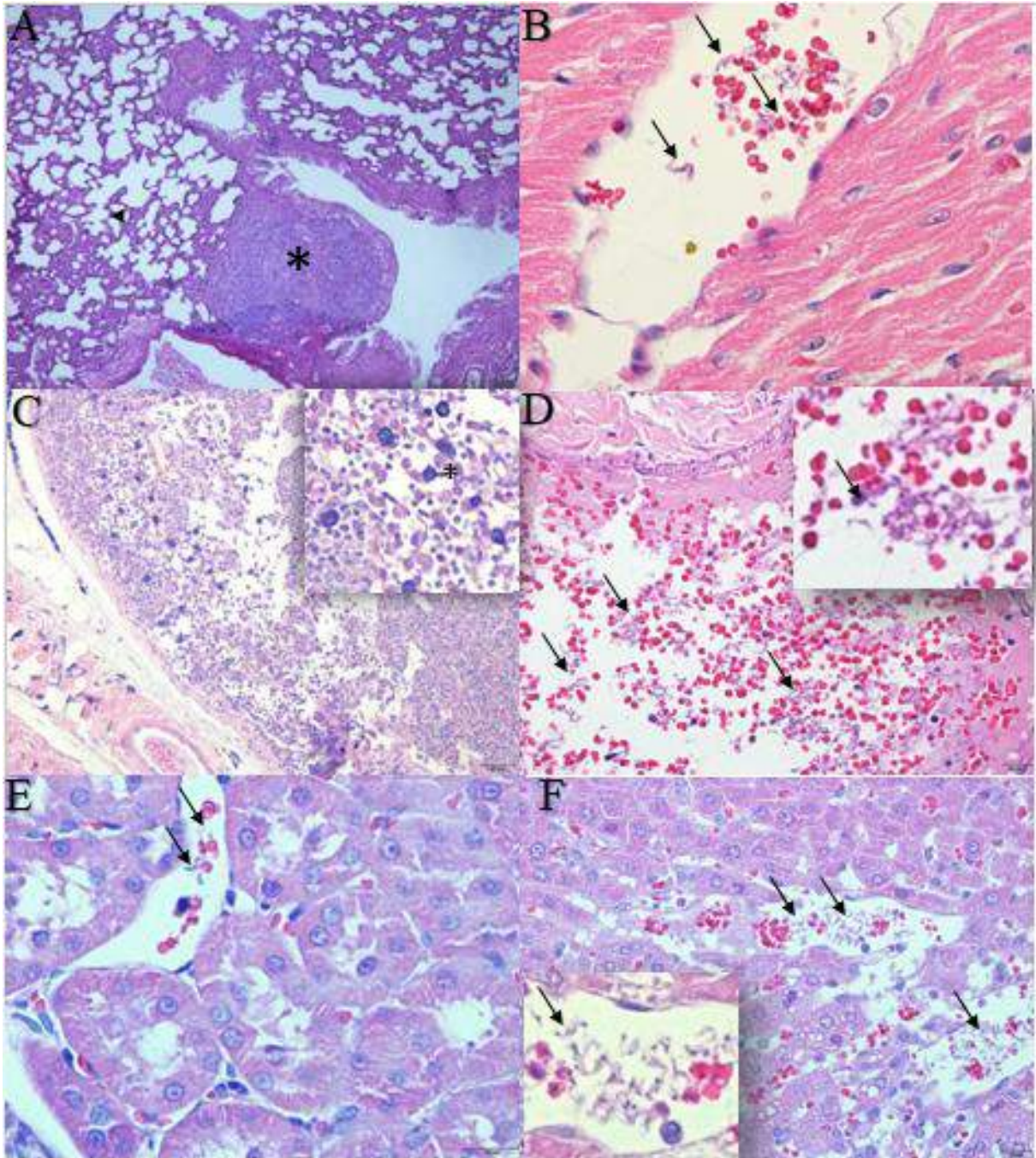


Figura 5. Fotomicrografias de órgãos de ratos Wistar experimentalmente infectado com *T. evansi* em coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina, todas da objetiva de 40x. (A) Observa-se tecido linfóide reativo (*) em pulmão de um rato Wistar infectado com *T. evansi*, no momento DAI 07, espessamento de septos

alveolares (cabeça da seta), objetiva de 40X. (B). Miocárdio com presença de parasitas (setas). (C) Presença de mastócitos (*) no seio subcapsular do linfonodo, além de eosinofilia moderada em rato Wistar infectado, no momento DAI 21. (D) Presença do parasita no interior de vasos da musculatura esquelética (setas), no momento DAI 21. (E) Rim, presença de parasitas na forma tripomastigotas (setas) no interior de vasos sanguíneo no intertício renal. (F) No fígado, em DAI14, observa-se presença do parasita na forma tripomastigota (setas).

Na necropsia, o único órgão que apresentou alteração macroscópica foi o baço, no qual foi observado aumento de volume, bordas arredondadas e hiperplasia de polpa branca. Na análise microscópica e foi significativa a hiperplasia de polpa branca, foi mais intensa no momento DAI 35, essa alteração foi extremamente significativa em relação aos momentos anteriores.

No rim, a partir do momento DAI14, notou-se a presença discreta do *Trypanosoma evansi* na região do hilo renal (vasos sanguíneos) (Fig.5E). No momento de DAI 21, a presença do parasita foi acentuada, sendo extremamente significativa quando comparada aos outros momentos (Figura 6A). Infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e neutrófilos foi identificado de forma moderada a acentuada em DAI07 e DAI 14 (Figura 6C), acompanhado de uma acentuada degeneração epitelial dos túbulos proximais e distais. No momento DAI21 o infiltrado inflamatório torna-se acentuado com predomínio de plasmócitos, linfócitos e monócitos, e nas fases mais crônicas da infecção, observou-se a estabilização do processo inflamatório com o predomínio de um infiltrado inflamatório mononuclear discreto, presença de congestão de vasos e necrose de túbulos em todos os momentos da infecção, apresentando um significativo aumento no DAI 21.

No pulmão, notou-se espessamento de septo alveolar extremamente significativo no DAI 07, que se manteve em todos os momentos da infecção associado a um infiltrado inflamatório mononuclear extremamente significativo em DAI 07 e DAI 14. Presença de hemorragia difusa significativa em DAI14. Presença discreta de parasitas no interstício (Figura 5A).

No coração, no DAI 7 e 14, presença significativa de formas livres do parasita entre os feixes de fibras do miocárdio em quantidade discreta e focal (Figura 5B). Infiltrado inflamatório mononuclear composto basicamente de linfócitos

extremamente significantes e congestão multifocal altamente significante. Em DAI 21, notou-se uma quantidade extremamente significante de parasitas, congestão e infiltrado inflamatório os quais diferiram entre os outros momentos. Foram observados também pequenas áreas de degeneração e presença de MCs. Em DAI 28, presença de parasitas altamente significante em relação a DAI 07, intenso infiltrado inflamatório mononuclear extremamente significativo em relação aos outros momentos acompanhados de degeneração das fibras do miocárdio, áreas de necrose e congestão multifocal. Em DAI 35, nota-se um infiltrado inflamatório mononuclear extremamente significativo, presença significante de parasitas, congestão e necrose em relação apenas a DAI 07.

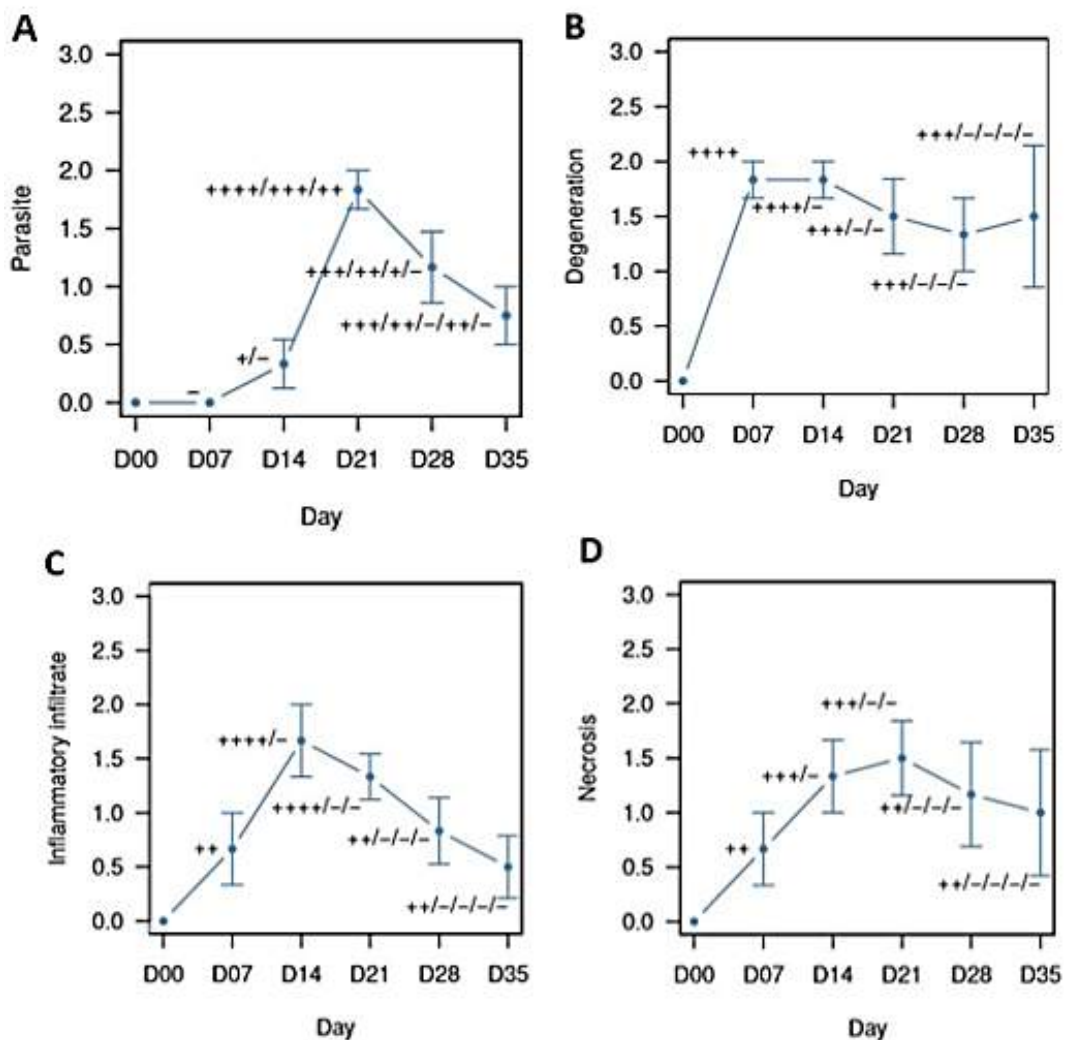


Figura 6. Comparação de cada momento (DAI) com os anteriores entre os DAI das principais lesões histopatológicas encontradas no rim de ratos

infectados com *Trypanosoma evansi*. Presença de parasitas (A), Degeneração (B), Infiltrado inflamatório (C), Necrose (D). Os resultados foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

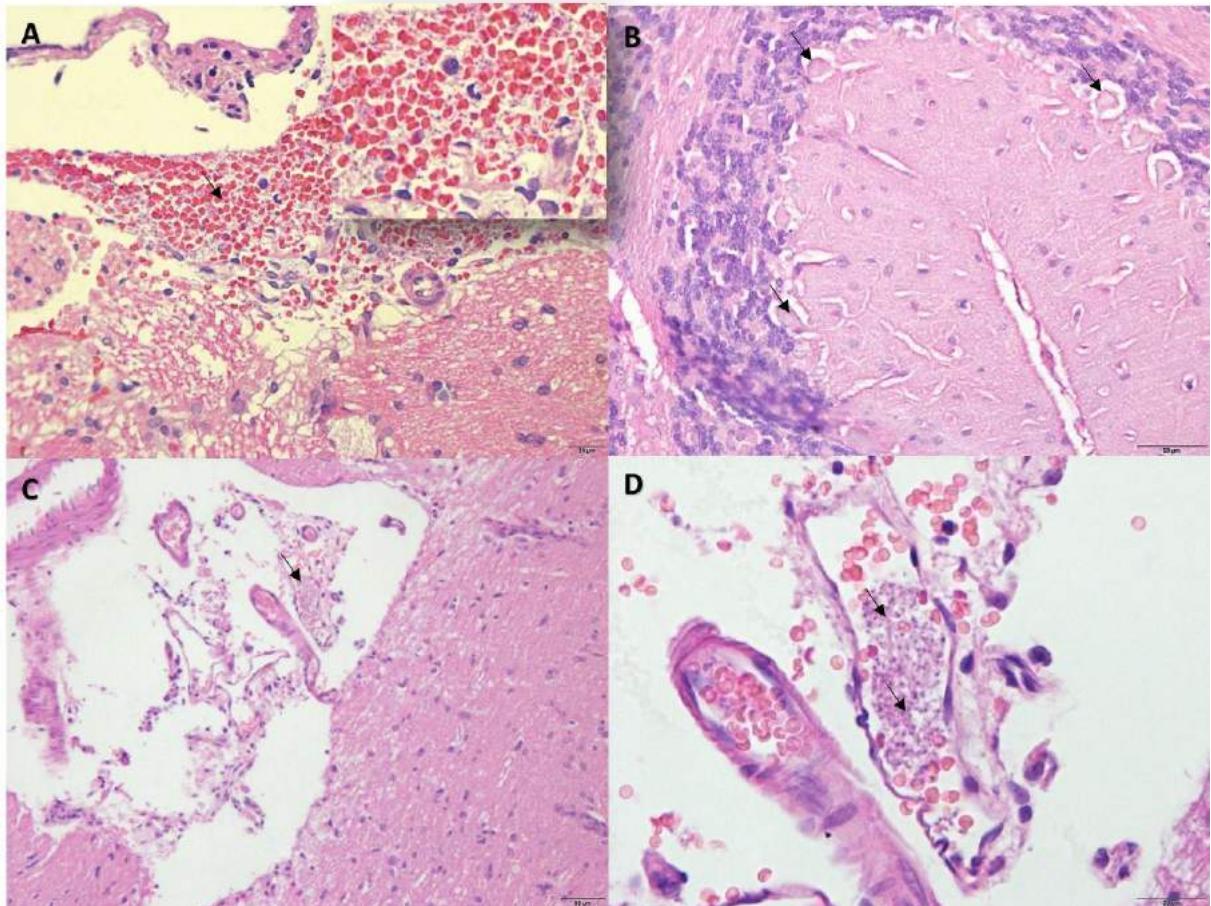


Fig.7. Fotomicrografias de encéfalos de ratos Wistar infectados com *T. evansi*. (A) Presença da forma tripomastigota do parasita em áreas de hemorragia submeningeal (seta; detalhe), juntamente à células mononucleares localizados em meninges. (B) Cerebelo, observa-se presença de necrose das células de Purkinje (seta) em quantidade moderada e difusa. (C) e (D) Plexo coroide, presença de formas tripomastigota do parasita no interior de vasos (setas).

Os linfonodos obtiveram presença de parasitas extremamente significante em DAI 28 e 35. Em DAI 21, apresentou intensa quantidade de MCs em córtex e tecidos

adjacentes (Figura 5C), além de uma eosinofilia evidente em todos os momentos da infecção, porém em DAI 35 mostrou-se significativa em relação a DAI 07.

No encéfalo, no momento DAI07 foram notadas áreas discretas de edema e necrose evidente em grau discreto a moderado. Em DAI 14, notou-se em córtex cerebral congestão moderada de meninges, juntamente a um infiltrado inflamatório mononuclear discreto e aumento de celularidade (gliose difusa pelo córtex). Edema difuso a moderado, necrose multifocal em grau discreto, localizada em tronco encefálico, principalmente. Em DAI 21, discreta hemorragia e infiltrado inflamatório mononuclear, composto de plasmócito e linfócito em quantidade moderada, localizada em regiões de meninges (Fig.7A), congestão difusa de discreta a moderada próxima à região do hipocampo (região 2) com focos de hemorragia. Presença de parasitemia nos vasos (Fig.7C e D), gliose moderada e necrose de células de Purkinje (Fig.7B), hemorragia discreta a moderada, no cerebelo. Presença de necrose e congestão no tronco encefálico. Necrose moderada a acentuada em córtex frontal. Em DAI 28, edemaciação no córtex frontal difusa e moderada, área de vacuolização no início do tronco encefálico de moderada a acentuada. Meningite parasitária (presença de *T. evansi*) associada a grande foco de hemorragia, gliose acentuada na porção frontal perto do bulbo olfatório, com áreas extensas de necrose, edemaciação em todo o encéfalo e vacuolização próxima ao plexo coroide, e ao cerebelo. Degeneração e morte de células de Purkinge e congestão. Por fim, em DAI 35, foi observada intensa vacuolização por todo o tecido encefálico, desde o bulbo olfatório até o cerebelo. Congestão moderada e difusa por todo o parênquima. Focos de hemorragia moderada em plexo coroide, gliose difusa e em grau moderado. Em cerebelo, células de Purkinge com necrose em nível acentuado a difuso.

O Fígado apresentou imunomarcção positiva para *T.evansi* a partir de DAI21, porém em DAI28 notou-se uma intensidade significativa maior aos momentos anteriores, já em DAI35 essa carga parasitaria reduziu significamente. A imunomarcção por iNOS se mostrou crescente no decorrer dos momentos, apresentando maior intensidade em DAI35 (Figura 8).

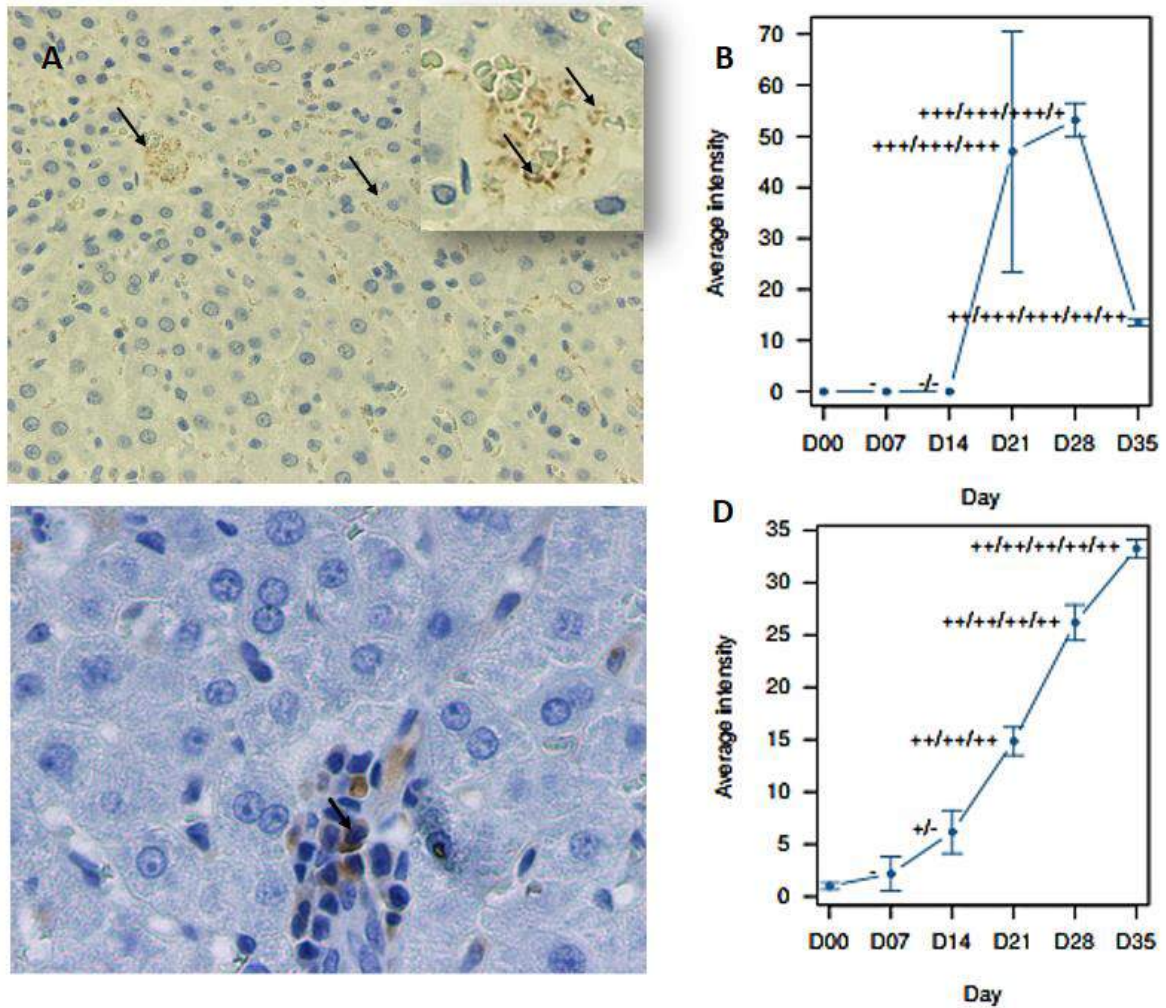


Figura 8. Fotomicrografias de imunomarcações positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no fígado de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS (D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significativa (++++) para $p < 0.001$; não significativa para $p > 0.10$.

O baço apresentou imunomarcações positivas para formas tripomastigotas de *T. evansi* a partir de DAI14, porém a intensidade das imunomarcações foi

extremamente significativa no momento DAI 21, e reduziu significamente em DAI 35 em relação a todos os momentos anteriores. As imunomarcações para iNOS foi positiva desde a primeira semana (DAI07), e foi se intensificando até o DAI21, se mantendo em DAI35 (Figura 9).

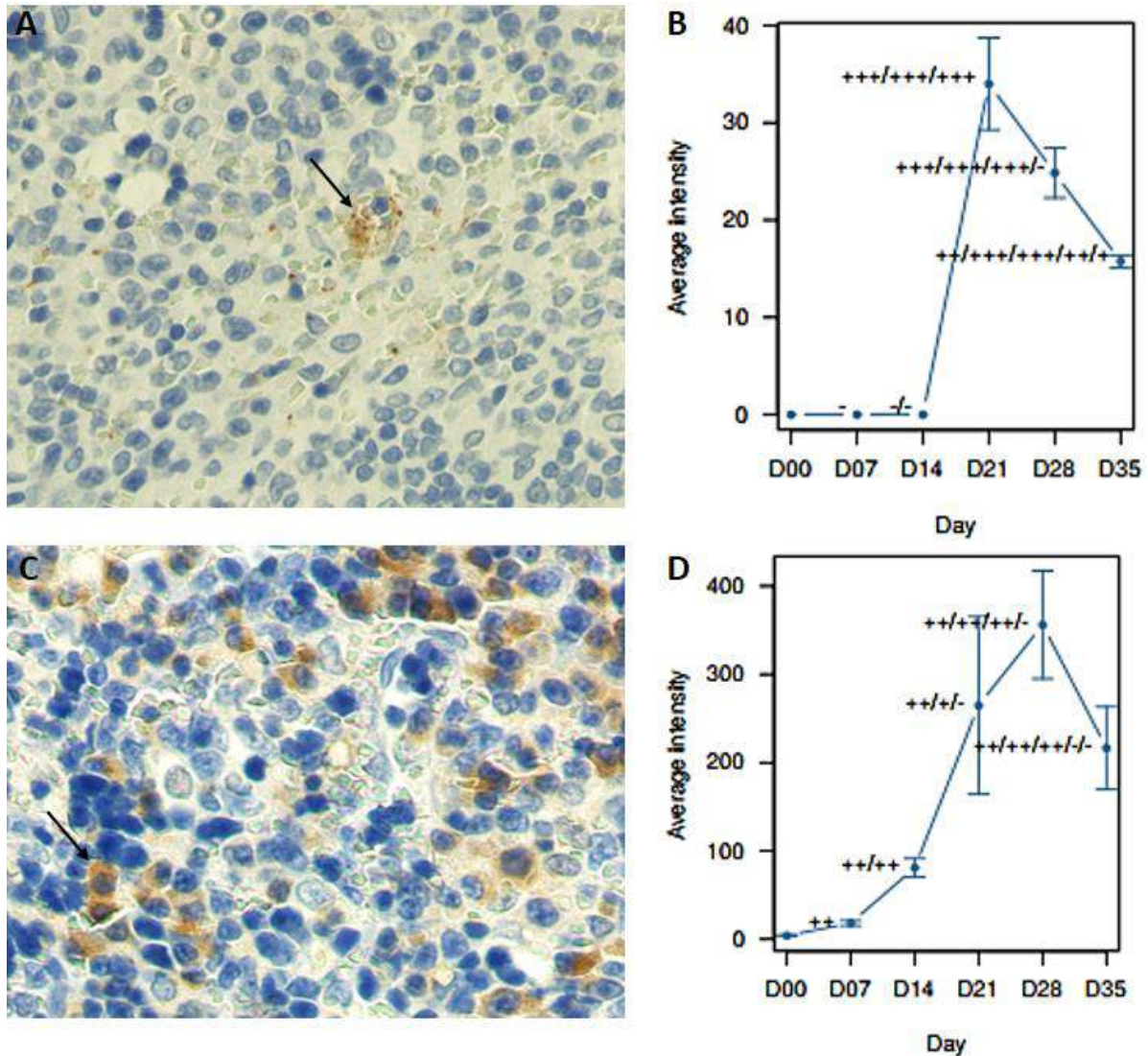


Figura 9. Fotomicrografias de imunomarcações positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no baço de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para

$p > 0.10$.

Nos rins notou-se imunomarcção positiva para forma tripomastigotas de *T.evansi* em DAI21, e reduzindo significativamente a intensidade em DAI35. A imunomarcção para iNOS foi positiva em macrófagos e neutrófilos a partir de DAI07 e se tornou mais intensa significativamente em DAI21 em relação aos momentos anteriores, em DAI 28 reduziu significativamente e em DAI35 notou-se baixa intensidade de iNOS em relação aos anteriores (Figura 10).

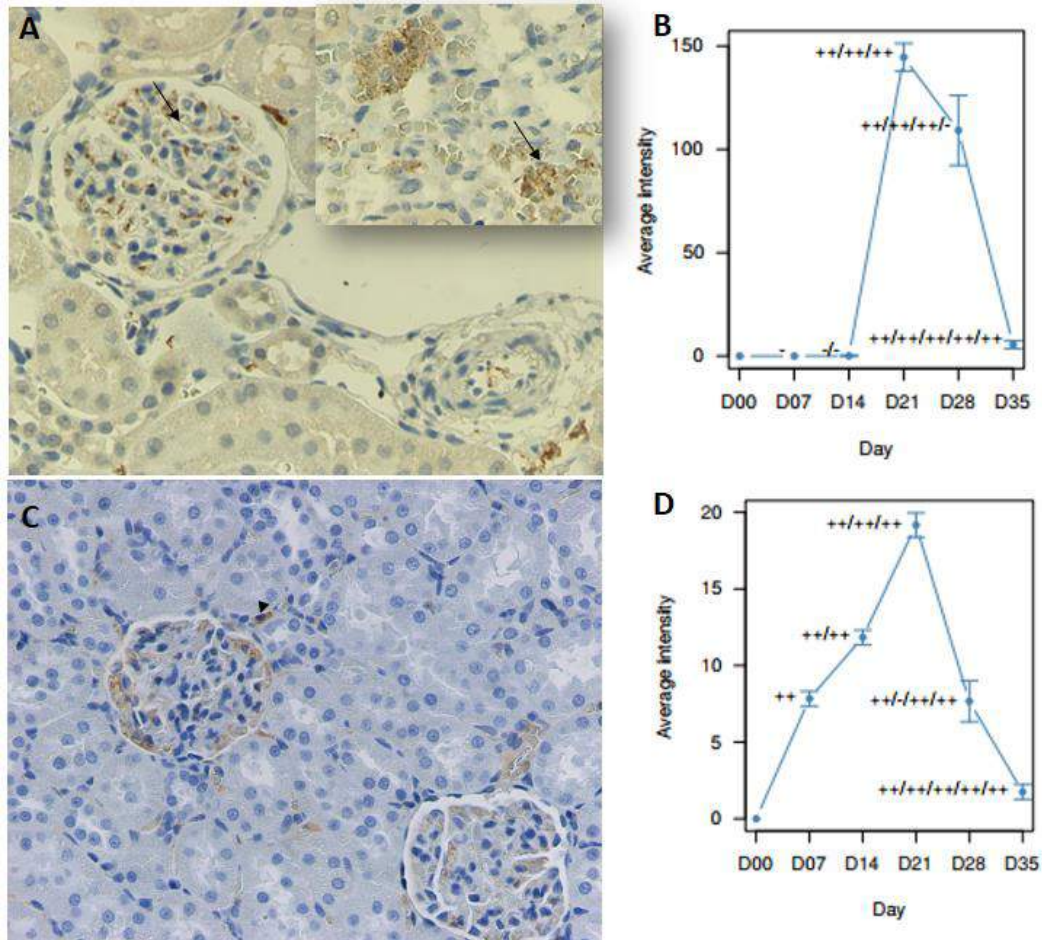


Figura 10. Fotomicrografias de imunomarcções positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no rim de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (++++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

O coração apresentou imunomarcção positiva pra forma tripomastigotas de *T.evansi* a partir de DAI21 sendo uma intensidade significativa em relação aos momentos anteriores e em DAI35 se reduziu significativamente. Em DAI07 a imunomarcção de iNOS foi positiva e se mostrou crescente até DAI28 (Figura 11).

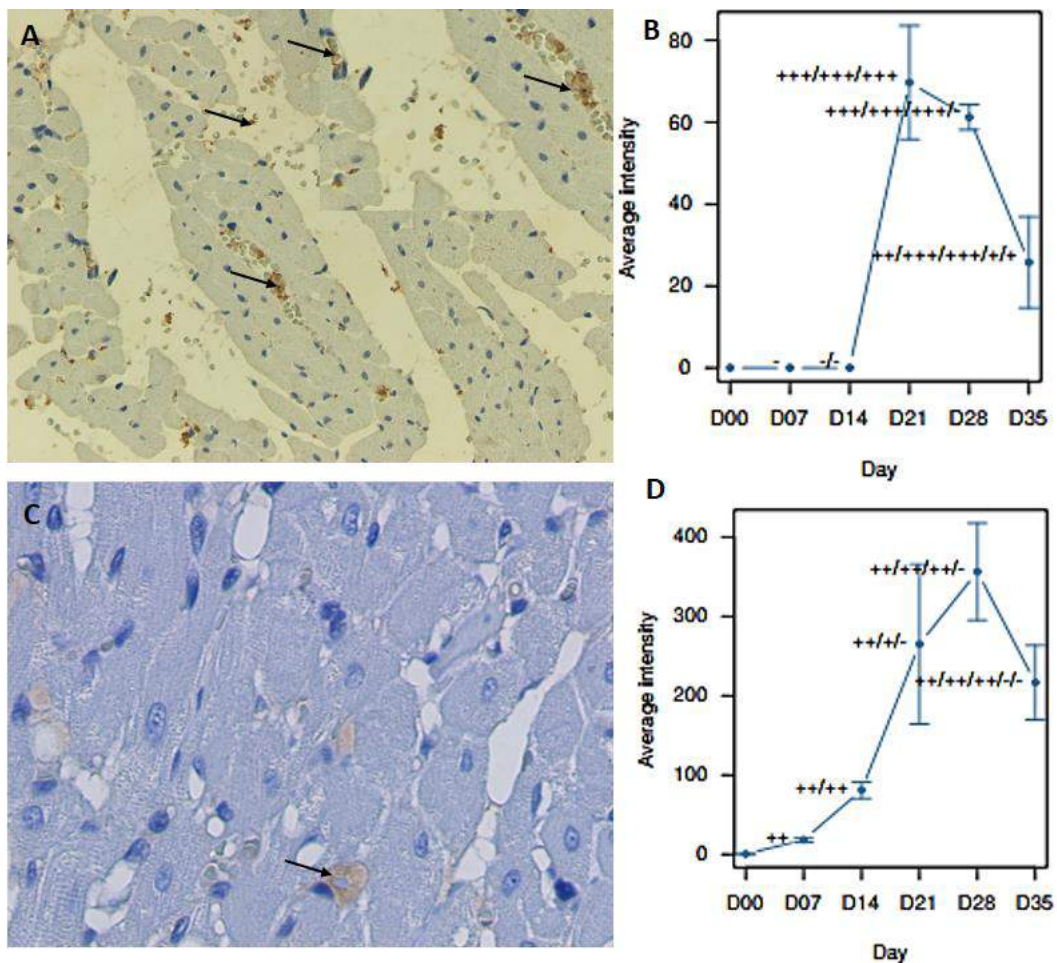


Figura 11. Fotomicrografias de imunomarcções positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no coração de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (++++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

No pulmão observou-se imunomarcção positiva para *T.evansi* a partir de DAI 21, em DAI28 apresentou maior intensidade de parasitas marcados, já em DAI 35 houve uma redução significativa da marcação em relação aos momentos antecedentes. A imunomarcção para iNOS se mostrou significativa em DAI07, mantendo se a intensidade de marcação em DAI14 e em DAI21, e em DAI28 e DAI35 reduziu de forma significativa em relação aos momentos anteriores (Figura 12).

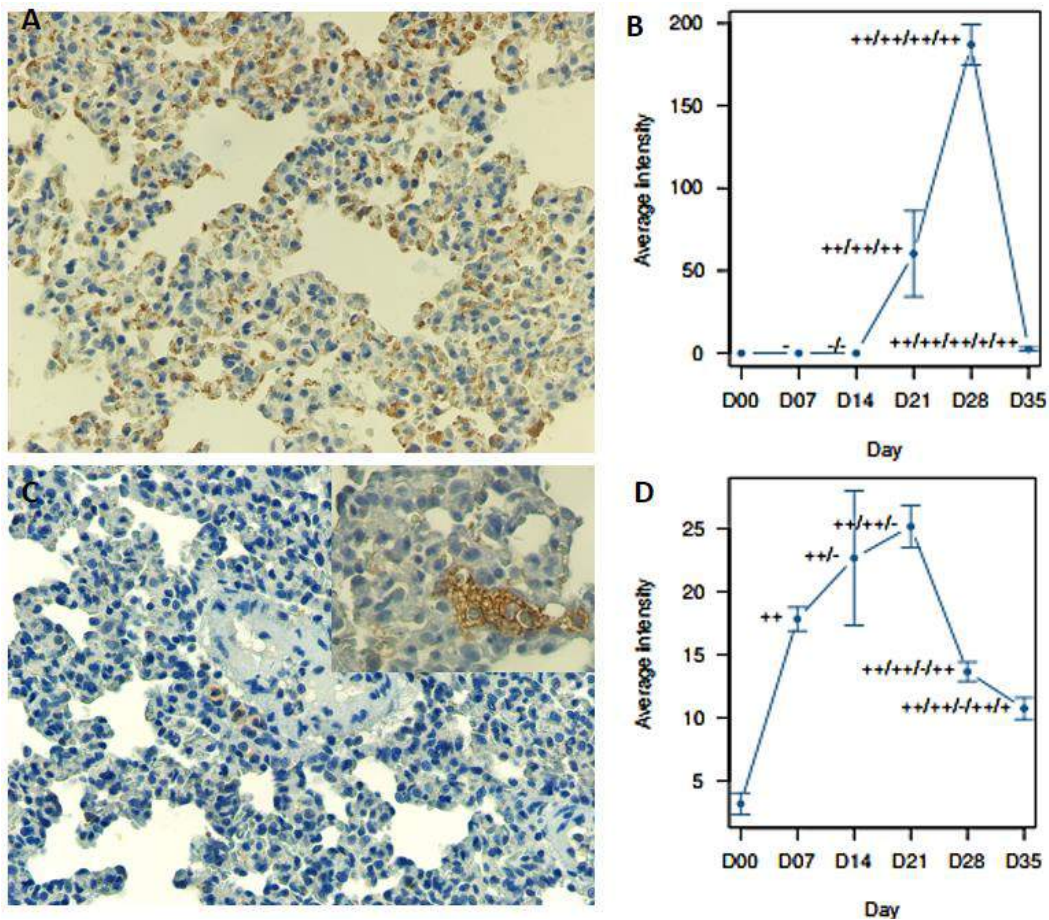


Figura 12. Fotomicrografias de imunomarcções positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) nos pulmões de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

Na musculatura esquelética notou-se a marcação positiva pra *T.evansi*, porém não foi significativa em nenhum momento. Entretanto o iNOS apresentou imunomarcação significativa a partir de DAI21, em DAI28 notou-se a maior intensidade de INOS quando comparado aos outros momentos, porém em DAI35 houve uma redução sugestiva em relação a DAI28 (Figura 13).

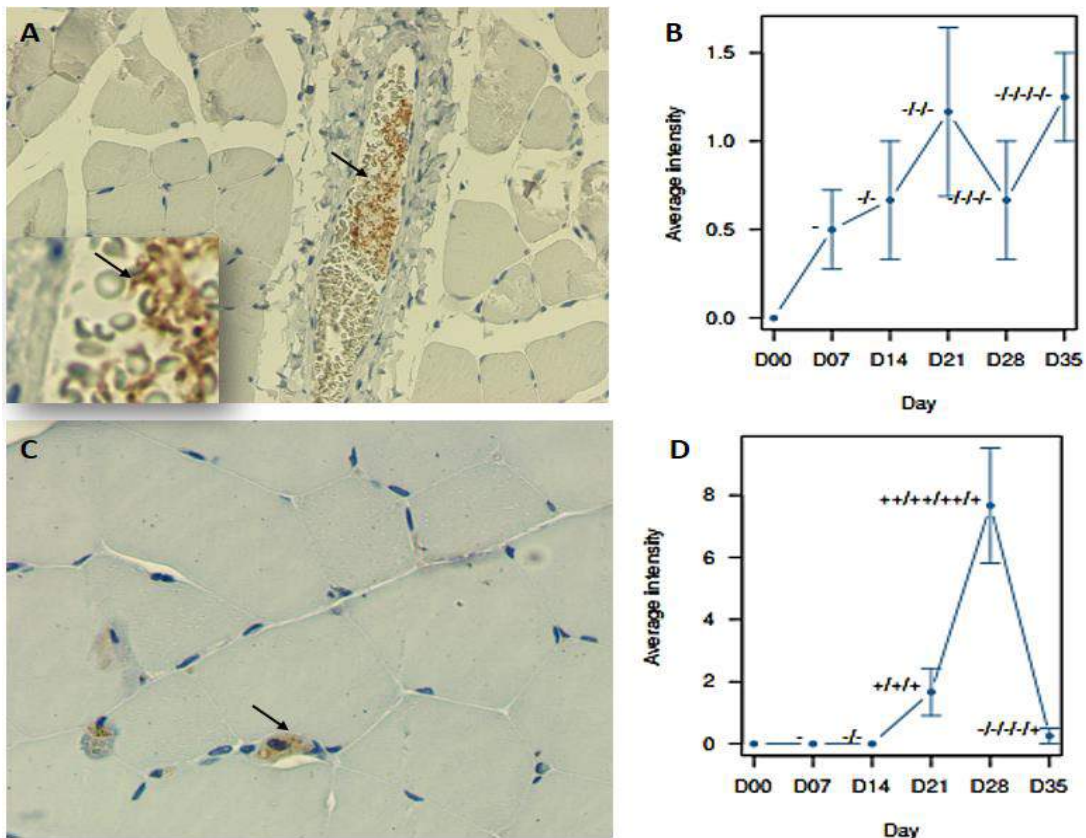


Figura13. Fotomicrografias de imunomarcações positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no coração de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significativa para $p > 0.10$.

O linfonodo poplíteo observamos imunomarcação de *Trypanosoma evansi* fora de vasos a partir de DAI21, se tornando extremamente significativo em DAI28, e reduzindo significativamente em DAI35, assim podendo ser explicado pela alta

intensidade de células imunomarcadas com iNOS levando significativa morte do parasita nesse momento.

Foi notado poucos parasitas localizados na musculatura esquelético, não apresentando diferença significativa entre os momentos. As células apresentaram alta intensidade de imunomarcção para o iNOS em DAI 21 e DAI28, e houve redução significativa em DAI 35.

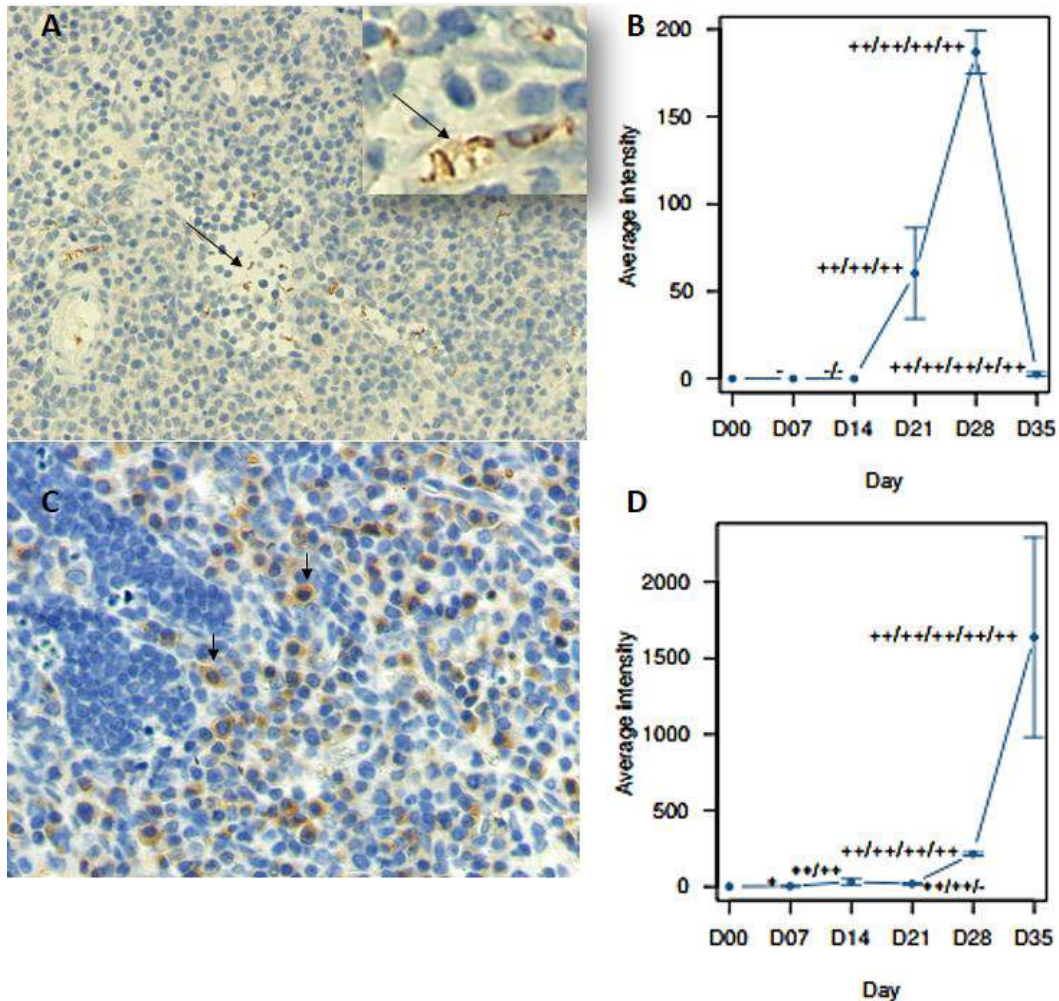


Figura 15. Fotomicrografias de imunomarcções positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no linfonodo poplíteo de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (++++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

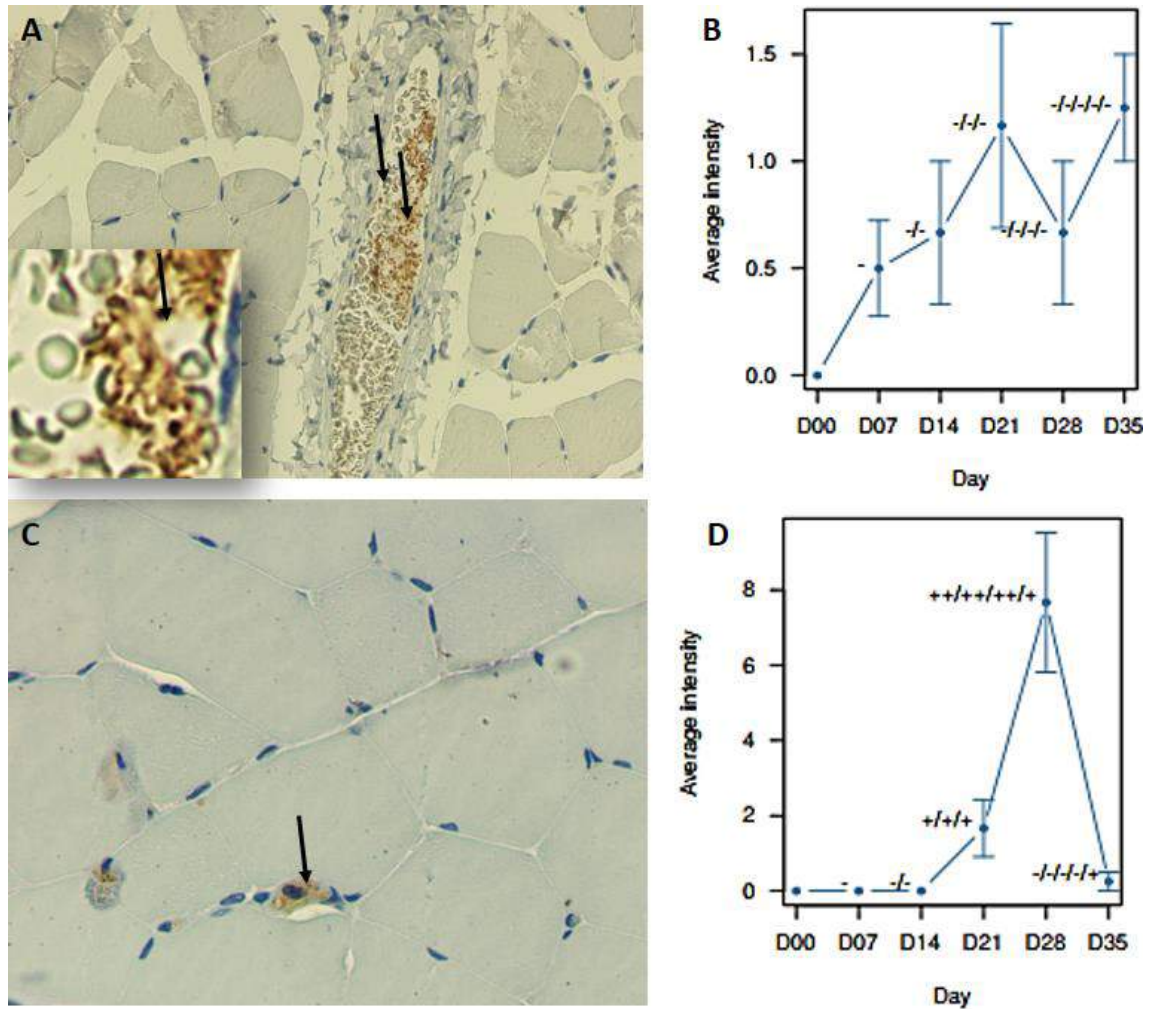


Figura 16. Fotomicrografias de imunomarcações positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no tecido muscular de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DA121, objetiva de 40x. Gráficos (B e D) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (B) e iNOS(D) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

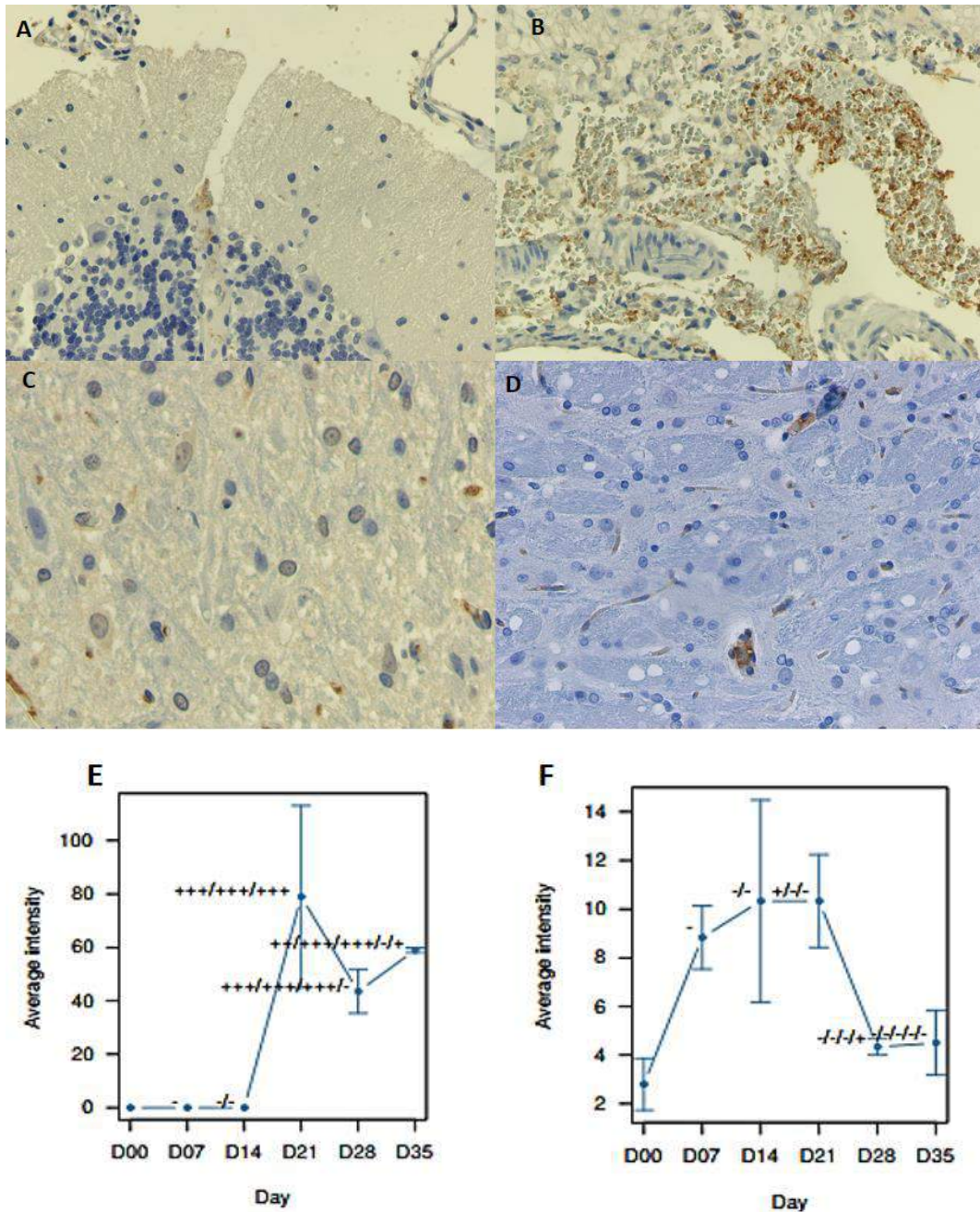


Figura14. Fotomicrografias de imunomarcações positivas (seta) para *Trypanosoma evansi* (A) e células expressando iNOS (B) no encéfalo de ratos Wistar infectados experimentalmente com *T. evansi* em DAI21, objetiva de 40x. Gráficos (E e F) representando a intensidade de células marcadas positivamente para o parasita (E) e iNOS(F) cada momento (DAI) e comparando com os momentos anteriores. Os resultados dos gráficos foram considerados sugestivos (0) para $0.05 \leq p < 0.10$; significantes (++) para $0.01 \leq p < 0.05$; altamente significante (+++) para $0.001 \leq p < 0.01$, extremamente significante (++++) para $p < 0.001$; não significante para $p > 0.10$.

No encéfalo notou-se imunomarcção do parasita em DAI21 em maior intensidade, em DAI28 e DAI35 a marcação foi menos evidente. A intensidade de células que expressaram iNOS não houve significância entre os momentos (Figura 14).

5. Discussão

A infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos causa anemia (OMER; MOUSA, 2007). No presente trabalho, notou-se anemia aguda no DAI 21 e nos próximos momentos mostrou resposta eritropoiética medular pela reticulocitose presente nesse grupo. Sabemos que as infecções por tripanosomídeos na fase aguda da infecção estão associadas à eritrofagocitose, que ocorre em razão da desaliberação das hemácias pelo parasita (GUEGAN et al., 2013). Ademais, a infecção por *T. evansi* leva à peroxidação lipídica das hemácias e conseqüentemente à anemia (ANSCHAU; DAFRÉ; PERIN, 2013), ao aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, que proporciona uma aparência anormal dos eritrócitos, causando eritrofagocitose (MIJARES et al., 2010).

A hemoglobina livre, resultante da eritrofagocitose, pode ter sido responsável pela nefrose tóxica endógena presente nos animais eutanasiados na primeira semana de infecção. Proteínas liberadas pelo parasita podem causar degeneração tubular, congestão, infiltrado inflamatório e hemorragia (SINGH; SINGLA; ASHUMA, 2012), levando ao aumento da peroxidação lipídica (BALDISSERA et al., 2016a), em quatro dias de infecção. Assim como, já foi observado em 14 dias após infecção (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001) e em oito dias após a infecção (RAYULU; REDDY, 2015), o presente trabalho mostrou-se de acordo com esses autores, apresentando também hemorragias entre os túbulos da região cortical e medular, glomérulos congestionados e infiltrado inflamatório, porém foi demonstrado aqui que após o DAI 21, notou-se que as alterações histopatológicas se estabilizaram, e que a infecção por *T. evansi* causa lesões acentuadas nas primeiras semanas.

Dentre os órgãos linfáticos, o baço tem grande importância na infecção por *T. evansi* atuando como a primeira linha de defesa, assim os parasitas são destruídos na polpa vermelha e a polpa branca é ativada com o aumento da resposta imune (UCHE; JONES, 1992). O progresso da doença é acompanhado de esplenomegalia associado a hiperplasia linfóide e principalmente por presença de células gigantes, além de hemorragia, congestão, focos de necrose e hemossiderose (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001) (SINGH; SINGLA; ASHUMA, 2012). A formação de

células gigantes está associada a agregação de histiócitos, Biswas et al. (2001) notou à partir de 8 dias após a infecção em ratos *Bandicota* (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001). No presente estudo, foi encontrada a partir de 21 dias após infecção.

Os linfonodos poplíteos apresentaram baixa parasitemia e alta presença de MCs e eosinófilos. Os MCs são células que contêm grânulos residentes nos tecidos, que participam da regulação das respostas imunes inatas e adaptativas (BULFONE-PAUS; BAHRI, 2015). A granulação de MCs é essencial para a defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (ARTHUR; DM, 2016). Estudos em camundongos infectados com *T. cruzi* mostraram que a presença de MCs está relacionada a resistência do hospedeiro à infecção, cujos os animais tratados com estabilizador de MCs apresentaram baixa parasitemia, apresentaram níveis de parasitemia e IFN- γ muito maiores, maior mortalidade, miocardite e danos cardíacos (MEUSER-BATISTA et al., 2011).

Estudos mostram que a infecção por *T. evansi* causa lesões hialinas no miocárdio associadas à hemorragias em 14 dias. Outros estudos mostram em 2 dias após a infecção. Essas alterações podem estar relacionadas tanto à anemia e hipoglicemia (Singh et al. 2012; Macgregor et al. 2013; Baldissera et al. 2016b), como ao aumento sérico de óxido nítrico (NO), causando danos tanto no DNA do hospedeiro quanto no parasita. Assim no estudo em questão, foi notada degeneração das fibras musculares no epicárdio e no miocárdio, na segunda semana após a infecção, de forma discreta, tornando essa alteração mais acentuada na quarta e quinta semana, após a infecção associada a acentuada presença de parasitas e intensa anemia nesse período.

Dentre as alterações histopatológicas, a pneumonia intersticial associada a hemorragia e à congestão é uma das importantes causas de morte em animais infectados por *T. evansi* (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001). Nesse trabalho notou-se, essa alteração em DAI 14, associada a um infiltrado inflamatório mononuclear difuso, em grau moderado, em todos os momentos aqui avaliados, além disso, em toda a infecção os animais apresentaram espessamento de septos alveolares.

No presente estudo, nos primeiros estágios da infecção (DAI07 e DAI14), o fígado apresentou um infiltrado inflamatório composto principalmente por células de Kupfer e neutrófilos. Essas células têm um papel importante na resposta imune celular, que produzem Óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ERO) e fator de necrose tumoral (TNF) para combater o parasita (DIEGELMANN et al., 1981), além do que, já se sabe que infecções em ratos por *T. evansi* levam ao aumento sérico de NO (DA SILVA et al., 2012), e se torna-se genotóxico tanto para o parasita quanto para o DNA do hospedeiro, causando necrose e degeneração tecidual (BALDISSERA et al., 2016b). Nesse sentido, no presente trabalho, a presença do parasita foi inversamente proporcional à degeneração e necrose dos hepatócitos, fortalecendo a hipótese de que o óxido nítrico exacerbado pode causar a morte do parasita e a lesão do tecido alvo. Ademais, a maior parte da degeneração hepática ocorreu na região da zona 3; essa região está mais próxima da veia cava caudal e conseqüentemente recebe menor aporte de oxigênio, e associada a um quadro anêmico, devido à alta parasitemia, leva à hipóxia e anorexia dos hepatócitos primeiramente nessa região. Contudo o sangue com baixa oxigenação e conseqüente baixa pressão arterial, leva o radical férrico a transformar-se em ferroso e assim gerando um grande potencial de radicais livres, podendo levar tanto ao dano celular como parasitário.

Na terceira semana de infecção, foi observada no encéfalo a descontinuidade da barreira hematoencefálica associado a um infiltrado inflamatório mononuclear e hemorragia moderada e difusa. É sabido que o *T. evansi* invade o cérebro de ratos a partir da barreira hematoencefálica pelo plexo coroide, em 8 dias de infecção (BISWAS; CHOUDHURY; MISRA, 2001). Estudos mostram que o *Trypanosoma brucei brucei* atravessa a BHE com o auxílio dos linfócitos e interferão-gama (IFN- γ) (MASOCHA W, ROBERTSON B, ROTTENBERG ME, MHLANGA J, SOROKIN L, 2004). Isso ocorre principalmente com o auxílio das glicoproteínas de superfície presentes no parasita, as quais aumentam a expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF, interleucina-6, IL-8 e NO) e moléculas de adesão (molécula de adesão intracelular 1, E-selectina e molécula de adesão vascular-1) apresentadas por células endoteliais cultivadas (GIRARD et al., 2005). Assim, é de suma importância haver mais estudos relacionados a essas moléculas dos parasitas que

promovem a sua passagem pela BHE com o intuito de desenvolver fármacos que possam reduzir as infecções parasitárias (ZHANG et al., 2012).

As alterações histopatológicas vistas no presente estudo confirmam que os danos causados pelo *T. evansi* são deletérios e irreversíveis, contribuindo para a morte do animal, principalmente no segundo pico de parasitemia. Portanto, as lesões aqui descritas se tornam importantes para a elucidação de detalhes da fisiopatogenia da doença causada pelo *T.evansi*.

(BALDISSERA et al., 2016b), ao correlacionar o NO plasmático com os danos no DNA de tecido hepático, esplênico e cardíaco em ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* em 3 e 9 dias após observou que a produção de NO é genotóxico tanto para o hospedeiro como para o parasita. Assim no presente estudo, conseguimos detectar a marcação positiva para iNOS em fígado, baço, coração, linfonodo, músculo esquelético, cérebro, rins e pulmões associada a lesões degenerativas com redução significativa da carga parasitária nos últimos momentos de infecção, o que indica que as lesões teciduais observadas em animais infectados com *T evansi* podem estar relacionadas com a resposta inflamatória resultando no aumento do NO.

6. CONCLUSÕES

- Notou-se a presença de parasitas em todos os órgãos aqui avaliados tanto pela técnica de Hematoxilina e eosina, como por marcação por imunohistoquímica, sendo a esta técnica mais sensível e específica
- A maior carga parasitária foi em DAI21 em todos os órgãos aqui avaliados, apresentando redução significativa em DAI35.
- A infecção causada por *Trypanosoma evansi* causa aumento da produção de iNOS em todos os tecidos aqui avaliados e está relacionado com a redução significativa da carga parasitária nos últimos momentos de infecção. Além de causar lesões degenerativas em diferentes órgãos do hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS

- ANSCHAU, V.; DAFRÉ, A. L.; PERIN, A. P. Glutathione and iron at the crossroad of redox metabolism in rats infected by *Trypanosoma evansi*. p. 2361–2366, 2013.
- ARTHUR, G.; DM, P. B. New Developments in Mast Cell Biology Clinical Implications. **CHEST**, v. 150, n. 3, p. 680–693, 2016.
- BALDISSERA, M. D. et al. Relationship between DNA damage in liver, heart, spleen and total blood cells and disease pathogenesis of infected rats by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 161, p. 12–19, 2016b.
- BALDISSERA, M. D. et al. Microbial Pathogenesis Involvement of oxidative stress , cholinergic and adenosinergic systems on renal damage caused by *Trypanosoma evansi* infection : Relationship with lipid peroxidation. v. 99, p. 191–195, 2016a.
- BALOGUN, E. O. et al. Anemia amelioration by lactose infusion during trypanosomosis could be associated with erythrocytes membrane de-galactosylation. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3–4, p. 259–263, 2014.
- BISWAS, D.; CHOUDHURY, A.; MISRA, K. K. Histopathology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* infection in bandicoot rat. I. visceral organs. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 3, p. 148–159, 2001.
- BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: Distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 95–107, 1998.
- BULFONE-PAUS, S.; BAHRI, R. Mast cells as regulators of T cell responses. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. AUG, p. 6–11, 2015.
- CADIOLI, F. A. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in donkeys: Hematological, biochemical and histopathological changes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 749–756, 2006.
- CHIANELLA, S. et al. Microglia activation in a model of sleep disorder: an immunohistochemical study in the rat brain during *Trypanosoma brucei* infection. **Brain Res**, v. 832, n. 1–2, p. 54–62, 1999.
- DA SILVA, A. S. et al. *Trypanosoma evansi*: Hematologic changes in experimentally infected cats. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 31–34, 2009.
- DA SILVA, A. S. et al. Nitric oxide level, protein oxidation and antioxidant enzymes in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 166–170, 2012.
- DE AQUINO, L. P. C. T. et al. Clinical, Parasitological and Immunological Aspects of Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in Dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255–260, 1999.
- DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and

Pathogenic Effects
 Marc Desquesnes,^{1,2} Philippe Holzmüller,¹ De-Hua Lai,³ Alan Dargantes,⁴ Zhao-Rong Lun,³ and Sathaporn Jittaplapo. **BioMed research international**, v. 2013, p. 1–22, 2013.

GIRARD, M. et al. Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 41–49, 2005.

GRESSLER, L. T. et al. Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com o parasito em sangue in natura e criopreservado. p. 1842–1846, 2009.

GUEGAN, F. et al. Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 1285–1303, 2013.

GUTIERREZ, C. et al. *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 26–29, 2010.

HABILA, N. et al. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 13–17, 2012.

JOSHI, P. P. et al. Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 10, p. 989–991, 2006.

LEMOES, K. R. et al. Astrocytic and microglial response and histopathological changes in the brain of horses with experimental chronic *Trypanosoma evansi* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 4, p. 243–249, 2008.

MACGREGOR, P. et al. Europe PMC Funders Group *Trypanosoma* immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. v. 10, n. 6, p. 1–17, 2013.

MACGREGOR, P.; MATTHEWS, K. R. Identification of the regulatory elements controlling the transmission stage-specific gene expression of *PAD1* in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 16, p. 7705–7717, 2012.

MASOCHA W, ROBERTSON B, ROTTENBERG ME, MHLANGA J, SOROKIN L, K. K. Cerebral vessel laminins and IFN- γ define *Trypanosoma brucei* penetration of the blood-brain barrier. **J Clin Invest**, v. 114, n. 5, p. 689–694, 2004.

MEUSER-BATISTA, M. et al. Mast Cell Function and Death in *Trypanosoma cruzi* Infection. **AJPA**, v. 179, n. 4, p. 1894–1904, 2011.

MIJARES, A. et al. *Trypanosoma evansi*: Effect of experimental infection on the osmotic fragility, lipid peroxidation and calcium-ATPase activity of rat red blood cells. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 301–305, 2010.

MOHAMMED, G. Uloga sijali č ne kiseline na povr š ini eritrocita u nastanku anemije u jaraca Savannah sme đ e. n. September, 2014.

MURRAY, J. et al. Monitoring oxidative and nitrative modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress. **Advanced**

Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 13–14, p. 1497–1503, 2008.

OHAERI, C. C. **Histological Changes in Organs of Rats Infected with Trypanosoma congolense** *Research Journal of Animal Sciences*, 2010.

OMER, O. H.; MOUSA, H. M. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. v. 145, p. 142–145, 2007.

RAYULU, S. S. V. C.; REDDY, B. S. Haematological and biochemical changes in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. June, p. 216–220, 2015.

RODRIGUES, A. et al. no Rio Grande do Sul : aspectos epidemiológicos , clínicos , hematológicos e patológicos 1. v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, A et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 2, p. 251–8, 2009.

SALEH, M. A.; AL-SALAHY, M. B.; SANOUSI, S. A. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3–4, p. 192–199, 2009.

SEIDL, A et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive veterinary medicine**, v. 33, n. 1–4, p. 219–34, 1998.

SILVA, A.; CEOLIN, L.; OLIVEIRA, C. Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciênc. rural**, v. 37, n. 3, p. 897–900, 2007.

SILVA, S. et al. *evansi*. 2008.

SILVA, A. DA; OLIVEIRA, C. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Scientiae ...**, v. 35, n. October, p. 373–376, 2007.

SINGH, M.; SINGLA, B. L. D.; ASHUMA, H. K. Pathological studies on experimental *Trypanosoma evansi* infection in Swiss albino mice. v. 36, n. 2, p. 260–264, 2012.

TARELLO, W. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. **Revue Méd Vét**, v. 156, n. 3, p. 133–134, 2005.

TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2–3, p. 223–230, 2000.

UCHE, U. E.; JONES, T. W. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, v. 106, n. 3, p. 299–309, 1992.

VERDILLO, J. C. M. et al. Comparative virulence of three *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes in the Philippines. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 130–134, 2012.

ZHANG, D. et al. Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . v. 3, n. March, p. 321–329, 2012.

