

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

**RESPOSTA IMUNE-HUMORAL E PROTEINOGRAMAS
SÉRICOS DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS
PELO *Trypanosoma vivax***

Paulo Henrique Sampaio

Médico Veterinário

2013

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

**RESPOSTA IMUNE-HUMORAL E PROTEINOGRAMAS
SÉRICOS DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS
PELO *Trypanosoma vivax***

Paulo Henrique Sampaio

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

S192r Sampaio, Paulo Henrique
Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* / Paulo Henrique Sampaio. -- Jaboticabal, 2013
xvi, 42 p.: il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Fabiano Antonio Cadioli
Coorientador: Luiz Carlos Marques
Banca examinadora: Marcos Rogério André, Willian Marinho Dourado Coêlho
Bibliografia

1. Proteínas. 2. Ruminantes. 3. Tripanossomíase. 4. Protozoário I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA IMUNE-HUMORAL E PROTEINOGRAMAS SÉRICOS DE BOVINOS
NATURALMENTE INFECTADOS PELO *Trypanosoma vivax*

AUTOR: PAULO HENRIQUE SAMPAIO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES

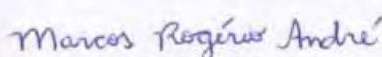
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba


Prof. Dr. WILLIAN MARINHO DOURADO COELHO

Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina / Andradina/SP


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Data da realização: 18 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paulo Henrique Sampaio, casado, nascido em 17 de setembro de 1986 em Turiuba – 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, Campus de Jaboticabal. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo número 2011/03302-2). Durante o curso de mestrado participou como colaborador de projetos de pesquisa da instituição e de projeto de cooperação internacional.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”

Filipenses 4.13

DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa Edilene, meus pais Alfeu e Eva e a minha irmã Maria Estela, pois todos me auxiliaram nesta longa caminhada, me oferecendo carinho, cuidado e amor, mesmo nos momentos difíceis, quando tudo aparentava impossível, eles me mostravam que era possível e assim cheguei até aqui, com a vontade de chegar mais longe.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pois sem eles nada conseguiria, nem ao menos subir um degrau.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Mestrado (processo número 2011/03302-2) e Auxílio à Pesquisa (processo número 2011/21531-9) concedidos.

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

À minha esposa Edilene, por estar comigo desde a graduação e me incentivar no caminho da ciência.

À minha família por me apoiar em minhas buscas incessantes pelo conhecimento.

Ao professor Dr. Fabiano Antonio Cadioli, pela confiança depositada em mim, e pela orientação na pós-graduação, que contribuiu enormemente para minha vida pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Luiz Carlos Marques, meu coorientador, que me motivou na busca do conhecimento.

À professora Dr^a Rosangela Zacarias Machado, pelo conhecimento que me passou, pela confiança que depositou em mim e pelos caminhos que me abriu.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, UNESP – Jaboticabal e Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Carla, Luiz, Marcia, Mayra, Marcos, Otávio e Rafaela pela amizade e ajuda durante minha permanência no laboratório e fora dele.

Ao Paulo, Cláudia, Renata e Marilde do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pela amizade e cooperação durante minha passagem pelo laboratório.

Ao professor Dr. José Jurandir Fagliari, pela ajuda na análise dos proteinogramas séricos.

Ao professor Dr. José Carlos Barbosa pela ajuda na análise estatística.

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

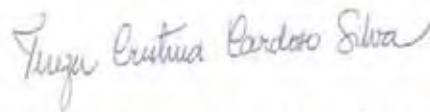
SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Infecção natural por <i>T. vivax</i>	10
4.2 Grupos de animais	11
4.3 Amostras de soro	11
4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	11
4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	12
4.6 Determinação da proteína sérica total e fracionamento eletroforético	13
4.7 Análise estatística	15
5. RESULTADOS	15
5.1 RIFI	15
5.2 ELISA.....	16
5.3 Proteinogramas séricos.....	17
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	30
8. REFERÊNCIAS	31

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DO TRYPANOSSOMA VIVAX EM INFECÇÕES NATURAIS E/OU EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS**” sob responsabilidade do **Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli** e colaboração de **Prof Titular Luiz Carlos Marques; Profa. Titular Rosângela Zacarias Machado; Profa. Dra. Patrícia de Athayde Barnabé; Profa. Dra. Daniela Bernadete Rozza; Christian Timich Battaglia** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 02080-2010.

Araçatuba, 14 de Março de 2010



Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

LISTA DE ABREVIACÕES

FA - Fosfatase alcalina
AST - Aspartato aminotransferase
CK - Creatina quinase
COX – Ciclooxigenase
DAI – Dias após a infecção
dL – Decilitro
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção enzimático
EROS - Espécies reativas do oxignio
GGT - Gama glutamil transferase
GVS – Glicoproteína variante de superfície
Hb – Hemoglobina
He – Eritrócitos
IFN – γ – Interferon gama
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
KDa – Kilodaltons
LAMP - Amplificação circular isotérmica
LDH - Lactato desidrogenase
LOX – Lipoxigenase
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
mL – Mililitro
NE – Nível de ELISA
NI – Não infectados
NIF – Naturalmente infectados
NK – Natural killer
PBS – Solução salina tamponada
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase
PFAs – Proteinas de fase aguda
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
SAA – Soro amilóide A
Th 1 – Linfócitos T subpopulação h1
Th 2 – Linfócitos T subpopulação h2
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β – Fator de necrose tumoral beta
VAbs - Variação da absorvância
VG - Volume globular
 μ g – Micrograma
 μ L – Microlitro
 μ m – Micrmetro

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
1 Níveis de ELISA (NE), variação da absorvância (VAb), número e porcentagem de amostras de soros bovinos naturalmente infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> provenientes do município de Lins – SP.....	17

LISTA DE QUADROS

Quadro	página
1 Média das concentrações séricas \pm Desvios Padrões (DP), Escore Médio e valores de significância “ <i>p</i> ” de Proteína total e frações protéicas em bovinos não infectados (NI) e naturalmente infectados (NIF) por <i>Trypanosoma vivax</i>	19

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1 Titulação de soros de bovinos naturalmente infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e sua respectiva porcentagem.....	16
2 Fotomicrografias de padrões de fluorescência obtida com amostras de soro bovino (título de 80), positiva (A) e negativa para anticorpos anti – <i>T. vivax</i> (título de 80) (B), na reação de imunoflorescência indireta (obj. 100X).....	16
3 Médias e desvios Padrão das concentrações séricas de proteína total, Ig A, ceruloplasmina, proteínas de 95 KDa e 88 KDa, transferrina, albumina, antitripsina, haptoglobina, IgG, proteínas de 23 KDa e 20,5 KDa em bovinos naturalmente infectados pelo <i>Trypanosoma vivax</i> (NIF) e não infectados (NI) pelo SDS-page.....	20

Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax*

RESUMO – Em bovinos o protozoário *Trypanosoma vivax* causa enfermidade que pode levar à redução dos índices produtivos ou a morte do animal. O diagnóstico deste protozoário pode ser realizado por testes parasitológicos, sorológicos e moleculares. Entretanto estes testes não são capazes de fornecer prognóstico, indicar a fase da infecção e a responsividade ao tratamento instituído. Por outro lado, o proteinograma sérico pode fornecer tais informações. O objetivo do estudo foi determinar o perfil eletroforético de proteínas de fase aguda de bovinos Girolando naturalmente infectados com *T. vivax* (NIF), utilizando-se como matriz gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram estudados dois grupos de animais, NIF (n=507) e grupo de bovinos não infectados (NI; n=50). Amostras de soros de ambos os grupos foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos *anti-T. vivax* e realização do fracionamento eletroforético. A porcentagem de soros positivos pela RIFI foi de 89,74% e pelo ELISA 93,09%, sendo que este método mostrou-se capaz de detectar mais amostras positivas do que a RIFI para detecção de anticorpos *anti-T. vivax* em fases iniciais da infecção. No fracionamento proteico foram consideradas 12 proteínas; sendo elas IgA, ceruloplasmina, proteínas de 95 KDa, 88 KDa, transferrina, albumina, antitripsina, IgG, haptoglobina, glicoproteína ácida e proteínas de 23 KDa e 20,5 KDa. No grupo NIF observou-se aumento de proteína total, IgA, proteína de 88 KDa, albumina, antitripsina, IgG, haptoglobina, 20,5 KDa e diminuição de ceruloplasmina, proteína de 95 KDa e 23 KDa e transferrina. Glicoproteína ácida não apresentou diferença significativa entre os grupos NIF e NI. A antitripsina pode ser utilizada como indicador da infecção em bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* por estar presente apenas em animais do grupo NIF. Mais estudos devem ser conduzidos a fim de identificar as proteínas de 95, 88, 23 e 20,5 KDa e seu papel na fisiopatogenia da enfermidade causada pelo *T. vivax*.

Palavras-chave: proteínas, ruminantes, tripanossomíase, protozoário

Immune-humoral response and acute phase proteins of bovines naturally infected with *Trypanosoma vivax*

ABSTRACT – The protozoan *T. vivax* can cause an important disease in cattle, which is responsible for death or low index productive. The diagnosis is based on parasitologic, molecular and sorological tests. However, these tests are not able to provide prognostic, infection phase and response of treatment. On the other hand, serum proteinograms can accomplish these features. The present work aimed to assess the acute phase proteins eletrophoretic profile in Girolando cattle naturally infected by *T. vivax* (NIF) by SDS-Page. For this purpose, two groups of animals were utilized: one naturally infected by *T. vivax* (NIF; n=507) and another one by non-infected cattle (NI; n=50). Serum samples were submitted to IFA and ELISA for detecting IgG antibody to *T. vivax*. SDS-Page was only performed in samples which showed positive results in serological testes. The percentage of positive samples by IFA and ELISA were 89,74% and 93,09%, respectively. ELISA showed a higher number of seropositive samples when compared to IFA. In eletrophoretic fractioning 12 proteins were evaluated, including IgA, ceruloplasmin, 95 KDa and 88 KDa proteins, transferrin, albumin, antitrypsin, IgG, haptoglobin, acidic glycoprotein, and 23 KDa and 20,5 KDa proteins. NIF animals showed an increase of serum concentration of IgA, 88 KDa, albumin, antitrypsin, IgG, haptoglobin, 20,5 KDa when compared to NI animals; on the other hand, serum concentration of ceruloplasmin, 95 KDa and 23 KDa proteins, and transferrin were lower in NIF animals when compared to NI animals. Acidic glycoprotein serum concentration did not shown differences when both groups of sampled animais were compared. Since Antitrypsin was only detected in NIF animals, this protein may be used as a marker of *T. vivax*-infection in cattle. More studies should be performed aiming to clarify the identity of 95, 88, 23, 20,5 KDa proteins and correlate them to physiopathogeny of infection caused by *T. vivax*.

Key words: proteins, ruminants, trypanosomiasis, protozoan

1. INTRODUÇÃO

Tripanossomíases são doenças cosmopolitas que acometem humanos e animais. Na África *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. b. gambiense* causam a doença do sono no homem, enquanto *T. brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*, afetam rebanhos animais causando importantes prejuízos econômicos (HOARE, 1972). Adicionalmente, pesquisas recentes indicam que outras espécies de tripanossoma possam estar envolvidas em casos de tripanossomíases animais e humanas. Anteriormente considerado apatogênico, *T. theileri* tem sido observado causando infecções com sinais clínicos em bovinos (LANEVSKI-PIETERSMA; OGUNREMI; DESROCHERS, 2004; SOOD et al., 2011). Além disso, *T. evansi* e *T. lewisi* emergem como agentes potencialmente zoonóticos (JOSHI et al., 2005; POWAR et al., 2006; SHEGOKAR et al., 2006; SHAH et al., 2011).

Na América do Sul destacam-se as infecções causadas pelos *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas em humanos e cães; *Trypanosoma equiperdum*, responsável por uma doença crônica sexualmente transmitida em equídeos; *T. evansi*, agente causador de distúrbios neuromusculares em equídeos e outros mamíferos e *T. vivax*, agente patogênico que parasita ruminantes domésticos e silvestres (DÁVILA; SILVA, 2000; SILVA; LIMA; RAMIREZ, 2004).

No Brasil, infecções por *T. vivax* em rebanhos bovinos têm ocorrido com frequência cada vez maior e vem se espalhando pelo território nacional. Inicialmente foram descritos surtos na região amazônica (PEREIRA; ABREU, 1978), Amapá (SERRA-FREIRE, 1981) e Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 2000a), áreas consideradas endêmicas para a doença. Entretanto, na última década já foram observados surtos por *T. vivax* na Paraíba (BATISTA et al., 2007), Maranhão (FEITOSA JÚNIOR et al., 2004; GUERRA et al., 2008), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008, CUGLOVICI et al. 2010), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Pernambuco (BAPTISTA FILHO et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012) e São Paulo (CADIOLI et al., 2012).

A infecção por *T. vivax* ocasiona grandes perdas econômicas na bovinocultura em áreas tropicais (SEKONI et al., 1990), sendo que no Brasil o prejuízo estimado pode chegar a 17% do valor do rebanho afetado (SEIDL et al., 1999).

Em bovinos, o diagnóstico da tripanossomíase por *T. vivax* é dificultado, uma vez que o parasito desencadeia sintomas pouco específicos, tais como febre, anorexia, perda de peso, redução da produtividade de leite, anemia, aumento de linfonodos, abortos e sintomas neurológicos (BATISTA et al., 2008; CADIOLI et al 2012). O tratamento é simples, porém tem surgido *T. vivax* resistentes às drogas tripanocidas regulamentadas no Brasil (CADIOLI et al., 2012).

Trypanosoma vivax tem ganhado importância no Brasil, em virtude do aumento no número de surtos em áreas não endêmicas. Entretanto não há controle oficial pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No futuro, devido à sua disseminação, *T. vivax* poderá trazer prejuízos maiores à pecuária, devido às mortes e redução dos índices produtivos nos rebanhos acometidos.

Em virtude das dificuldades encontradas no diagnóstico deste protozoário, e da possibilidade de utilização do proteinograma sérico como uma ferramenta de diagnóstico de *Trypanosoma vivax*, associado à falta de dados referentes à proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados por este protozoário e com número de amostras elevado, se justifica o presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Trypanosoma vivax é um hemoprotozoário pertencente à família Trypanosomatidae, seção Salivaria, subgênero *Dutonella*. Morfologicamente podem ser observadas desde formas mais delgadas com a porção posterior da célula arredondada, até formas largas e curtas denominadas formas “atarracadas”, com a região posterior final do corpo mais estreita, membrana ondulante evidente e cinetoplasto menor (HOARE, 1972). Seu comprimento total varia entre 21 e 25,4 µm, possuindo um único flagelo livre. Seu cinetoplasto é grande, em forma de meia lua e

localizado na porção terminal ou subterminal, sendo a sua posição um fator de identificação morfológica da espécie (STEVENS; BRISSE, 2004).

Na África, *T. vivax* causa doença em equinos, bovinos, camelos e várias outras espécies de ruminantes, embora antílopes possam se infectar sem desenvolver a doença. Por outro lado, cães, suínos (SILVA; LIMA; RAMIREZ, 2004), ratos, camundongos e cobaias (SOLTYS e WOO, 1978) são refratários. Pouco se conhece sobre os reservatórios deste protozoário. Dávila et al. (2003) suspeitam que no Pantanal, os ruminantes possam agir como reservatório de *T. vivax* e *T. evansi*, em consequência das baixas parasitemias detectadas nestes animais.

No continente africano, nas áreas onde a *Glossina* sp. (mosca *tsé-tsé*) está presente, *T. vivax* é transmitido ciclicamente, ocorrendo o desenvolvimento do protozoário na mosca. Nas demais regiões da África e do mundo onde a *tsé-tsé* não ocorre, a transmissão é realizada mecanicamente por *Tabanus* sp, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* (SERRA-FREIRE e REZENDE, 1988; PAIVA et al., 2000a, OLIVEIRA et al., 2009, CADIOLI et al., 2012) ou de forma iatrogênica por fômites (SILVA et al., 1997).

Durante o curso das tripanossomíases verificam-se flutuações da parasitemia ou até intervalos aparasitêmicos (MORAES, 2001; ALMEIDA et al., 2010), que podem estar relacionados à resposta imunológica do hospedeiro e à variação antigênica das glicoproteínas variantes de superfície (GVS) dos tripanossoma (NANTULYA, 1990; CROSS, 2003). As GVS são glicoproteínas que revestem *Trypanosoma* sp. da Seção Salivaria e possuem papel na evasão do sistema imune do hospedeiro. As GVS do *T. vivax* também estimulam o hospedeiro, a produzir IL-1 e TNF- α (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006), as quais podem levar à supressão de eritropoiese (ANOSA; LOGAN-HENFREY; SHAW, 1992) e à produção de proteínas de fase aguda (PFAs) (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990).

O curso da infecção por *T. vivax* em bovinos pode apresentar-se na forma aguda, em que os animais apresentam alta temperatura, letargia, fraqueza, anemia e leve perda na condição física, morrendo dentro de cinco semanas (LOSOS e IKEDE, 1972); subaguda, que resulta em morte dentro de poucas semanas após a infecção (GARDINER, 1989); e a forma crônica, caracterizada por anemia e

emaciação progressiva (UNSWORTH; BIRKETT, 1952) associadas à baixa parasitemia e progressivo desenvolvimento da doença (GARDINER, 1989).

Os sinais clínicos observados em bovinos infectados com *T. vivax* incluem perda de apetite, febre, letargia, fraqueza, lacrimejamento, conjuntivite, diarreia, abortamento, emaciação, incoordenação motora, tremores musculares, opistótono, cegueira, estrabismo lateral, hipermetria e morte (SILVA et al., 1995, 1996, 1997, 1999, 2009; BATISTA et al., 2008; CADIOLI et al., 2012). Diminuição da produção de leite, ceratite, descarga nasal, icterícia, aumento de linfonodos e edema submandibular também foram relatados (CADIOLI et al., 2012). A presença de numerosas petéquias, equimoses e diátese hemorrágica também foram observadas (GARDINER et al., 1989).

Os abortos podem ocorrer no terço final da gestação e em alguns casos ocorrem nascimentos de prematuros (PIMENTEL et al., 2012). Verifica-se, ainda, mortalidade no período do parto, assim como prolongamento do período para retorno da atividade cíclica ovariana (OKECH et al., 1996).

Os sinais neurológicos comumente encontrados são caracterizados por incoordenação motora, fasciculações musculares, opistótono, cegueira, estrabismo, dismetria, ataxia e fraqueza muscular (BATISTA et al., 2007; CADIOLI et al., 2012).

No exame anatomopatológico de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados por *T. vivax* observaram-se hidropericárdio, linfadenopatia, discreta hepatomegalia e esplenomegalia (PAIVA et al., 2000b; CADIOLI et al., 2012).

As principais lesões observadas no exame histopatológico em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* são hepatite, nefrite e pneumonia focais, hiperplasia folicular de linfonodos e adrenalite (MORAES, 2001). No intestino, vesícula urinária e coração observa-se infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Nos rins pode ser notado edema, enquanto no coração parasitos podem ser encontrados entremeados no tecido subepicárdico (ALMEIDA et al., 2010). Verifica-se meningite e mielite com manguitos perivasculares, predominando células mononucleares e macrófagos, associados à presença de malácia e células Gitter, no sistema nervoso central de animais infectados por *T. vivax* (BATISTA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010).

Nos órgãos reprodutivos a infecção pelo *T. vivax* pode ocasionar degeneração testicular (BEZERRA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010), epididimite e hiperplasia do epitélio epididimário. Foi confirmada pela PCR a presença deste parasito no tecido testicular de dois ovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* (BEZERRA et al., 2008).

No exame bioquímico, as enzimas gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK) permanecem em valores de atividade sérica abaixo daquelas apresentadas em animais não infectados por *T. vivax*, porém somente em alguns momentos verifica-se uma redução abaixo do valor de normalidade (ALMEIDA et al., 2010). Corroborando com estes dados, não foram encontrados valores diferentes daqueles da faixa de normalidade das enzimas AST, GGT, CK (SCHENK et al., 2001). E ao avaliarem os níveis de uréia e creatinina, estes apresentavam dentro do intervalo de normalidade. Por outro lado o fibrinogênio pode estar aumentado (CADIOLI et al., 2012).

Nas tripanossomíases observam-se diminuição da albumina sérica e manutenção dos níveis de proteína total devido ao incremento das globulinas; entretanto inicialmente proteína total tende a reduzir aumentando posteriormente pelo incremento da fração gama globulina (SCHENK et al., 2001; CADIOLI et al., 2006), a qual é composta principalmente por imunoglobulinas (ECKERSALL, 2008). A produção de globulinas parece estar relacionada com a variação antigênica do parasito e aos sucessivos estímulos antigênicos que o *T. vivax* produz (BRADLEY, 2003).

No eritrograma verifica-se redução do volume globular (VG), hemoglobina (Hb) e do número de eritrócitos (He), sendo que a anemia inicialmente é macrocítica e posteriormente pode tornar-se microcítica, acompanhada ou não de reticulocitose (ANOSA; ISOUN, 1980). Volume globular, número de hemácias e concentração de hemoglobina podem estar dentro da normalidade ou diminuídos (SILVA et al., 1999; CADIOLI et al., 2012). Anemia é um dos principais achados na enfermidade causada pelo *T. vivax* (SALGADO et al., 2011; CADIOLI et al., 2012) e pode ser resultante da eritrofagocitose (ANOSA; LOGAN-HENFREY; SHAW, 1992), hemólise intravascular

imunomediada (ANDRIANARIVO et al., 1995) e em uma fase tardia, pela hematopoiese inadequada (FIENNES, 1954).

O leucograma pode estar normal, todavia em ocasiões onde há severa anemia, leucopenia pode estar presente (MAXIE; LOSOS; TABEL, 1979; ESIEVO; SAROR, 1983; SILVA et al., 1999; CADIOLI et al., 2012). Todavia, a leucocitose mostra-se mais predominante (CADIOLI et al., 2012). Corroborando com estas informações, ANOSA e ISOUN, (1980) observaram leucopenia na fase inicial da infecção, em decorrência de linfopenia, neutropenia e eosinopenia, com leucocitose em fase posterior da enfermidade (ESIEVO; SAROR, 1983).

O diagnóstico da infecção por *T. vivax* pode ser realizado com base em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (SILVA et al., 2002). Dentre os métodos parasitológicos destacam-se os esfregaços sanguíneos corados (NDAO et al., 2000; SILVA et al., 2002), aspirado de linfonodo (SILVA et al., 2002), técnicas de concentração em tubo de microhematócrito (WOO, 1970) e de centrifugação em colunas de troca iônica (BÜSCHER et al., 2009); Entretanto, tais métodos todos apresentam baixa sensibilidade, a qual mostra-se variável em razão da parasitemia.

Os principais métodos sorológicos empregados no diagnóstico de tripanossomíases são Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) (NANTULYA, 1990; VAN DEN BOSSCHE et al., 2001; SILVA et al., 2002) e o Teste de Aglutinação em Cartão. Os métodos sorológicos são mais sensíveis que os parasitológicos anteriormente mencionados e, por isso, de grande valor nas investigações sorológicas. Estes métodos indicam contato prévio com o parasito, mas não permitem indicar se ainda há infecção ou se o animal respondeu ao tratamento (NANTULYA, 1990).

Métodos moleculares como o Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional (CLAUSEN et al., 1998), PCR em tempo real (KNOWLES JUNIOR; LI; PASTORET, 2008) e a amplificação circular isotérmica (LAMP) (KUBOKI et al., 2003; LAOHASINNARONG et al., 2011) são ótimos indicadores da presença do DNA de *T. vivax* no sangue dos animais, embora não permitam indicar a gravidade da infecção, prognóstico e em indicar em qual fase da infecção na qual o hospedeiro se encontra.

O proteinograma sérico é uma ferramenta de diagnóstico que pode prever prognóstico, indicar a fase da infecção e se está ocorrendo resposta ao tratamento (NDUNG'U; ECKERSALL; JENNINGS, 1991; OHWADA; TAMURA, 1995; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; COSTA et al., 2010).

Proteínas de fase aguda (PFAs) parecem mostrar maior sensibilidade na detecção de inflamação do que a análise hematológica (HORADAGODA et al., 1999). Skinner e Roberts (1994) demonstraram que a haptoglobina foi melhor indicador de infecção bacteriana em ovinos quando comparado aos exames hematológicos, indicando que o perfil de PFAs é uma possível ferramenta de diagnóstico, haja vista que as modificações destas proteínas ocorrem em tempo menor do que as alterações verificadas na hematologia.

PFAs são glicoproteínas produzidas principalmente pelo fígado (SINGH; PACHAURI, 2002), cuja concentração plasmática aumenta ou diminui rapidamente durante condições inflamatórias (ECKERSALL; CONNER, 1988; SCHULTZ; ARNOLD, 1990) para prevenir danos teciduais, isolar e destruir o agente infeccioso e promover reparação tissular (BAUMANN; GAULDIE, 1994). Como as PFAs relacionam-se com a severidade da enfermidade e a extensão do dano tecidual, sua quantificação pode fornecer informações sobre o diagnóstico e prognóstico de determinada enfermidade (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

A indução da produção de PFAs é mediada por citocinas, liberadas pelos leucócitos e macrófagos (BURGER; DAYER, 2002), como IL-6, IL-1 e TNF- α , as quais estimulam a produção de PFAs positivas e reduzem a produção das PFAs negativas (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Embora variem conforme a espécie animal, as principais PFAs são proteína C-reativa, soro amilóide A (SAA), haptoglobina, fibrinogênio, ceruloplasmina, orosomucoide, α 1-antitripsina, α 2-antitripsina α -globulina, complemento, proteínas de coagulação, transferrina, glicoproteína ácida α 1 e proteínas ligantes de lipopolissacarídeos (KENT, 1992; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CARAPETO et al., 2006; CECILIANI et al., 2012).

De modo geral, as PFAs podem ser classificadas em positivas, como proteína C-reativa, haptoglobina, ceruloplasmina, α 1-antitripsina e fibrinogênio (TRUMELL;

SCHELLCHER; BRAUN, 1996; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004) que se elevam proporcionalmente ao dano tecidual após instalação de um processo inflamatório (KENT, 1992; GODSON et al., 1996) e PFAs negativas, como pré-albumina, transferrina e albumina, cujos valores séricos tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994; SINGH; PACHAURI, 2002, MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Em ruminantes, as PFAs mais importantes são soro amilóide A, haptoglobina, proteínas ligantes de lipopolissacarídeos e glicoproteína ácida- α 1 (CECILIANI et al., 2012).

Proteína soro amilóide A (SAA) é dividida em A (fase aguda) e C (constitutiva). Sendo apenas a primeira de importância veterinária, já que a segunda é identificada apenas em humanos e ratos. A SAA pode demonstrar aumento na sua concentração em até 1000 vezes durante o processo inflamatório (UHLAR; WHITEHEAD, 1999). Recentemente, observou-se que a SAA em ruminantes liga-se e elimina o colesterol, aumenta a produção de mucina intestinal, aumenta a quimiotaxia de polimorfonucleares e monócitos e promove opsonização de bactérias Gram positivas e negativas (CECILIANI et al., 2012).

Haptoglobina de ruminantes se liga à hemoglobina e previne danos por espécies reativas do oxigênio (EROS), possui atividade bacteriostática, de angiogênese, atividade de chaperona, aumenta liberação de mediadores antiinflamatórios, além de sinalização intracelular e promoção da redução da quimiotaxia, inibindo ainda a formação de lipoxigenase (LOX), ciclooxigenase (COX), EROS, catepsina B e enzimas lisossomais (CECILIANI et al., 2012).

Proteínas ligantes de lipopolissacarídeos promovem a opsonização de bactérias Gram negativas, estimulam a angiogênese, atuam como chaperonas e em altas concentrações possui atividade proinflamatória, embora em baixas concentrações tenha caráter antiinflamatório (CECILIANI et al., 2012).

Glicoproteína ácida α 1 atua reduzindo a quimiotaxia, degranulação, produção de EROS e aumento de produção de IL-8 em polimorfonucleares; em monócitos desencadeia aumento de citocinas antiinflamatórias e TNF- α , e reduz apoptose. Possui função de ligação e transporte no plasma de mediadores inflamatórios,

moléculas derivadas de bactérias e drogas, atividade antibacteriana direta e atua como chaperona (CECILIANI et al., 2012).

Mudanças em diferentes frações protéicas do soro foram encontradas em camelos (BOID et al., 1980), bezerros (VERMAM e GAUTAN, 1982) e equinos (RAZA et al., 1982; WINKLER, 1982; MONZÓN e VILLAVICENCIO, 1990) infectados com *T. evansi*, nos quais observaram-se aumento de gamaglobulina e diminuição de albumina. Costa et al. (2010), afirmaram que o proteinograma de gatos experimentalmente infectados com *T. evansi*, apresenta características específicas que podem determinar a fase na qual a doença se encontra.

O perfil eletroforético das proteínas séricas de animais infectados por *Trypanosoma* sp demonstram que as PFAs possuem um papel potencial no auxílio ao diagnóstico (TEIXEIRA et al., 2008; AQUINO et al., 2010; COSTA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012).

Em infecção experimental de cães por *T. brucei*, observaram elevação da proteína C-reativa concomitante aos picos parasitemicos, e sua redução após tratamento, demonstrando que a proteína C-reativa varia conforme a fase da infecção e resposta ao tratamento (NDUNG'U et al., 1991).

Em infecção experimental por *T. evansi* em ovinos, haptoglobina e glicoproteína ácida apresentaram-se elevadas em comparação com o grupo não infectado (PASSOS et al., 2011). Já em infecções por *T. vivax*, antitripsina e transferrina aumentaram a partir do 45^o dias após infecção (DAÍ), podendo ser utilizadas como auxílio no diagnóstico principalmente na fase crônica da infecção quando ocorrem baixas parasitemias ou períodos aparasitemicos (ALMEIDA et al., 2012).

Além disso, poucos são os estudos realizados a respeito do comportamento das PFAs em infecções pelo *T. vivax*, sendo que não há na literatura compilada, dados provenientes de animais naturalmente infectados pelo *T. vivax*, fato que justifica o presente estudo.

Deste modo, o perfil das proteínas, incluindo as PFAs, durante o curso da infecção causada pelo *T. vivax* pode vir a ser uma ferramenta valiosa para detecção precoce e avaliação da progressão e gravidade desta enfermidade, principalmente

em condições de parasitemia baixa, permitindo que melhores ações terapêuticas e preventivas sejam tomadas.

3. OBJETIVOS

- Detectar anticorpos IgG anti – *T. vivax* por meio da RIFI e do ELISA nos soros de bovinos Girolando naturalmente infectados com *T. vivax*.
- Determinar o perfil eletroforético das proteínas de fase aguda de bovinos Girolando naturalmente infectados com *T. vivax*, utilizando-se como matriz gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Infecção natural por *T. vivax*

Os animais naturalmente infectados por *T. vivax* foram provenientes de rebanho de bovinos leiteiros, raça Girolando, acometido por *T. vivax* no município de Lins (SP) e diagnosticado por Cadioli et al. (2012). O surto de tripanossomíase ocorreu em uma fazenda com 1080 bovinos Girolando em sistema semi-intensivo e o hemoparasito foi introduzido no rebanho por um lote de 21 vacas provenientes de Ivinhema (MS). A espécie do tripanossoma foi determinada por meio de exames parasitológicos direto, previamente descritos por Salgado et al. (2011) e por PCR, cujo alvo é sequência de genes codificadores de cisteíno-protesases (Catepsina L), técnica previamente descritos por CORTEZ et al. (2009).

4.2 Grupos de animais

O grupo infectado foi composto por 507 amostras de soro sanguíneo de bovinos Girolando naturalmente infectados (NIF) por *T. vivax* e o grupo controle, por 50 amostras de soro de bovinos Girolando sadios, não infectados (NI), provenientes da região de Jaboticabal, São Paulo, considerada livre da doença.

4.3 Amostras de soro

As amostras de sangue dos bovinos dos grupos NIF e NI foram colhidas através de venopunção da veia jugular externa, utilizando-se o sistema Vacutainer (B.D Indústria Cirurg., Juiz de Fora, MG). O soro obtido foi dividido em alíquotas de 1,0 mL, devidamente identificadas e mantidas em freezer -80°C. Todas as amostras obtidas foram submetidas à RIFI e ELISA para detecção de anticorpos anti - *T. vivax*. Para a realização do proteinograma sérico foram selecionadas apenas amostras de soro positivas do grupo NIF para RIFI e ELISA com NE > 3, e no grupo NI apenas as amostras que se mostraram negativas em ambos os testes sorológicos foram submetidas ao fracionamento eletroforético.

4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Tripomastigotas foram separados do sangue total conforme descrito por González et al (2005) e, posteriormente, distribuídos em lâminas de microscopia, dentro de cavidades previamente delimitadas. As lâminas contendo o substrato antigênico foram secas à temperatura ambiente, fixadas com acetona, embrulhadas em papel higiênico extrafino, acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado, e congeladas a -20°C até serem utilizadas.

O conjugado empregado foi a gamaglobulina de coelho anti-IgG de bovino, acoplado ao isotiocianato de fluoresceína IgG de coelho anti-IgG de bovino - molécula total (Sigma, FITC-F7887, 2 mL, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos)

As lâminas preparadas para as provas de Imunofluorescência Indireta foram descongeladas à temperatura ambiente e em cada cavidade foram pipetadas

diluições sucessivas de cada soro (1/40 a 1/1280). As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 35 minutos e a seguir, submetidas a três lavagens por imersão de cinco minutos cada em solução salina tamponada (PBS) de pH 7,2 (AQUINO et al., 1999).

Após secagem, as cavidades das lâminas foram recobertas com IgG de coelho anti-IgG bovino conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e diluído 1:300 em solução de PBS, contendo azul de Evans 1 mg%. Após adição do conjugado, as lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 35 minutos e submetidas a três lavagens por imersão em PBS durante cinco minutos cada e à uma quarta lavagem de 30 segundos em água tridestilada. Após secagem, as lâminas foram recobertas com glicerina tamponada na proporção 9:1 (glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 9,6), seguida da montagem com lamínula e, subsequentemente, observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus BX-FLA).

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os tripomastigotas foram purificados conforme descrito por González et al. (2005). O conteúdo protéico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicincôninico utilizando “kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit- Pierce Chemical Company). As determinações foram realizadas em duplicatas com base na leitura de valores padrão. A concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) foi calculada por regressão linear de valores padrões.

O ELISA foi realizado conforme preconizado por Aquino et al. (1999). As diluições ótimas do antígeno e dos soros controle positivo e negativo foram determinadas por titulação em bloco, utilizando-se o antígeno nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ em tampão carbonato- bicarbonato (0,05 M pH 9,6) e, os soros de referência positivo e negativo nas diluições 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200 em tampão PBS 0,01M pH7,4, contendo 0,05% de Tween 80 (PBS Tween), acrescido de 5% de leite em pó desnatado. O conjugado utilizado, foi IgG de coelho anti-IgG de bovino acoplada à fosfatase alcalina (Sigma - A0793- 1 mL, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), sendo diluído em PBS Tween 80 acrescido de 5% de leite em pó desnatado.

Em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunc MaxiSorp[®]), foram adicionados 100 µL do antígeno solúvel diluído, em sua concentração ótima de reatividade em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, ajustando-se sua concentração protéica para 10 µg/mL.

As placas foram incubadas durante 12-14 horas em câmara úmida à temperatura de geladeira (~8°C) e lavadas por três vezes consecutivas em PBS-Tween 80. As placas foram bloqueadas em tampão de carbonato-bicarbonato de sódio adicionado de 6% de soro normal de coelho e colocadas em câmara úmida a 37°C por 90 minutos e, a seguir, lavadas conforme descrito anteriormente. Os soros testes e os de referências positivos e negativos foram testados em duplicatas e diluídos (1/100) em PBS Tween 80 acrescido de 5% de leite em pó desnatado, seguindo-se nova incubação e lavagem, como na etapa anterior. À cada cavidade, foram adicionados 100 µL de conjugado diluído (1:30.000) em PBS Tween 80 acrescido de 5% de leite em pó desnatado, seguindo-se nova incubação e lavagem. Após esta etapa, foram adicionados 100 µL do substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a reação foi bloqueada pela adição de 25 µL de NaOH 3,0 M. A leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Dynex, Microplate Reader MRX), em comprimento de onda de 405 nm, adotando-se como “branco” da reação a cavidade da microplaca que continha todos os elementos da reação com exceção do soro bovino.

4.6 Determinação da proteína sérica total e fracionamento eletroforético

Para determinação da proteína sérica total empregou-se o método do biureto (Proteínas Totais, Labtest[®], Belo Horizonte, Brasil) e leitura em espectrofotômetro semiautomático (Labquest, Bio 2000, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Para a identificação e quantificação das proteínas foi realizado o fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se a técnica descrita por Laemmli (1970).

Os géis que serviram de matriz para a separação das proteínas foram preparados a partir das misturas descritas a seguir: o gel de separação a 10% composto de 11,9 mL de água deionizada; 5,9 mL de tris HCl 2 M, pH 8,8; 10,5 mL de Bis acrilamida 30%, 2,67%C (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos); 1,7 mL de glicerol; 0,63 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5 M, pH 8,3; 0,63 mL Dodecil Sulfato de Sódio a 10%. Adicionou-se 27 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 242 µL de persulfato de amônia a 10% para a polimerização do gel. Para o gel de empilhamento a 4% foram misturados 3,95 mL de água deionizada; 0,6 mL de tris HCl 2 M, pH 8,8; 1 mL de Bis acrilamida 30%, 2,67%C; 300 µL de glicerol; 123 µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5 M, pH 8,3; 123 µL Dodecil Sulfato de Sódio a 10% e por último adicionou-se 11 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 54 µL de persulfato de amônia a 10% para a polimerização do gel. Todos os reagentes utilizados pertenciam a marca Sigma (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos)

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado (BRL – Bethesda labs, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos) em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30 g de trisbase (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos), 112,50 g de glicina (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), 10,0 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que continha o gel entrou em contato com cuba contendo a mesma solução tampão pH 8,5

As amostras para o fracionamento protéico foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluído em 30 µL de tampão fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Uma alíquota de 5 µL dessa amostra foi depositada no gel, que foi submetido à corrente elétrica a 50 mA, em fonte apropriada. Terminada a separação, a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel, retirado da placa para ser corado, durante 10 minutos, em 200 mL de solução de azul de Comassie, constituído de álcool metílico (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de Comassie (0,25%). Em seguida o gel foi banhado em solução de ácido acético glacial 5 a 7% para a retirada do excesso de corante, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram mensuradas por densitometro

computadorizado (Shimadzu CS[®] – 9301 PC, Tóquio, Japão) e software (Shimadzu 2-D, Spectrographic image analysis program v. 2.0 Tóquio, Japão). Como referência utilizou-se uma solução marcadora (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) com pesos moleculares 20.000, 24.000, 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 200.000 KDa, além de proteínas purificadas (Nembutal, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Estados Unidos) – albumina, IgG, ceruloplasmina, haptoglobina, α 1-antitripsina e transferrina.

4.7 Análise estatística

Uma vez observada à distribuição não normal dos dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se significativos valores de $p < 0,05$, com auxílio do Software SAS versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5.1 RIFI

Na RIFI 89,74% (455/507) e 10,26% (52/507) dos soros mostraram-se positivos e negativos, respectivamente, para anticorpos anti - *T. vivax*. Os dados obtidos na titulação pela RIFI estão apresentados na figura 1. Na figura 2 estão representadas fotomicrografias dos padrões de fluorescência obtidos com amostra de soro positiva e negativa para anticorpos anti - *T. vivax*.

Figura 1 - Titulação de soros de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e sua respectiva porcentagem.

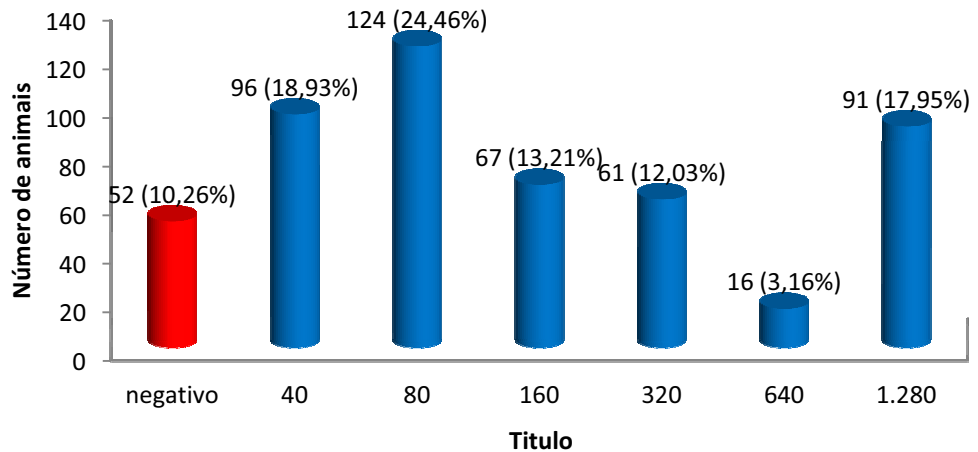
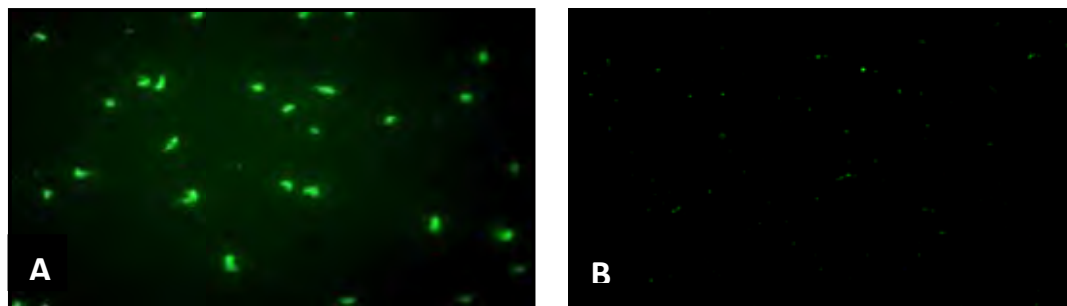


Figura 2 - Fotomicrografias de padrões de fluorescência obtida com amostras de soro bovino (título de 80), positiva (A) e negativa para anticorpos anti – *T. vivax* (título de 80) (B), na Reação de Imunofluorescência Indireta (obj. 100X).



5.2 ELISA

Pela titulação em bloco, encontrou-se a concentração ótima de antígeno (10 µg/mL), assim como a diluição ótima dos soros controle positivos e negativos (1/100). Para determinar o ponto de corte, as absorbâncias médias dos soros testados foram agrupadas em níveis de ELISA (NE), os quais variaram entre 0 e 9, sendo considerados negativos soros apresentando $NE \leq 3$. O limite superior do nível zero foi calculado pela absorbância média dos soros controles negativos somados

duas vezes o desvio padrão, e os níveis subsequentes foram determinados pela adição de 35% (MACHADO et al., 1997). A absorbância média para os soros controles positivos e negativos foram de $0,885 \pm 0,428$ e $0,131 \pm 0,030$, respectivamente. A absorbância média dos controles negativos foi multiplicado por 3 (0,393) para que se definisse o ponto de corte, o qual no presente teste foi NE 3. Os níveis de ELISA foram divididos conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis de ELISA (NE), variação da absorbância (VAbs), número e porcentagem de amostras de soros bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* provenientes do município de Lins - SP.

NE	VAbs	Número de animais (%)
0	0 – 0,193	10(1,97)
1	0,194 – 0,261	2 (0,4)
2	0,262 – 0,328	2 (0,4)
3	0,329 – 0,396	21 (4,14)
4	0,397 – 0,463	30 (5,92)
5	0,464 – 0,531	34 (6,71)
6	0,532 – 0,598	35 (6,90)
7	0,599 – 0,666	49 (9,66)
8	0,667 – 0,733	42 (8,28)
9	$\geq 0,734$	282 (55,62)
Total		507 (100)

5.3 Proteinogramas séricos

Das 507 amostras de soros bovinos, 429 foram submetidas ao fracionamento eletroforético, a seleção foi realizada com base no resultado dos testes sorológicos, sendo utilizadas exclusivamente amostras positivas pela RIFI e ELISA (NE > 3).

Nos proteinogramas séricos foram consideradas e avaliadas 12 proteínas, as quais foram selecionadas com base no conhecimento das posições de frações proteicas no gel, obtida pelas proteínas purificadas, ou pela visualização das proteínas em ambos os grupos. Entre as proteínas consideradas temos IgA, ceruloplasmina, proteínas de 95 KDa e 88 KDa, transferrina, albumina, $\alpha 1$ -antitripsina, IgG, haptoglobina, glicoproteína ácida, proteínas de 23 KDa e 20,5 KDa. As médias e desvios padrões das concentrações séricas das respectivas proteínas e de proteína total estão representadas no Quadro 1.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NIF e NI em relação as concentrações de proteína total, IgA, Ceruloplasmina, proteína de 95 KDa, proteína de 88 KDa, Transferrina, Albumina, Antitripsina, IgG, Haptoglobina, proteínas de 23 KDa e 20,5 KDa.

As concentrações séricas de proteína total e as PFAs IgA, proteína de 88 KDa, albumina, antitripsina, IgG, haptoglobina e proteína de 20,5 KDa mostraram-se aumentadas significativamente no grupo NIF quando comparado ao grupo NI. Por outro lado, as PFAs ceruloplasmina, proteína de 95 KDa, transferrina e proteína de 23 KDa apresentaram diminuição significativa no grupo NIF quando comparado ao grupo NI. Não foi observada diferença significativa na concentração sérica de Glicoproteína Ácida entre o grupo NIF e NI (Quadro 1, figura 3).

Quadro 1 – Média das concentrações séricas \pm Desvios Padrões (DP), Escore Médio, e valores de significância “p” de proteína total e frações protéicas em bovinos não infectados (NI) e naturalmente infectados (NIF) por *Trypanosoma vivax*.

		Grupo		Teste Kruskal-Wallis (X^2)	p
		NIF	NI		
Proteína total	Escore Médio	250,21	152,42	22,3495	<0,0001*
	Média \pm DP (g/dL)	8,57 \pm 0,83	8,4 \pm 3,06		
IgA	Escore Médio	245,85	189,82	7,3369	0,0068*
	Média \pm DP (mg/dL)	208,79 \pm 84,23	178,47 \pm 68,19		
Ceruloplasmina	Escore Médio	231,31	314,58	16,2068	<0,0001*
	Média \pm DP (mg/dL)	40,46 \pm 26,7	113,56 \pm 84,75		
95 KDa [‡]	Escore Médio	232,38	305,42	12,4703	0,0004*
	Média \pm DP (mg/dL)	25,98 \pm 37,92	34,45 \pm 21,71		
88 KDa [‡]	Escore Médio	246,80	181,62	9,9307	0,0016*
	Média \pm DP (mg/dL)	89,78 \pm 72,70	58,41 \pm 40,25		
Transferrina	Escore Médio	235,08	282,20	5,1889	0,0227**
	Média \pm DP (mg/dL)	145,97 \pm 89,23	233,30 \pm 512,45		
Albumina	Escore Médio	247,58	174,94	12,3333	0,0004*
	Média \pm DP (mg/dL)	4716,26 \pm 566,62	4348 \pm 780,9		
Antitripsina	Escore Médio	242,21	221,00	4,7896	0,0286**
	Média \pm DP (mg/dL)	49,72 \pm 168,92	0		
Haptoglobina	Escore Médio	244,36	202,59	4,0778	0,0434**
	Média \pm DP	25,86 \pm 19,80	22,66 \pm 24,88		
Glicoproteína ácida	Escore Médio	236,83	267,18	2,1525	0,1423 ^{NS}
	Média \pm DP (mg/dL)	20,67 \pm 14,40	23,55 \pm 15,51		
23 KDa [‡]	Escore Médio	235,38	279,68	4,5877	0,0322**
	Média \pm DP (mg/dL)	155,62 \pm 60,89	187,83 \pm 96,08		
20,5 KDa [‡]	Escore Médio	250,19	152,56	22,2778	<0,0001*
	Média \pm DP (mg/dL)	13,66 \pm 11,35	9,77 \pm 4,78		
IgG	Escore Médio	245,32	194,32	6,08	0,0137**
	Média \pm DP (mg/dL)	2888,46 \pm 675,48	3870,59 \pm 711,01		

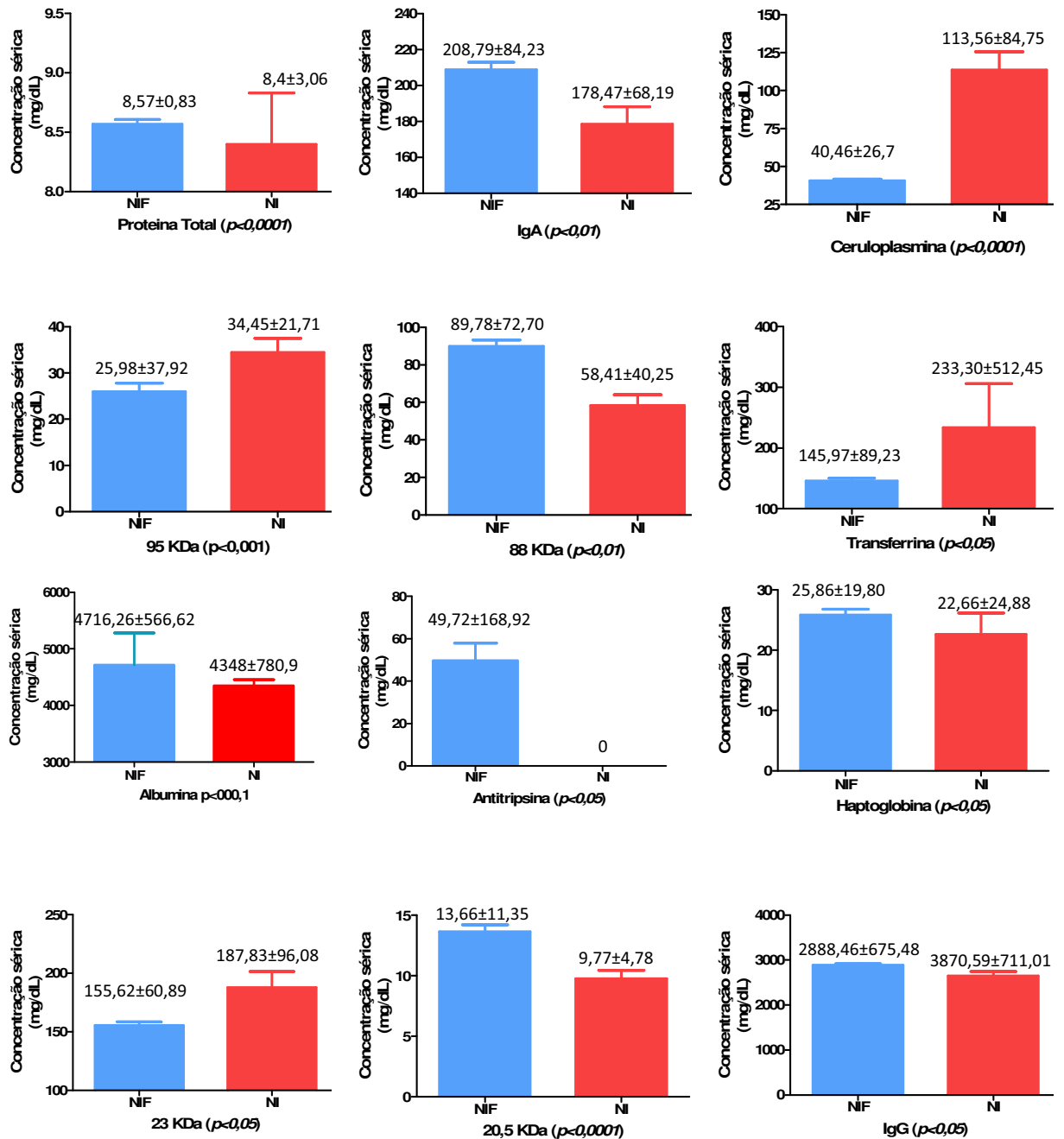
* 99% de significância

** 95% de significância

^{NS} Não significativo

[‡] Proteína não identificada

Figura 3 – Médias e desvios Padrão das concentrações séricas de proteína total, Ig A, ceruloplasmina, proteínas de 95 KDa e 88 KDa, transferrina, albumina, antitripsina, haptoglobina, IgG, proteínas de 23 KDa e 20,5 KDa em bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax* (NIF) e não infectados (NI) pelo SDS-page.



6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizadas 507 amostras de soro de bovinos obtidas durante surto de *T. vivax*, um percentual de 93,09% (472/507) foram positivas pelo ELISA (NE>3). Em contrapartida percentual de amostras positivas pela RIFI foi de 89,74% (455/507). Este resultado mostra que o ELISA foi capaz de detectar mais amostras positivas se comparado a RIFI, para a detecção de anticorpos anti-*T. vivax*. Lejon et al. (2003) trabalhando com ELISA calcularam sensibilidade e especificidade de 100% e 96,7%, respectivamente, para detecção de anticorpos anti-*T. congolense* e especificidade de 100% para anti-*T. vivax*, porém com baixa sensibilidade, entretanto, Platt e Adams (1976) avaliaram RIFI para o diagnóstico de *T. vivax* na América do Sul e observaram que não ocorreram reações cruzada com outros hemoparasitos, bem como não ocorreu nenhuma reação falsa positiva.

Segundo Teixeira (2010), IgG anti-*Trypanosoma evansi* são detectados pela RIFI em bovinos experimentalmente infectados a partir do 14º dia após a infecção (DAI) sendo que os títulos de anticorpos variaram entre 80 até 1280. No presente estudo, a titulação de anticorpos anti-*T. vivax* variou de forma similar. Assim supondo-se que a detecção de anticorpos IgG anti-*T. evansi* e anti-*T. vivax* pela RIFI em bovinos seja similar, pode-se sugerir que provavelmente as amostras positivas para este teste (455) foram provenientes de animais infectados por *T. vivax* há mais de quatorze dias.

Além disso, sabendo-se que o ELISA é capaz de detectar IgG anti-*T. evansi* em bovinos mais precocemente, por volta do quinto DAI (TEIXEIRA, 2010), e que no presente estudo observamos 47 amostras de soro positivas apenas no ELISA, sugere-se que estas amostras de soro foram provenientes de animais no início da infecção, ou seja, entre o quinto e 14º DAI.

Deste modo podemos inferir que 93,09% (472/507) das amostras de soro dos bovinos utilizados no presente estudo foram infectados pelo *T. vivax* durante o surto em Lins (SP), sendo que 9,27% (47/507) das amostras de soros eram provavelmente de animais que estavam na fase aguda da infecção.

Os métodos moleculares possuem alta sensibilidade (CLAUSEN et al., 1998; KUBOKI et al., 2003; KNOWLES JUNIOR; LI; PASTORET, 2008; LAOHASINNARONG et al., 2011), mas não são capazes de prever a gravidade e fase na qual se encontra a infecção, bem como o prognóstico e resposta ao tratamento. Em contrapartida, o proteinograma sérico é uma ferramenta de diagnóstico que pode responder estas questões. Já se sabe que perfis eletroforéticos específicos são encontrados para determinadas infecções, assim como para a fase desta infecção, podendo também prever o prognóstico e a resposta à terapia (COSTA et al., 2010; PASSOS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012).

As proteínas de fase aguda podem ser fracionadas no proteinograma sérico assim como outras proteínas, tornando possível sua mensuração. As PFAs são produzidas por meio de estímulo de citocinas, tais como a IL-6, IL-1 e TNF- α , liberadas pelos leucócitos e macrófagos (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; BURGER; DAYER, 2002), e GVS dos tripanossomas (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006). Por outro lado, a produção de PFAs negativas pode ser reduzida por IL-6, IL-1 e TNF- α em resposta à infecção (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

A transferrina apresentou um comportamento típico, reduzindo sua concentração frente à infecção por *T. vivax*, o que não ocorreu com a albumina, que teve sua concentração sérica aumentada (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994; SHINGH e PACHAURI, 2002, MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). ceruloplasmina, uma proteína de fase aguda positiva (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004), apresentou redução expressiva, o que não ocorreu com haptoglobina e antitripsina, as quais apresentaram aumento, tipicamente esperado para estas.

A concentração sérica média de proteína total nos soros de bovinos testados neste experimento mostrou-se aumentada no grupo NIF quando comparada ao grupo NI. Em ratos *Wistar* (TEIXEIRA et al., 2008) e gatos (COSTA et al., 2010) infectados por *T. evansi*, também foram detectados aumento significativo, o mesmo ocorreu em bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* (SILVA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012). Em contrapartida, bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* apresentaram decréscimo de proteína total a partir do quarto DAI (SCHENK

et al., 2001), fato também observado inicialmente por Paiva (2000b), porém entre o 11º e 42º DAÍ a concentração sérica de proteína total se manteve dentro do intervalo de normalidade, e posteriormente detectou-se um aumento.

O aumento de proteína total se deve em parte pela produção de imunoglobulinas contra o *Trypanosoma* sp. Aumento de globulina também tem sido associado à infecção de bovinos por *T. vivax* (SCHENK et al., 2001) e em coatis (*Nasua nasua*) (HERRERA et al., 2002) e jumentos (CADIOLI et al., 2006) por *T. evansi*. No presente estudo foi detectado aumento significativo de IgA e IgG. Em contrapartida Ratos e bovinos infectados experimentalmente por *T. evansi* apresentam inicialmente uma redução de IgA e de IgG, porém na fase crônica há aumento de IgG (TEIXEIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2012). O aumento de imunoglobulinas já é esperado em consequência da resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito (CADIOLI et al., 2006).

IL-6 age como cofator da IL-1 na síntese de IgM e com a IL-5 na síntese de IgA (TIZARD, 2002). Em ratos infectados por *T. evansi* observa-se aumento em IL-1, IL-6 e TNF- α (PAIM, 2011). Deste modo, o aumento da IgA observada no grupo NIF poderia ocorrer pela ação da IL-6 em conjunto com a IL-5. No entanto, mais estudos correlacionando as interleucinas e as proteínas de fase aguda na infecção por *T. vivax* serão necessários para entender a resposta imunológica suscitada pela presença deste hemoparasito.

A ceruloplasmina sofreu marcada redução no grupo NIF, corroborando com os achados de Almeida et al. (2012) em ovinos experimentalmente infectados por *T. vivax* e Teixeira et al. (2008) em ratos *Wistar* infectados por *T. evansi*. Entretanto, Teixeira et al. (2012) encontraram marcado aumento desta PFA em bovinos infectados por *T. evansi* na fase crônica da infecção, quando não mais detectaram-se parasitas circulantes, o que pode indicar que o perfil eletroforético de bovinos frente a diferentes espécies de tripanossomas mostram-se distintos e podem estar relacionados à parasitemia.

A proteína ceruloplasmina é carreadora de cobre, cuja função é oxidar íons ferrosos, que são tóxicos, em uma forma não tóxica, a forma férrica, além de atuar como antioxidante e anti-inflamatório (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Em infecções por *T. vivax*, anemia é um achado comum (SALGADO et al., 2011;

CADIOLI et al., 2012) e pode ser resultante da eritrofagocitose (ANOSA et al., 1992) e/ou hemólise intravascular imunomediada (ANDRIANARIVO et al., 1995), Soma-se a isto o aumento de IgA e IgG observados neste estudo, fato que pode indicar resposta imunológica inespecífica e pode estar relacionado à ativação do complemento pela via alternativa resultando em hemólise (RURANGIRWA et al., 1980; OUMA et al., 1997). Desta forma, o consumo de ceruloplasmina pode ocorrer como forma de prevenção das ações deletérias dos íons ferrosos durante episódios de hemólise na infecção pelo *T. vivax*.

O isolado de *T. vivax* utilizado na infecção pode determinar a severidade da anemia e a resposta das PFAs, Paiva et al. (2000b) não observaram alterações do eritrograma em bovinos infectados por *T. vivax* com isolado oriundo do Mato Grosso do Sul, mas Almeida et al. (2008; 2012) utilizando o isolado da Paraíba verificaram redução do número de hemácias, volume globular e da concentração de hemoglobina e, concomitante redução da ceruloplasmina, o que reforça a hipótese de que esta PFA possa estar sendo utilizada para oxidar os íons ferrosos em íons férricos e como consequência, tendo sua concentração sérica diminuída.

Proteínas de 95 e 88 KDa apresentaram redução e aumento, respectivamente, no grupo NIF em comparação com o grupo NI. Estas proteínas não foram identificadas nominalmente no presente estudo e tampouco são mencionadas em experimentos anteriores com bovinos e em outras espécies infectadas por *T. vivax*. Entretanto, deve-se buscar sua identificação para revelar seu papel na fisiopatologia desta enfermidade ou ainda seu papel como marcador diagnóstico nas infecções por tripanossomas.

A concentração sérica média de transferrina foi expressivamente menor no grupo NIF em comparação ao grupo NI. Em contrapartida, ovinos infectados por *T. vivax* e bovinos e caprinos infectados por *T. evansi* apresentam aumento desta proteína, sendo que, nos ovinos, este aumento ocorreu na fase crônica (PATELLI et al., 2008; ALMEIDA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012). Esta PFA sequestra íons de ferro na forma férrica para prevenir a sua utilização por patógenos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Sua marcada redução pode ser devido ao fato da infecção por este isolado de *T. vivax* causar uma anemia mais grave, do que aquele utilizado em

infecção experimental, por Almeida et al. (2012) similarmente ao observado com ceruloplasmina.

A concentração sérica média de albumina também apresentou aumento altamente significativo frente à infecção por *T. vivax* em bovinos, dados contrários aos obtidos por Schenk et al. (2001) em bovinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, e em jumentos (CADIOLI et al., 2006), ratos *Wistar* (TEIXEIRA et al., 2008) e gatos (COSTA et al., 2010) infectados experimentalmente por *T. evansi*. O aumento de albumina foi concomitante com o aumento de globulinas, diferindo dos demais perfis encontrados em mamíferos infectados por *T. vivax* e *T. evansi*. Porém Teixeira et al. (2012) estudando bovinos infectados por *T. evansi* observaram uma oscilação de sua concentração com aumento na fase crônica, não sendo naquela ocasião uma proteína marcadora de infecção. O aumento de albumina pode ocorrer frente a dietas ricas em proteínas e também é observada quando há quadros de desidratação (ECKERSALL, 2008).

Antitripsina foi detectada apenas em bovinos do grupo NIF. Dados de Almeida et al. (2012) evidenciaram aumento desta proteína principalmente na fase crônica de infecção experimental de ovinos por *T. vivax*. Teixeira et al. (2012) não identificaram antitripsina em bovinos infectados experimentalmente por *T. evansi* e Patelli et al. (2008) não observaram diferença significativa em caprinos infectados de modo experimental por *T. evansi* quando compararam o grupo controle com o infectado.

Antitripsina é uma proteína serina inibidora de protease de amplo espectro, a qual protege os tecidos de danos provocados pelas esterases oriundas dos neutrófilos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004) Como observado no presente estudo, a antitripsina só foi detectada em bovinos do grupo NIF. Por outro lado, tendo em vista que não foi possível sua identificação em todos animais infectados, sugere-se que o aparecimento desta PFA ocorra em momentos onde os danos tissulares são mais críticos, principalmente quando *T. vivax* saem da corrente sanguínea e invade o espaço intercelular, como por exemplo, no subepicárdico (ALMEIDA et al., 2010).

Protozoários do gênero *Trypanosoma* sp. podem liberar proteases tais como a cruzipáina, catepsina L e catepsina B, as quais podem estar relacionadas aos danos teciduais desencadeados por estes parasitas (NIKOLSKAIA et al., 2006; ABDULLA

et al., 2008). As catepsinas B e L relacionam-se à penetração do *Trypanosoma brucei* pela barreira hemato-encefálica em modelos humano (NIKOLSKAIA et al., 2006) e murino (ABDULLA et al., 2008). Durante o surto de tripanossomíase alguns animais manifestaram sinais neurológicos, os quais podem estar relacionados com a presença de *T. vivax* no encéfalo. Os quais podem utilizar-se da ação das proteinases para conseguir atingir o sistema nervoso central, e, a fim de bloquear esta tentativa, o hospedeiro pode utilizar a antitripsina para inibir as proteases de origem dos parasitos, impedindo assim os danos teciduais causados pelo *T. vivax*.

Haptoglobina mostrou-se mais elevada no grupo NIF, corroborando com os achados de Teixeira et al. (2012), que detectaram aumento desta proteína em bovinos, na fase crônica, e ovinos infectados experimentalmente por *T. evansi* (PASSOS et al., 2011). Por outro lado, Teixeira et al. (2008) encontraram redução significativa da haptoglobina na fase inicial e intermediária da infecção por *T. evansi* em ratos *Wistar*. Estes resultados indicam que em cada espécie de hospedeiro verifica-se um comportamento diferenciado da haptoglobina, podendo utilizá-la como marcador.

Haptoglobina se liga a hemoglobina livre, que é tóxica e com atividade pró-inflamatória, no intuito de reduzir danos oxidativos relacionados à hemólise (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Esta PFA pode atuar como anti-inflamatório, pois o complexo haptoglobina-hemoglobina se liga nos receptores CD163 de macrófagos e monócitos levando a maior liberação de heme-oxidase I e IL-10. Além disso a haptoglobina inibe a atividade de neutrófilos coibindo a formação de lipoxigenase e cicloxigenase e o consequente “burst” celular de neutrófilos e a liberação de citocinas pela via Th 2, além de possuir função de chaperona (CECILIANI et al., 2012).

A resposta Th 2 é baseada em produção de anticorpos e citocinas, tais como IL-1, auxiliam a produção de imunoglobulinas pelas células B (TIZARD, 2002). Provavelmente em função de modulação na produção de anticorpos, a haptoglobina inibe a produção das citocinas pelas células Th 2, visando regular a produção excessiva de imunoglobulinas, que neste caso podem formar imunocomplexos e causar lesões teciduais no hospedeiro (MORAES, 2001; ALMEIDA et al., 2010; BATISTA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010). A ação de chaperona pode vir a

auxiliar na conformação correta de proteínas, sabidamente produzidas em maior quantidade durante a fase aguda e na presença de febre. Frente a tantas funções relacionadas à Haptoglobina, podemos sugerir que seu aumento observado no presente estudo com *T. vivax* e por Passos et al. (2011) e Teixeira et al. (2012) com *T. evansi* ocorre para modular a resposta imune, com a finalidade de minimizar os danos teciduais causados pela infecção de *Trypanosoma* spp.

O estímulo à liberação da IL-10 pela Haptoglobina inibe a síntese de citocinas Th 1 (IFN- γ , TNF- β , IL-1), a ação de células NK e, nos macrófagos ativadas, inibe a produção de IL-1, IL-6, TNF- α e espécies reativas de oxigênio reduzindo-se assim o dano tecidual (TIZARD, 2002). Ainda, a IL-10 inibe a produção de IL-12 e da expressão de co-estimuladores e moléculas MHC classe II. A IL-12 por sua vez atua na diferenciação de células T em Th 1 (ABBAS; LICHTMAN, 2005), as quais apresentam resposta mais efetiva contra protozoários do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* (MOSMANN; SAD, 1996).

A liberação de IL-4, uma interleucina do padrão de resposta Th 2 e também inibida pela Haptoglobina, está relacionada com a tripanotolerância em bovino N'Dama infectados por *Trypanosoma congolense*, os quais apresentam altos níveis de IL-4 e baixos de IL-6 (MERTENS et al., 1999; TIZARD, 2002). A IL-4 potencializa células T citotóxicas e faz com que as células T auxiliares cresçam na ausência de IL-2, aumenta a expressão de moléculas MHC II e ainda reduz a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α (TIZARD, 2002). Em suma, a Haptoglobina reduz lesões teciduais em consequência da infecção, por meio de modulação do sistema imunológico. O *Trypanosoma* sp., por sua vez, pode utilizá-la e/ou modular sua resposta, a fim de aumentar a concentração desta PFA, para que não ocorra o direcionamento da resposta para Th 1 e produção da IL-4.

A glicoproteína ácida não apresentou diferença significativa entre o grupo NIF e NI. Bovinos (TEIXEIRA et al., 2012) e ovinos (PASSOS et al., 2011) infectados experimentalmente com *T. evansi* apresentaram aumento significativo da glicoproteína ácida no grupo infectado ao comparar como o controle. Por outro lado em ratos *Wistar* infectados experimentalmente com *T. evansi* os teores séricos de glicoproteína ácida mostraram-se reduzidos (TEIXEIRA et al., 2008).

A glicoproteína ácida é considerada uma importante PFA em ruminantes (CECILIANI et al., 2012). Ela é produzida e armazenada em grânulos de neutrófilos em bovinos, os quais podem liberar esta proteína se sofrerem estímulo inflamatório (RAHMAN et al., 2008). As duas maiores funções fisiológicas da glicoproteína ácida tratam-se de ligação e carreamento de drogas e a imunomodulação (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Esta proteína pode aumentar a produção de IL-8 pelos neutrófilos e, concomitantemente, reduzir a quimiotaxia e a produção de espécies reativas de oxigênio. Nos mononucleares, a glicoproteína ácida estimula produção de citocinas anti-inflamatórias e TNF- α , além de atuar como chaperona (CECILIANI et al., 2012). A glicoproteína ácida em bovinos reduz a apoptose de monócitos, célula que pode eliminar o estímulo inicial através de fagocitose direta do antígeno (CECILIANI et al., 2007).

A citocina TNF- α quando presente em altas concentrações, esta relacionada com a caquexia, tipicamente observada em infecções crônicas por *T. vivax* (VINCENDEAU; BOUTEILLE, 2006). Entretanto, Naessens et al. (2004) relacionaram a deficiência desta citocina com a susceptibilidade de ratos à infecção por *T. congolense*. Deste modo é favorável para o hospedeiro, a produção de TNF- α , mesmo que esta desencadeie caquexia, devido sua atividade tripanolítica. Por outro lado, *T. vivax* pode vir a modular a resposta imune impedindo a produção de TNF- α por meio de inibição da produção da glicoproteína ácida.

As proteínas de 23 e 20,5 KDa apresentaram respectivamente, redução significativa e um aumento altamente significativo no grupo NIF. Estas proteínas não foram identificadas nominalmente no presente estudo e tampouco são mencionadas em experimentos anteriores com bovinos e em outras espécies animais. Entretanto deve-se buscar sua identificação para revelar seu papel na fisiopatologia desta enfermidade ou ainda seu papel como marcador diagnóstico.

A proteína soro amiloide A (SAA) não foi detectada neste experimento. Considerando o fato de que o peso molecular desta PFA varia entre 9-14 KDa e em consequência da técnica utilizada, possivelmente a SAA foi eliminada do gel no momento da corrida. Outras técnicas podem ser utilizadas para mensurá-la, como por exemplo, kit de ELISA utilizado por Orro et al. (2011), os quais constataram que

em bovinos infectados pelo vírus sincicial respiratório bovino a SAA foi um sensível marcador de infecção.

Proteínas ligantes de lipopolissacarídeos são consideradas importantes PFAs em bovinos. Estas proteínas possuem peso molecular de 60 KDa, e pode estar sobreposta a curva de IgG de cadeia pesada, não sendo possível distingui-las (KHEMLANI et al., 1994). O proteinograma bidimensional poderia identificar esta proteína e outras não identificadas, com mais precisão devido a separação por peso molecular e por ponto isoelétrico, evitando sobreposições de frações proteicas de peso moleculares semelhantes (CHIARADIA et al., 2012), o que pode ocorrer na técnica de SDS-Page descrita por Laemmli (1970). A identificação destas proteínas pode propiciar uma nova visão sobre a fisiopatogenia da doença causada pelo *T. vivax*.

7. CONCLUSÕES

- Concluiu-se que o ELISA foi capaz de detectar um maior número de amostras positivas para anticorpos IgG anti - *T. vivax* do que a RIFI, em soros bovinos de diferentes fases de infecção.
- O perfil eletroforético de bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* é diferente do perfil daqueles bovinos não infectados.
 - Verificou-se aumento nas concentrações séricas de Proteína total, IgA, proteína de 88 KDa, Albumina, Antitripsina, IgG, Haptoglobina, proteína de 20,5 KDa no grupo NIF.
 - Verificou-se diminuição nas concentrações séricas de Ceruloplasmina, proteína de 95 KDa, Transferrina, e proteína de 23 KDa no grupo NIF.
 - Por estar presente somente no grupo NIF, a Antitripsina pode ser utilizada como indicador da infecção em bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax*.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Citocinas. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 11, p. 251-282.
- ABDULLA, M. H.; O'BRIEN, T.; MACKEY, Z. B. SAJID, M.; GRAB, D. J.; MCKERROW, J. H. RNA Interference of *Trypanosoma brucei* cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. e298, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000298>>.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.
- ALMEIDA, K. S.; COSTA, A. F.; SILVA, P. C.; FAGLIARI, J. J.; MACHADO, R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Acute phase proteins: a potential approach for diagnosing chronic infection by *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 97-100, 2012.
- ANDRIANARIVO, A. G.; MUYRA, P.; OPOLLO, M. M.; LOGAN-HENFREY, L. L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of primary infection on bone marrow progenitor cells from N'dama and Boran cattle. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 80, n. 3, p 407-418, 1995.
- ANOSA, V. O.; ISOUN, T. T. Haematological studies on *Trypanosoma vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 90, n. 1, p. 155-168, 1980.
- ANOSA, V. O.; LOGAN-HENFREY, L. L.; SHAW, M. K. A light and electron microscopic study of changes in blood and bone marrow in acute hemorrhagic *Trypanosoma vivax* Infection in calves. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 29, n. 1, p. 33-45, 1992.
- AQUINO L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C. MARQUES, L. C.; CASTRO, M. B. MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999.
- AQUINO, L. P. C. T; MACHADO, R. Z.; LEMOS, K. R.; MARQUES, L. C.; GARCIA, M. V.; BORGES, G. P. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentaly and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 112-118, 2010.
- BAPTISTA FILHO, L. C. F.; FERNANDES, A. C. C.; SILVA, T. I. B.; SOUZA, A. C. M.; SANDES, H. M. M.; ALVES, L. C.; MELO, L. E. H. Infecção por *Trypanossoma*

vivax em bovinos leiteiros criados no estado de Pernambuco: Relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 919-922, 2011. Suplemento 3.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 174-181, 2007.

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

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, Cambridge, v.15, n.v2, p.74-80. 1994.

BEZERRA, F. S. B.; GARCIA, H. A.; ALVES, H. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; SILVA, A. E.; TEIXEIRA, M. M. G.; BATISTA, J. S. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 575-582, 2008.

BOID, R.; LUCKINS, A. G.; RAE, P. F. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Tripanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p.33-345. 1980.

BRADLEY, J. E. Imunidade aos protozoários e vermes. In: ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, 2003. cap. 16, p. 259-276.

BURGER, D.; DAYER, J. M. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF- γ production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 966, p 464-473, 2002.

BÜSCHER, P.; NGOYI, D. M.; KABORE, J.; LEJON, V.; ROBAYS, J.; JAMONNEAU, V.; BEBRONNE, N.; VAN DER VEKEN, W.; BIÉLER, S. Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for Sleeping Sickness diagnosis and staging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. e471, 2009. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000471>>.

CADIOLI, F. A.; MARQUES, L. C.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C.; AQUINO, L. P. C. T.; BARNABÉ, P. A. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in donkeys: hematological, biochemical and histopathological changes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n. 5, p. 749-756, 2006.

CADIOLI, F. A.; BARNABÉ, P. A.; MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R., SAMPAIO, P. H.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; TEIXEIRA, M. M. G.; MARQUES, L. C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state,

Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 118-124, 2012.

CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; ZARAGOZA, C. Serum α -Globulin Fraction in Horses Is Related to Changes in the Acute Phase Proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FACURY FILHO, E. J.; PAES, P. R. O.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p.769-771, 2008.

CECILIANI, F.; POCACQUA, V.; MIRANDA-RIBERA, A.; BRONZO, V.; LECCHI, C.; SARTORELLI, P. Alpha(1)-acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 145–152, 2007.

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase protein in ruminants. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.

CHIARADIA, E.; AVELLINI, A.; TARTAGLIA, M.; GAITI, A.; JUST, I.; SCOPPETTA, F.; CZENTNAR, Z.; PICH, A. Proteomic evaluation of sheep serum proteins. **BMC Veterinary Research**, Les Ulis, v. 8, n. 1, 2012. Article 66.

CLAUSEN, P. H.; WIEMANN, A.; PATZELT, R.; KAKAIRE, D.; POETZSCH, C.; PEREGRINE, A.; MEHLITZ, D. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. In naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 849, p. 21-31, 1998.

CORTEZ, A.P.; RODRIGUES, A.C.; GARCIA, A.H.; NEVES, L.; BATISTA, J.S.; BENGALY, Z., PAIVA, F. TEIXEIRA, M.M.G. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and south America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 23, n. 1, p. 44-51, 2009.

COSTA, M. M.; SILVA, A. S.; WOLKMER, P.; ZANETTE, R. A.; FRANÇA, R. T.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. A. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 95, n. 3-4, p. 301-304, 2010.

CROSS, G. A. M. Antigenic variation in African Tripanosomes and malaria. In: MARR, J. J.; NILSEN, T. W.; KOMUNIECKY, R. W. **Molecular medical parasitology**, San Diego: Academic Press, 2003. p. 82-110.

CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a

dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 320-326, 2010.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal trypanosomiasis in South America. current status, partnership, and information technology. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 916, p. 199-212, 2000.

DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S. S.; TRAUBCSEKO, Y. M. Using PCR for unraveling thr cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 1-13, 2003.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. T.; HARVEY, S. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. London: Elsevier, 2008. cap. 5, p. 117-156.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase protein. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 12, n. 2-3, p.169-178, 1988.

ESIEVO, K. A. N.; SAROR, D. I. Leukocyte response in experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 93, n. 2, p. 165-169, 1983.

FEITOSA JÚNIOR, A. B.; GUERRA, R. M. S. N. C.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L. Registro e morfometria de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino no município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 1, supl. 1, p. 232, 2004.

FIENNES, R. N. T. W. Hematological studies in trypanosomiasis of cattle. **Veterinary Record**, London, v. 66, p. 423-434, 1954.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. In: BAKER, J. R.; MULLER, R. (Ed.). **Advances in Parasitology**. London: Academic Press Limited, 1989. v. 28, p. 229-317.

GARDINER, P. R.; ASSOKU, R. K. G.; WHITELAW, D. D.; MURRAY, M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 31, n. 3-4, p. 187-197, 1989.

GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH POKO, S. K.; REDMOND, M. J.; CORDEIRO, O. M.; SETHI, M. S.; HARLANO, R. J.; BABIUK, L. A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 51, n. 3-4, p.277-292, 1996.

GONZÁLES, L. F.; GARCÍA, J. A.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T. M.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; GONZATTI, M. I.; REYNA-BELLO, A. *Trypanossoma vivax*: A novel

method for purification from experimentally infected sheep blood. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 111, n. 2, p. 126-129, 2005.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, Famham Royal, v. 64, p.1009-1018, 1994.

GUERRA, R. M. S. N. C.; FEITOSA JÚNIOR, A. B.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. N.; SANTOS, A. C. G. Biometria de *Trypanosoma vivax* em bezerro do Estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 833-835, 2008.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, London, p. 265, n. 3, p. 621-636, 1990.

HERRERA, H. M.; ALESSI, A. C.; MARQUES, L. C.; SANTANA, A. E.; AQUINO, L. P. C. T.; MENEZES, R. F.; MORAES, M. A. V.; MACHADO, R. Z. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopatological changes. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, n. 3, p. 203-210, 2002.

HOARE, C. A. The Salivaria: Subgenus *Duttonella* Chalmers, 1918. In the: _____. **The trypanosomes of mammals. a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972, cap 11, p. 401-429.

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M.; GIBBS, H. A.; REID, S. W.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E.; ECKERSALL, P. O. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 144, n. 16, p. 437-442, 1999.

JOSHI, P. P.; SHEGOKAR, V. R.; POWAR, R. M.; HERDER, S.; KATTI, R.; SALKAR, H. R.; DANI, V. S.; BHARGAVA, A.; JANNIN, J.; TRUC, P. Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 73, n. 3, p. 491-495, 2005.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, London, v. 148, n. 4, p. 279-282, 1992.

KHEMLANI, L. S.; YANG, Z.; BOCHSLER, P. N. Identification and characterization of a bovine lipopolysaccharide-binding protein. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 56, n. 6, p. 784-791, 1994.

KNOWLES JUNIOR, D. P.; LI, H.; PASTORET, P. P. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. In: PEARSON, J. E. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: Office des International des Epizooties, 2008, p. 66-89.

KUBOKI, N.; INOUE, N.; SAKURAI, T.; DI CELLO, F.; GRAB, D. J. SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Loop-Mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5517-5524, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANEVSCHI-PIETERSMA A, OGUNREMI O, DESROCHERS, A. Parasitemia in a neonatal bison calf. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 33, n. 3, p.173-176, 2004.

LAOHASINNARONG, D.; THEKISOE, O. M. M.; MALELE, I.; NAMANGALA, B. ISHII, A.; GOTO, Y.; KAWAZU, S.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 6, p. 1735-1739, 2011.

LEJON, V.; REBESKI, D. E.; NDAO, M.; BAELMANS, R.; WINGER, E. M.; FAYE, D.; GEERTS, S.; BÜSCHER, P. Performance of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies against *T. congolense* and *T. vivax* in goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 87-95, 2003.

LINHARES, G. F. C.; DIAS FILHO, F. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodiesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p 1-71, 1972.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MAXIE, M. G.; LOSOS, G. J.; TABEL, H. Experimental bovine trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *T. congolense*). I. Sumptomatology and clinical pathology. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v. 30, n. 3, p. 274-282, 1979.

MERTENS, B.; TAYLOR, K.; MURIUKI, C.; ROCCHI, M. Cytokine mRNA profiles in trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with the protozoan parasite *Trypanosoma congolense*: Protective role for interleukin-4?. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 19, n. 1, p. 59-65, 1999.

MONZÓN, C. M.; VILLAVICENCIO, V. I. Serum proteins in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 36, n. 3-4, p. 395-301, 1990.

MORAES, M. A. V. *Trypanosoma vivax*: **Infecção experimental em bovinos (*Bos indicus*)**. 2001. 104 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2001.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NAESSENS, J.; KITANI, H.; MOMOTANI, E.; SEKIKAWA, K.; NTHALE, J. M.; IRAQI, F. Susceptibility of TNF-alpha-deficient mice to *Trypanosoma congolense* is not due to a defective antibody response. **Acta Tropica**, Basel, v. 92, n. 3, p.193-203, 2004.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic' altimals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties**, Paris, v. 9, n. 2, p. 357-367, 1990.

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J. D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B. J. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkeys-related injuries. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 50, n. 6, p. 658-665, 2000.

NDUNG'U, J. M.; ECKERSALL, P. D.; JENNINGS, F. W. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. **Acta Tropica**, Basel, v. 49, n. 2, p. 77-85, 1991.

NIKOLSKAIA, O. V.; LIMA, A. P. C. A.; KIM, Y. V.; LONSDALE-ECCLES, J. D.; FUKUMA, T.; SCHARFSTEIN, J.; GRAB, D. J. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 116, n. 10, p. 2739-2747, 2006.

OHWADA, K.; TAMURA, K. Usefulness of alpha 1 and acid glycoprotein (alpha 1-AG) values in screening pound dogs acquired from animal shelters for experimental use. **Journal of Experimental Animal Science**, Jena, v. 42, n. 4, p. 627-630, 1995.

OKECH, G.; WATSON, E. D.; LUCKINS, A. G.; MAKAWITI, D. W. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in boran cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 46, n. 5, p. 859-869, 1996.

OLIVEIRA, J. B.; HERNÁNDEZ-GAMBOA, J.; JIMÉNEZ-ALFARO, C.; ZELEDÓN, R.; BLANDÓN, M.; URBINA, A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 163, n. 1-2, p. 136-139, 2009.

ORRO, T.; POHJANVIRTA, T.; RIKULA, U.; HUOVILAINEN, A.; ALASUUTARI, S.; SIHVONEN, L.; PELKONEN, S.; SOVERI, T. Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease caused by bovine respiratory syncytial virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 23–29, 2011.

OUMA, J. O.; OLAHO-MUKANI, W.; WISHITEMI, B. E.; GUYA, S. O. Changes in classical pathway complement activity in dromedary camels experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 135-140, 1997.

PAIM, F. C. **Citocinas pró-inflamatórias em ratos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi***. 2011, 50 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

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

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; NAKASATO, L.; BRUM, K. B.; BERNARDO, K. C.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: II – Inoculação Experimental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 9, n. 2, p. 143-148, 2000b.

PASSOS, P. B.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; HELOU, J. B. Teores séricos de proteínas de fase aguda. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 933-937, 2011. Suplemento 3.

PATELLI, T. H. C.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 481-487, 2008.

PEREIRA, L. J.; ABREU, A. C. V. V. Ocorrência de tripanosomas em bovinos e ovinos na região amazônica. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 17-21, 1978.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. First report and molecular characterization of

Trypanosoma vivax in cattle from state of Pernambuco, Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 286-289, 2012.

PLATT, K. B.; ADAMS, L. G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South American cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 21, n. 1, p. 53-58, 1976.

POWAR, R. M.; SHEGOKAR, V. R.; JOSHI, P. P. DANI, V. S.; TANKHIWALE, N. S.; TRUC, P.; JANNIN, J.; BHARGAVA, A. A rare case of human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 24, n. 1, p. 72-74, 2006.

RAHMAN, M. M.; MIRANDA-RIBERA, A.; LECCHI, C.; BRONZO, V.; SARTORELLI, P.; FRANCIOSI, F.; CECILIANI, F. Alpha(1)-acid glycoprotein is contained in bovine neutrophil granules and released after activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 71–81, 2008.

RAZA, M. A.; REHMAN, Z. U.; CHAUDHRY, A. H.; GILANI, A. H.; NAWAZ, M. Serum protein change in horse infected with Surra. **Revue D'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 35, n. 2, p. 147-151, 1982.

RURANGIRWA, F. R.; TABEL, H.; LOSOS, G.; TIZARD, I. R. Hemolytic Complement and Serum C3 Levels in Zebu Cattle Infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and the Effect of Trypanocidal Treatment. **Infection and Immunity**, Washington, v. 27, n. 3, p. 832-836, 1980.

SALGADO, B. S.; BATTAGLIA, C. T.; STUCHI, R. S.; CADIOLI, F. A.; ROZZA, D. B. What is your diagnosis? Lymphadenopathy in a cow with severe anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 40, n.1, p. 103-104, 2011.

SCHENK, M. A. M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 157-163, 2001.

SCHULTZ, D. R., ARNOLD, P. I. Properties of four acute phase proteins: c- reactive proteins, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein and fibrinogen. **Seminars Arthritis and Rheumatism**, Amsterdam, v. 20, n. 30, p.119-123, 1990.

SEIDL, A. F.; DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the brazilian pantanal and bolivian lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 269-272, 1999.

SEKONI, V. O.; SAROR, D. I.; NJOKU, C. O.; KUMI-DIAKA, J.; PALUWA, G. I. Comparative haematological changes following *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections in Zebu bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 11-19, 1990.

SERRA-FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 30-31, 1981.

SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p.77-82, 1988.

SHAH, I.; ALI, U. S.; ANDANKAR, P.; JOSHI, R. R. Trypanosomiasis in an infant from India. **Journal Vector Borne Disease**, Dwarka, v. 48, n. 2, p. 122-123, 2011.

SHEGOKAR, V. R.; POWAR, R. M.; JOSHI, P. P.; BHARGAVA, A.; DANI, V. S.; KATTI, R.; ZARE, V. R.; KHANANDE, V. D.; JANNIN, J.; TRUC, P. Short report: Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: Preliminary serologic survey of the local population. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 75, n. 5, p. 869-870, 2006.

SILVA, R. A. M. S.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, S. **Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA, 2004. 26 p. (Documentos, 65).

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA D. P.; MESQUITA T. C.; RAMIREZ, L.; DAVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the northern sub region of Pantanal, Brazil. **Trypnews**, San Juan de los Morros, v. 2, p. 1-2, 1995.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 5, p. 561-562, 1996.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; PELLEGRIN, A. O. Abortions caused by *T. vivax* in bovines from the Pantanal of Poconé, MT, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, supl. 1, p. 123, 1997.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R. DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the brazilian pantanal and bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 87-93, 1999.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Trypanossoma evansi e Trypanossoma vivax**: Biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: EMBRAPA, 2002, 137 p.

SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S. T. A.; MONTEIRO, S. G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em

bovinos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2550-2554, 2009.

SINGH, S.V; PACHAURI, S. P. Acute phase proteins in bovine mastitis. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 72, n. 1, p. 20-22, 2002.

SKINNER, J. G.; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. **Veterinary Record**, London, v. 134, n. 2, p.33-36, 1994.

SOLTYS, M. A. WOO, P. T. K. African trypanosomes in livestock. In: KREIER, J. P. (Ed.) **Parasitic Protozoa**. London: Academic press, 1978. v. 2, p 241-267.

SOOD, N. K.; SINGLA, L. D.; SINGH, R. S.; UPPAL, S. K. Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. **Veterinárni Medicina**, Praha, v. 56, n. 2, p. 82–84, 2011.

STEVENS, J. R.; BRISSE, S. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. (Ed.). **The Trypanosomiasis**. Cambridge: CABI Publishing., 2004. cap. 1, p. 1-24.

TEIXEIRA, M. C. A. **Estudo clínico, hematológico, bioquímico sérico, parasitológico, imunológico e patológico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcosomastigophora: Trypanosomatidae)**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

TEIXEIRA, M. C. A.; MARQUES, L. C.; CADIOLI, F. A.; FAGLIARI, J. J.; MACHADO, R. Z.; SILVA, P. C. Proteinogramas séricos de ratos *Wistar* experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1447-1453, 2008.

TEIXEIRA, M. C. A.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; MACHADO, R. Z.; SILVA, P. C.; PORTUGAL, E. S.; SANTOS, C. E. P.; GIRARDI, A. M. Serum protein concentrations in cattle experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 153-160, 2012.

TIZARD, I. R. Imunidade aos parasitas. In: _____. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. cap. 24, p. 312-329.

TRUMEL, C.; SCHELLCHER, F.; BRAUN, J. P. L'électrophorese des protéines sériques: principes d' interpretation chez le chien, le chat, et le cheval. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 147, p. 123-30, 1996.

UHLAR, C. M.; WHITEHEAD, A. S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 265, n. 2, p. 501-523, 1999.

UNSWORTH, K.; BIRKETT, J.D. The use of antrycide prosalt in protecting cattle against trypanosomiasis when in transit through tse-tse areas. **Veterinary Record**, London, v. 64, p.351-353, 1952.

VAN DEN BOSSCHE, P.; SHUMBA, W.; NJAGU, C.; SHERENI, W. The distribution of bovine Trypanosomosis in Zimbabwe and an evaluation of the value of an anti-trypanosomal antibody detection ELISA as a tool for monitoring the effectiveness of Tse-tse control operations. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 33, n. 5, p. 391-405, 2001.

VERMAM, B. B; GAUTAM, O. P. Electrophoretic analysis of serum proteins of calves experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 59, n. 12, p. 927- 937, 1982.

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

WINKLER, G. Quantitative investigations on immunoglobulins and specific antibodies during the course of an experimental infection with *T. evansi* in the pony. **Revue D'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 52, n. 12, p. 1076, 1982.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 27, n. 4, p. 384-386, 1970.