UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO SÉRICO, PARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PATOLÓGICO DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* STEEL, 1885 (SARCOMASTIGOPHORA: TRYPANOSOMATIDAE).

Márcia Cristina Alves Teixeira

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO SÉRICO, PARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PATOLÓGICO DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* STEEL, 1885 (SARCOMASTIGOPHORA: TRYPANOSOMATIDAE).

Márcia Cristina Alves Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2010

Teixeira, Márcia Cristina Alves
T266p Estudo clínico, hematológico, bioquímico sérico, parasitológico, imunológico e patológico de bovino experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) Márcia Cristina Alves Teixeira. Jaboticabal, 2010
xiii, 150 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Luiz Carlos Marques
Banca examinadora: Rosangela Zacarias Machado, Fabiano Antonio Cadioli, Percílio Brasil dos Passos, Thais Helena Constantino Patelli.
Bibliografia

1. Bovinos - tripanossoma 2. Tripanossomíase - bovina. 3.*Trypanosoma evansi* - bovino I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.636.2:591.161

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

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...

...No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim... "

Fernando Sabino

Trabalho realizado com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
PROCESSO N°. 2006/61384-7

Á Deus

Aos Meus pais;

Manoel Albino Alves Teixeira e Regina Helena Gonçalves Teixeira

Às Minhas irmãs;

Débora Regina Alves Teixeira e Adriana Helena Alves Teixeira

À Minha avó;

Maria de Lourdes Calisto Gonçalves

A estas queridas pessoas que compartilharam comigo passo a passo o vencimento de cada etapa, com compreensão, paciência e incentivo...

Dedico.

"Cada pessoa que passa na nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Marques**, pela oportunidade, confiança, compreensão, amizade, motivação e disposição a mim concedido durante todos estes anos e acima de tudo, por sua humildade e amor a profissão. O meu imenso carinho e profundo respeito.

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz”.

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado pelo respeito, competência, simplicidade e dedicação que a faz uma profissional e um ser humano exemplar.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela cooperação científica e orientação.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi, que gentilmente concedeu-me seus ensinamentos nas necropsias e exames histopatológicos.

Ao Dr. Paulo César Silva, pela amizade, valiosa ajuda no desenvolvimento da técnica de eletroforese, pelo auxílio no desenvolvimento das análises estatísticas e pela disposição em todos os momentos em que requisitamos.

Aos colegas de pós-doutorado e pós-graduação, Daniela Gomes da Silva, Carla Freschi, Alexandre Munhoz, Marcos Rogério André, Marcia Marisa Jusi, Trícia Maria, Bruna Alexandrino e Denise Lachat, pelo convívio gratificante e cooperação científica.

À Shizuko Ota, pela dedicação e boa vontade sempre presentes no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e pela amizade que desenvolvemos.

Aos colegas Katyane de Sousa Almeida, Fagner Luiz da Costa Freitas, Fernanda de Campos Silva e Rafaela Beraldo, pelo companheirismo e amizade.

À Renata Lemos Nagib Jorge e Cláudia Aparecida da Silva Nogueira, pela dedicação e apoio técnico, além da amizade e agradável convivência.

"O que faz andar o barco não é a vela enfunada, mas o vento que não se vê".

(Platão)

Edson Giangrecco pela dedicação, responsabilidade e carinho com os bovinos desta pesquisa.

Aos membros da banca Thais Helena Constantino Patelli, Percílio Brasil dos Passos, Fabiano António Cadioli por aceitarem o convite e valiosas considerações.

À Maria Aparecida Lopes Rombola, pela correção ortográfica.

Às bibliotecárias, em especial Núbia Josefina Lopes Brichi pela correção das referencia bibliográficas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À FAPESP, pela ajuda financeira e custeio da pesquisa para o desenvolvimento desta dissertação.

À UNESP - Campus de Jaboticabal pela acolhida.

Aos demais professores, colegas do curso de pós-graduação e a todos os funcionários desta Instituição de Ensino que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero reconhecimento.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original".
(Albert Einstein)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MÁRCIA CRISTINA ALVES TEIXEIRA - nasceu na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, em 10 de abril de 1980. Graduou-se em Medicina Veterinária pela faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade de Marília em dezembro de 2003. Em julho de 2004, ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp –Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de mestre em janeiro de 2006. Em fevereiro de 2006 ingressou no mesmo curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível doutorado.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS iii
LISTA DE FIGURAS vi
RESUMO x
SUMMARY xii
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA 1
2. OBJETIVOS 14
3 MATERIAL E MÉTODOS 15
3.1 Grupos experimentais 15
3.2 Preparo do inoculo 15
3.3 Infecção experimental 16
3.4 Exames físicos 16
3.5 Exames hematimétricos e bioquímicos 17
3.6 Parasitemia e prova biológica 18
3.7 Exames do líquido cefalorraquidiano 19
3.8 Exames sorológicos 19
3.8.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) 20
3.8.1.1 Preparo do substrato antigênico 20
3.8.1.2 Conjugado 20
3.8.1.3 Reação 20
3.8.2 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste) 21
3.8.2.1 Preparo do substrato antigênico 21
3.8.2.3 Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado 22
3.8.2.3 Descrição da reação 22
3.8.2.4 Tratamento dos dados 23
3.9 Exames anatomopatológicos 23
3.10 Análise estatística dos dados 24

4. RESULTADOS 25
4.1 Infecção experimental 25
4.2 Parasitemia e prova biológica 25
4.3 Achados clínicos 25
4.4 Patologia clínica 33
4.4.1 Análise do líquido cefalorraquidiano 33
4.4.2 Hemograma 33
4.4.3. Análises bioquímicas 47
4.4.4 Proteinograma 54
4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) 65
4.6 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste) 67
4.6.1 Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado empregados nos soros bovinos 67
4.6.2 Comparação entre detecção da resposta imune humoral através da RIFI e do ELISA-teste 69
4.7 Achados anatomopatológicos 74
4.7.1 Lesões macroscópicas 74
4.7.2 Lesões microscópicas 74
5. DISCUSSÃO 77
6 CONCLUSÕES 89
7 REFERÊNCIAS 90

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA 1. Médias e significâncias do teste t da temperatura retal (Cº), frequência cardíaca (batimentos/minuto), frequência respiratória (movimentos/minuto) e movimentos ruminais (movimentos/5 minutos), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 27

TABELA 2. Médias e significâncias do teste t das contagens de hemácias ($x10^6$/µL), hemoglobina (g / dL), volume globular (%) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....34

TABELA 3. Médias e significâncias do teste t dos volumes corpuscular médio -VGM (fl), hemoglobina corpuscular média-HGM (µµg) e concentração de hemoglobina corpuscular media -CHGM (g / dL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 37

TABELA 4. Médias e significâncias do teste t das contagens de leucócitos ($x10^3$/µL, linfócitos (µL), basófios (µL) e eosinófilos (µL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....40

TABELA 5. Médias e significâncias do teste t das contagens de monócitos (µL), neutrófilos segmentados (µL) e neutrofilos bastonetes (µL), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 44

TABELA 6. Médias e significâncias do teste t dos níveis séricos de proteína total (g / dL), albumina (g / dL) e globulinas (g/dL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....48

TABELA 7. Médias e significâncias do teste t dos níveis séricos de glicose (g / dL) e índice ictérico (unidades), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....51

TABELA 8. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas, presentes no traçado

eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....55

TABELA 9. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 56

TABELA 10. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 57

TABELA 11. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 58

TABELA 12. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 59

TABELA 13. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).....60

TABELA 14. Recíproca dos títulos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em bovinos inoculados com *T. evansi* (01, 03, 06, 07, 08 –G1) e no grupo testemunho (02, 04, 05 – G2) 66

TABELA 15. Densidades óticas (DO) e respectivos níveis de ELISA (NE), obtidos em soro de bovinos inoculados com *T. evansi* e em soro dos bovinos do grupo testemunho. O ponto de corte foi de: DO ≥ 0,374 68

TABELA 16. Correlação entre os resultados sorológicos pela RIFI e pelo ELISA-teste na detecção de co-positividade e co-negatividade em 480 soros de bovinos inoculados com *T. evansi*.....70

TABELA 17. Densidades óticas (DO), níveis de ELISA (NE) e títulos de anticorpos anti- T. evansi pela RIFI, de soro de bovinos inoculados com *T. evansi*. O ponto de corte ≥ 0,374 para o ELISA-teste e títulos ≥ 1:80 foram considerados positivos para RIFI 72

LISTA DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1. Médias da temperatura retal (Cº), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 30

FIGURA 2. Médias da frequência cardíaca (movimentos/minuto), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 31

FIGURA 3. Médias da frequência respiratória (movimentos/minuto), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 31

FIGURA 4. Médias dos movimentos ruminais (mov./5min), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2) 32

FIGURA 5. Médias da contagem de hemácias ($x10^6$/µL), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e nos animais do grupo testemunho (G2) 35

FIGURA 6. Médias dos teores de hemoglobina (g / dL) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 36

FIGURA 7. Médias do volume globular (%) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 36

FIGURA 8. Médias do volume corpuscular médio (fl), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 38

FIGURA 9. Médias da hemoglobina corpuscular média (µµg), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 39

FIGURA 10. Médias da concentração de hemoglobina corpuscular media (g / dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 39

FIGURA 11. Médias da contagem de leucócitos ($x10^3$/µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 42

FIGURA 12. Médias da contagem de linfócitos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 42

FIGURA 13. Médias da contagem de basófilos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 43

FIGURA 14. Médias da contagem de eosinófilos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 43

FIGURA 15. Médias da contagem de monócitos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 45

FIGURA 16. Médias da contagem de neutrófilos segmentados (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 46

FIGURA 17. Médias da contagem de neutrófilos bastonetes (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 46

FIGURA 18. Médias dos teores séricos da proteína total (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animias do grupo testemunho (G2) 49

FIGURA 19. Médias dos teores séricos da albumina (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 50

FIGURA 20. Médias dos teores séricos de globulinas (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e nos do grupo testemunho (G2) 50

FIGURA 21. Médias dos teores plasmáticos de glicose (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 52

FIGURA 22. Médias dos valores do índice ictérico (unidades), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2) 53

FIGURA 23. Médias das variação das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina A (IgA) em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 61

FIGURA 24. Médias da variação das concentrações séricas (mg / dL), da ceruloplasmina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 61

FIGURA 25. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da transferrina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 62

FIGURA 26. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da albumina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 62

FIGURA 27. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 63

FIGURA 28. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da haptoglobina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 63

FIGURA 29. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da glicoproteína ácida em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2) 64

FIGURA 30. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina G (IgG) de cadeia leve em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).....64

FIGURA 31. A Figura 31 mostra a reatividade de um soro positivo frente ao *T. evansi* (HE 40x).....65

FIGURA 32. Niveis de Elisa obtidos no estudo da Resposta imune humoral (ELISA-teste) de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e comparado com os resultados do grupo testemunho (G2), durante 522 dias de observação. — Ponto de corte (NE = 2 ou DO ≥ 0,374).....69

FIGURA 33. Número e titulação de soros (n=480) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* pela RIFI.....71

FIGURA 34. Número de soros positivos distribuídos por Níveis de ELISA, de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi*.....71

FIGURA 35. Fotomicrografia de linfonodo de bovino experimentalmente inoculado com *T. evansi*. Notar hiperplasia linfóide, folículo delineado e grande número de células em mitose (Flechas) (HE, 40X). Animal 01 (525 DAI).....75

FIGURA 36. Fotomicrografia de nódulo hemolinfático de bovino experimentalmente inoculado com *T. evansi*. Notar folículo delineado e grande número de células em mitose (Flechas) (HE, 40X). Animal 03 (525 DAI).....76

ESTUDO CLÍNICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO SÉRICO, PARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PATOLÓGICO DE BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi* STEEL, 1885 (SARCOMASTIGOPHORA: TRYPANOSOMATIDAE).

RESUMO - *Trypanosoma evansi* é patogênico para a maioria dos animais, acometendo bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, suínos, cães, quatis, capivaras, camelos e outras espécies animais em áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre sendo, no Brasil, a doença endêmica no pantanal mato-grossense. O presente estudo teve como fito principal estudar a evolução clínica, as alterações hematológicas, bioquímicas sérica, imunológicas e anatomopatológicas de bovinos infectados experimentalmente com *T. evansi*. Para tal, foram utilizados oito bovinos, clinicamente sadios e sorologicamente negativos para *T. evansi.* Três foram mantidos como testemunhos e cinco inoculados com *T. evansi.* Exames físicos, parasitológicos, hematimétricos e bioquímicos séricos (proteínograma, índice ictérico e glicose) e do líquido cefalorraquidiano foram realizados. Nos exames físicos realizados nos bovinos até 525° DAI não foi notada nenhuma anormalidade clínica com relação à temperatura retal, batimentos cardíacos, frequência respiratória, movimentos ruminais, aspectos de membranas mucosas (nasal, conjuntival, oral, vaginal e/ou prepucial) e dos linfonodos externos (mandibulares, maxilares, parotídeos, cervicais superficiais, sublíacos e mamários). A presença de tripomastigotas foi demonstrada através da prova biológica nos bovinos 01, 06 e 08 no15° DAI, bovinos 06 e 07 no 30° DAI, bovinos 01 e 06 no 45° DAI, bovino 06 no 60° DAI, bovino 01 no 75° DAI. As contagens de hemácias, os teores de hemoglobina e os volumes globulares dos bovinos, experimentalmente infectados, variaram dentro dos limites de normalidade para a espécie bovina. O VGM, HGM e CHGM, apresentam alterações pontuais. No exame físico do líquido cefalorraquidiano não se notou alterações do aspecto e coloração, e ainda, a pesquisa do *T. evansi* realizada em esfregaços corados pelo May-Gruenwald e Giemsa, gota espessa e prova biológica não se verificou a presença do parasita. O proteinograma permitiu identificar 26 proteínas com pesos moleculares que variaram de 20 a 245 KD. Destas, oito foram identificadas,

nominalmente, sendo imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulinas G (IgG) de cadeia pesada e de cadeia leve, haptoglobina e glicoproteína ácida. A resposta imune humoral iniciou se a partir do 5° DAI no ELISA-teste e 14° DAI pela RIFI alcançando títulos máximos após a 3ª semana de evolução. Observou-se hiperplasia linfóide de linfonodo e hiperplasia de nódulo hemolinfático. Os resultados alcançados permite inferir que a cepa empregada é de baixa patogenicidade para bovinos, podendo esta espécie animal comportar-se como reservatório do hemoflagelado.

Palavras-chaves: bovino, tripanossomíases, *Trypanosoma evansi*.

CLINICAL, HEMATOLOGY, SERUM BIOCHEMISTRY, PARASITOLOGY, IMMUNOLOGY AND PATHOLOGY OF EXPERIMENTALLY INFECTED CATTLE WITH *TRYPANOSOMA EVANSI* STEEL, 1885 (SARCOMASTIGOPHORA: TRYPANOSOMATIDAE).

SUMMARY - *Trypanosoma evansi* are pathogenic to most of animals, affecting cattle, buffaloes, goats, sheep, pigs, dogs, coatis, capybaras, camels and other animals in tropical and subtropical areas of the globe, and, in Brazil, it causes an endemic disease in the Pantanal Mato Grosso. This study primarily aimed to study the clinical, hematological, biochemical, immunological and pathological alterations in cattle experimentally infected with *T. evansi*. For this purpose, we used eight animals, clinically healthy and serologically negative for *T. evansi*. Three animas were kept as evidence and five were inoculated with *T. evansi*. Physical, parasitological, hematological and serum biochemical (proteins, icteric index and glucose) and cerebrospinal fluid examination were performed. In the physical examination conducted in cattle up to 525th DAI were not observated any clinical abnormality in concerning rectal temperature, heart rate, respiratory rate, ruminal movements, aspects of the mucous membranes (nasal, conjunctival, oral, vaginal and / or specimen) and external nodes (mandibular, maxillary, parotid, superficial cervical, breast and sublíacos). The presence of trypomastigotes was demonstrated by bioassay in cattle 01, 06 and 08 no 15th DAI, cattle 06 and 07 at 30° DAI, cattle 01 and 06 on the 45 th DAI, cattle 06 in 60 th DAI, cattle 01 in 75 th DAI. Red blood cells counts, hemoglobin content and volume cell of experimentally infected cattle were within normal limits for the bovine species. The MCV, MHC and MCHC, showed specific changes. Physical examination of the cerebrospinal fluid did not show alterations in appearance and coloration. Morever, using the Giensa-stained blood smears, buffy coat technique (BCT) and mouse inoculation procedure were negative for *T. evansi* tripomastigote. Serum protein concentrations, identified 26 proteins with molecular weights ranging from 20 to 245 KD. Among these, eight were identified by name, and immunoglobulin A (IgA), ceruloplasmin, transferrin, albumin, immunoglobulin G (IgG) heavy chain and light chain, haptoglobin and acid glycoprotein. The humoral

immune response was initiated at the 5 th DAI by ELISA test and 14 th DAI by IFAT. The highest titles after 3 weeks of evolution. It was observed lymphoid hyperplasia in lymph node hyperplasia and hemolymphatic nodes. The results infer that the strain used shows of low pathogenicity for cattle. May act as a reservoi of this flagellate.

Keywords: cattle, trypanosomiasis, *Trypanosoma evansi*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

As tripanossomíases são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*, que pertencem ao filo Euglenozoa, da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina. A característica principal desses protozoários é a presença de cinetoplasto localizado na base do flagelo que contém o DNA mitocondrial (VICKERMAN, 1978). A subordem Trypanosomatina contém uma única família, Trypanosomatidae, que, por sua vez, contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*). Os tripanossomas patogênicos de importância na pecuária estão classificados na seção Salivaria, dos quais apenas *Trypanosoma vivax*, *T. equiperdum* e *T. evansi* ocorrem na América do Sul (SILVA et al., 2002).

T. evansi e *T. vivax* estão amplamente distribuídas na África, Ásia e América Latina, representando um risco potencial para 500 milhões de bovinos, 100 milhões de bubalinos e 12 milhões de camelos (PEREGRINE, 1994). Para DÁVILA & SILVA (2000) o risco potencial destes hemoparasitas na América do Sul é para 300 milhões de bovinos, 1,8 milhões de bubalinos e 16 milhões de eqüinos. Na África, as tripanossomíases animais afetam 38 países, estimando-se que cerca de 30% dos 147 milhões dos bovinos dos países afetados pela mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) estejam infectados (MURRAY & GRAY, 1984).

O primeiro relato, descrevendo e identificando *T. evansi* como agente causal patogênico das tripanossomíases em mamíferos, ocorreu no ano de 1881 por Grifft Evans, que isolou este protozoário em sangue de eqüinos e camelos da região de Punjab, na Índia. Em 1885, Jonh Henry Steel, fez similar observação durante um surto da doença em mulas que realizavam transporte em Burna. Entretanto, somente sete anos após, em 1888, Balbiani o classificou como pertencente ao gênero *Trypanosoma* (WOO, 1977).

Uma multiplicidade taxonômica de nomes tem sido determinada para *T. evansi,* assim, é denominado de *T. brucei evansi* ou *T. evansi brucei* (TOURATIER, 1990). Este

possui, ainda, outras 16 denominações (HOARE, 1956), porém três são frequentemente mencionadas na literatura americana: *T. equinum* (VOGES, 1901) *T. hippicum* (DARLING, 1910) e *T. venezuelense* (MENSIL, 1910). Também, conhecido em outros países como *T. annamense* (LAVERAN, 1911), *T. cameli* (PRICOLO & FERRARO, 1914), *T. marocanum* (SERGENT et al., 1915), *T. ninae kohlyakimov* (YAKIMOFF, 1921); *T. aegyptum* (NATTAN-LARRIER & NOYER, 1932). Após criteriosos estudos de cepas de diferentes origens, HOARE (1972) concluiu que todas as denominações dessas supostas espécies de tripanossomas são sinônimas de *T. evansi.* Tais diversidades, também atribuíram a esta doença um vasto número de vernáculos populares regionais como: “salef”, “tahaga”, “su-auru”, “mbori el debad”, “surra” “murrina”, “mal das cadeiras”, “derrangadeira”, “quebra bunda” e “peste boba” (LEVINE, 1973; WOO, 1977; STEPHEN, 1986). Na Índia, a enfermidade causada pelo *T. evansi*, acomete principalmente bovinos e bubalinos, e é denominada de “surra”, cujo significado é “apodrecido” (HOARE, 1972).

Na América do Sul, quatro espécies de tripanossomas têm importância social e econômica. A principal delas é *T. cruzi,* que causa a “doença de Chagas” em humanos (WELLS, 1984). Duas delas, *T. vivax* (ZIEMAMN, 1905) e *T. evansi* (STEEL, 1885), são responsáveis por significativos impactos econômicos em bovinos e eqüinos (MOREIRA & MACHADO, 1985; DÁVILA et al., 1999), enquanto, *T. equiperdum (*DOFLEIN, 1901) causa nos eqüídeos, doença crônica sexualmente transmitida, mas, no entanto, só tem sido esporadicamente referida na América do Sul a partir de 1975 na Bolívia (FAO/WHO/OIE, 1982).

Dentre as espécies patogênicas de tripanossomas, *T. evansi* é conhecido por ser amplamente distribuído entre os diferentes hospedeiros mamíferos e é o mais importante agente causador de doenças em toda área tropical e subtropical do mundo. A principal diferença entre os outros tripanossomas é a falta de maxicírculos, e a forma de transmissão (HOARE, 1972; LUN & DESSER, 1995; HERRERA et al., 2004). Este parasita é adaptado para transmissão mecânica através de dípteros hematófagos (BRUN et al., 1998).

Cerca de 50 espécies de tabanídeos são incriminadas na transmissão do *T. evansi* (KRINSKY, 1976). *Tabanus importunus* e *T. trilineatus* foram os vetores responsáveis pelo surto de "mal das cadeiras" ocorrido na ilha de Marajó, Pará - Brasil (BARRETO, 1949). No pantanal mato-grossense, *T. trilineatus* é apontado como o principal transmissor de *T. evansi* em função de sua alta incidência o ano todo (DÁVILA, et al., 1999; SILVA et al., 1995a).

T. evansi sobrevive no sangue contido na probóscide dos dípteros. Entretanto, a eficiência da transmissão depende do intervalo entre as sucções e da intensidade de mosca presente na região (HOARE, 1972).

Na América do Sul, *T. evansi*, também, é transmitido pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus.* O hemoflagelado penetra na corrente sangüínea do morcego hematófago e se multiplica, permanecendo infectado por até um mês. Desta forma o quiróptero atua como vetor e reservatório do parasita. Estes, também, são encontrados desde o México até o Sul da Argentina coincidindo com a distribuição do *T. evansi* no Continente Americano (HOARE, 1965; HOARE, 1972).

NGERANWA & KILALO (1994) relatam que a mosca *Stomoxys* sp pode transmitir o tripomastigota, mas em menor escala, sendo considerada de importância secundária, embora, SUMBA et al. (1998) demonstraram que *T. evansi* sobrevive no aparelho bucal desta espécie por 480 minutos. A transmissão oral do *T. evansi* pode ocorrer em carnívoros que se alimentam da carcaça de animais infectados (WIESENHUTTER, 1975; RAMIREZ et al., 1979). Experimentalmente foi demonstrada a infecção de cães pela ingestão de sangue e de tecidos infectados (RAINA et al., 1985; BAZOLLI et al., 1999). Ainda, LOSOS (1980) relata a transmissão transplacentária do *T. evansi*.

As doenças causadas pelo *T. evansi* durante anos ficou restrita ao território indiano, mas acredita-se que a disseminação da doença para outras regiões ocorreu mediante a exportação de animais infectados (HOARE, 1972). A melhor informação a respeito da introdução de *T. evansi* na América do Sul foi descrita na Colômbia (WELLS, 1984). Muitos dos cavalos importados pelos conquistadores espanhóis escaparam e regressaram ao estado selvagem, supõe-se que alguns desses eqüinos

poderiam ser portadores de *T. evansi*, haja vista que estes animais eram descendentes de cavalos introduzidos na Espanha, provenientes da Costa da África, região da Berbéria, área considerada enzoótica (PLATA, 1931).

No Brasil, o primeiro diagnóstico do hemoflagelo, foi em eqüinos da Ilha de Marajó entre 1827 e 1830 (LACERDA, 1885). No Pantanal mato-grossense o tripomastigota foi isolado em 1850, mas foi relatado somente em 1894 na sub-região de Nhecolândia (SILVA et al., 1995 b).

O Pantanal mato-grossense está situado no centro da América do Sul, possui clima tropical e área de 138.000 Km^2 e 1.100 propriedades de exploração pecuária, local em que vivem cerca de três milhões de bovinos, 49 mil eqüinos e uma biodiversidade única de animais selvagens (SEIDL et al., 1998). Com alta densidade de amimais por hectare, a região possui 20% de sua área destinada a criações extensiva de gado (SILVA et al., 1995a), que é considerada a mais importante atividade econômica da região, gerando divisas de US$ 60 milhões/ano (EMBRAPA, 1993). Estudos realizados por SEIDL et al. (1998) estimam que somente a ação do *T. evansi* no Pantanal gera gastos da ordem de US$ 2,4 milhões anuais, afetando 6.462 eqüinos em uma população de 49.000.

O período pré-patente, ou seja, o tempo entre a infecção natural ou experimental e o aparecimento da parasitemia têm duração de aproximadamente duas semanas (BOERO, 1974). VERMA & GAUTAM (1978) e SINGLA et al., (1996) em infecções experimentais com *T. evansi* em bovinos realizadas na Índia, relatam período pré patente de oito dias, enquanto JOHN et al. (1995) demonstraram em bovinos, período pré-patente de 14 dias. Na Indonésia PAYNE et al. (1992), inocularam *T. evansi* via intravenosa em bovinos com idade variando entre cinco e sete meses e constataram após dois dias da inoculação, a presença de tripanossoma em todos os bovinos inoculados e que os maiores picos parasitêmicos ocorreram no 7° dia após a inoculação coincidente com pico de hipertermia. KATHIRA & AVSATTHI (1985), inocularam bubalinos com *T. evansi*, via subcutânea, e detectaram parasitemia no 5° dia, com presença de hipertermia no 6° e 15° dias após as inoculações, enquanto que AUDU et al. (1999) em ovinos, utilizando a via intravenosa, observaram parasitemia

entre 3° e 6° dia após inoculação, coincidindo com a pirexia. Na literatura consultada os períodos pré-patente médios em infecções experimentais em eqüinos (MARQUES, 1996), cães (AQUINO, 1997), jumentos (CADIOLI, 2001), ratos (CADIOLI, 2005), ovinos (PASSOS, 2004) e caprinos (PATELLI et al., 2008), utilizando a mesma cepa de *T. evansi* foram 4; 11; 6; 2; 2 a 6 e 7 dias respectivamente. Entretanto, POCHINI (2000), trabalhando com a mesma cepa em bovinos não estabeleceu o período pré-patente da infecção, haja vista a baixa sensibilidade das técnicas empregadas até o 56° dias após inoculação.

O curso da doença causada por *T. evansi* pode ser, subagudo, agudo e crônico (SINGH & CHAUDHRI, 2002). A infecção é caracterizada pelo aparecimento de febre, anemia, seguidos por edema e caquexia (HOARE, 1972). A doença que invariavelmente conduz a morte, salvo casos excepcionais de recuperação espontânea, apresenta maior prevalência em eqüinos velhos (ATARHOUCH et al., 2003). BOERO (1974) relatou que poucos são os casos em que a enfermidade tem duração inferior a 10 dias ou superior a 120 dias, em média 30 a 60 dias. Em eqüinos experimentalmente infectados, o curso da enfermidade teve duração média de 77 dias e em jumentos de 140 dias (MARQUES, 1996; CADIOLI, 2001). Os bovinos acometidos pela surra apresentam hipertermia, hipertrofia de linfonodos, descargas nasais e oculares mucóide, conjuntivite, fraqueza, perda de peso, andar cambaleante, lacrimejamento, salivação, membranas conjuntivas congestas, abortamentos, orquites e diminuição da produção láctea (SINGH & GAUR, 1983; MURALEEDHARAN & SRINIVAS, 1985; ABDULLAH & BAGGOT, 1986; BIDYANTA et al., 1990; NGERANWA et al., 1991; OKECH et al., 1996). Embora o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) pelo *T. evansi* ainda necessite de maiores estudos, SINGH & MISRA (1988) demonstraram que bovinos e búfalos com tripanossomíase aguda ou subaguda apresentaram depressão ou excitação, apoio da cabeça contra obstáculos, prostração, andar em círculos, coma e morte.

O parasita multiplica-se nos linfonodos, na medula óssea e no sangue periférico (BOERO, 1974; MURALEEDHARAN & SRINIVAS, 1985). No sangue periférico, seu número é variável no decorrer da doença, podendo desaparecer da corrente sangüínea

em algumas fases evolutivas da enfermidade (MARQUES et al., 2000; CADIOLI, 2001). Durante a progressão da doença há picos de febre intermitente, que podem ou não estar relacionados com a parasitemia (MONZON et al., 1984; MARQUES et al., 2000; CADIOLI, 2001; CADIOLI, 2005). Durante a evolução do quadro mórbido, são evidenciados edemas dos membros, na região submandibular e na parte baixa do abdômen (MARQUES et al., 2000; CADIOLI, 2001; CADIOLI, 2005), além de palidez ou icterícia das membranas mucosas aparentes, hipertrofia de linfonodos, taquipnéia e taquicardia (BOERO, 1974; MONZON et al., 1984; ATARHOUCH et al., 2003; CADIOLI, 2005). Alguns animais podem apresentar transtornos oculares, como hemorragia nas câmaras anteriores dos olhos e ceratite. Em estágios mais avançados da doença, surgem problemas locomotores com paresia gradual dos membros pélvicos, que se traduz por dificuldade de locomoção, andar cambaleante com vacilação lateral das garupas, evoluindo para paraplegia (MONZON et al., 1984; MARQUES, 1996). O animal torna-se anêmico (CADIOLI, 2001; ATARHOUCH et al., 2003; MENEZES et al., 2004; CADIOLI, 2005). Para MURRAY & DEXTER (1988) a severidade da anemia correlaciona-se com a intensidade e duração da parasitemia.

A medida que a enfermidade evolui notam-se períodos de hipertermia e de remissões da temperatura corporal. Hipertermia é originada pelos produtos do metabolismo do parasita, que atuam sobre o sistema regulador neurocentral. Este mecanismo promove hipertermia nos primeiros dois dias após a infecção, variando a temperatura retal entre 40ºC e 40,6ºC, estando estritamente relacionada com altas parasitemias (BOERO, 1974; PAYNE et al., 1993; DAMAYANTI et al., 1994). SINGH & GAUR (1983) e MARQUES (1996) demonstraram, respectivamente, em bubalinos e eqüinos, que a hipertermia nem sempre coincide com os picos parasitêmicos, particularmente nos estágios crônicos da doença.

T. evansi causa em animais susceptíveis complexa série de alterações clínicas e patológicas, envolvendo vários sistemas, particularmente os hematopoético, linfático, muscular, respiratório, circulatório, urinário e nervoso. O curso da doença, salvo em casos excepcionais de recuperação espontânea, evolui para a emaciação total e morte (BOERO, 1974; MARQUES, 1996). De acordo com HOARE (1972) a evolução, os

aspectos clínicos, hematológicos e patológicos nas diferentes espécies animais, variam de acordo com a virulência da cepa, a suscetibilidade do hospedeiro e as condições epizoóticas. QUEIROZ et al. (2001) concluíram que a despeito da homogeneidade das cepas, há significativa diferença no padrão de virulência dos isolados de *T. evansi*.

Do ponto de vista clínico e patológico, a anemia é um consistente achado das infecções naturais por *T. evansi* (AQUINO, 2007). De acordo com LOSOS (1980), ovinos, caprinos, bubalinos e bovinos tem demonstrado similaridades de alterações clínicas e patológicas. Os tripanossomas causam alterações significativas no quadro hematológico do hospedeiro, causando a redução do volume globular, da contagem de hemácias e da taxa de hemoglobina (BOERO, 1974, SILVA et al., 1995b e POCHINI, 2000). Em bovinos e cães, a anemia é classificada morfologicamente como sendo do tipo microcítica hipocrômica (MOREIRA & MACHADO, 1985; SINGH & MISRA, 1988) Em caprinos, a anemia foi classificada como normocítica hipocrômica por NGERANWA et al. (1993) e macrocítica por SHARMA et al. (2000) e em ovinos e bubalinos do tipo macrocítica normocrômica (SINGH & JOSHI, 1991). HILALI et al. (2006) observaram em búfalos anemia do tipo macrocítica hipocrômica. Em eqüinos, MARQUES (1996) diagnosticou anemia do tipo normocítica normocrômica. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem ainda não completamente elucidada das anemias nas tripanossomíases, entre eles, supressão da atividade eritropoiética por depressão da medula óssea, hemodiluição, hemólise resultante de fatores imunológicos ou ação direta dos parasitas ou produtos por eles liberados (AQUINO, 2007). O grau de anemia parece estar diretamente relacionado aos índices de destruição das células vermelhas (TRAIL et al., 1992). Estudo experimental com bovinos infectados com *T. evansi*, demonstrou alterações hematimétricas apenas pontuais, durante as duas primeiras semanas de observação, concluindo que a cepa utilizada não foi capaz de provocar anemia (POCHINI, 2000). Em ovinos experimentalmente infectados com *T. evansi*, ONAH et al. (1996) verificaram anemia branda, evidenciada pela redução no hematócrito e na contagem de eritrócitos e AUDU et al. (1999) encontraram nesta mesma espécie animal, decréscimo tanto no volume globular quanto nos teores de hemoglobina.

AQUINO (2007) relata o aumento da contagem global de leucócitos nas infecções por *T. evansi* e a inexistência de um perfil definido para contagem diferencial, a qual pode variar durante o curso de uma infecção. Em bovinos infectados com *T. evansi*, POCHINI (2000) observou neutropenia com linfocitose relativa nas primeiras semanas após a inoculação e neutrofilia com linfocitopenia ao redor do 112º dia após a inoculação e VERMA & GAUTMAN (1978) verificaram leucocitose com neutrofilia e linfocitopenia relativa na fase inicial da infecção.

No curso da enfermidade algumas alterações bioquímicas dos componentes sanguíneos podem ocorrer. A hipoglicemia têm sido apontada como um importante achado clínico-laboratorial em animais infectados sendo a glicemia inversamente proporcional à contagem de tripanossomas no sangue (MARQUES, 1996). Em cão, MOREIRA & MACHADO (1985) constataram taxa de glicose reduzida, sendo o estado hipoglicêmico, também, reportado por SANDOVAL et al. (1994). Hipoglicemia têm sido observada em animais com infecção por *T. evansi*, podendo estar associada com a severidade da doença (MOREIRA & MACHADO, 1985; SINGH e JOSHI, 1991; JAIN, 1993).

As proteínas de fase aguda aumentam em resposta a produção de mediadores químicos liberados pelos macrófagos e leucócitos durante os processos inflamatórios e infecciosos (KENT, 1992). Assim, essas proteínas refletem a gravidade da reação inflamatória, podendo auxiliar no diagnóstico, prognóstico, bem como no entendimento de mecanismos patogênicos de doenças (GODSON et al., 1996). Proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (KANEKO et al., 1997). No primeiro grupo, enquadram-se, dentre outras, o fibrinogênio, a glicoproteína ácida e a haptoglobina (TAKIGUCHI et al., 1990; TRUMEL et al., 1996, PASSOS, 2004), as quais se elevam imediatamente após a instalação do processo inflamatório (GODSON et al., 1996), decrescendo rapidamente com a regressão da lesão (KENT, 1992). No segundo grupo destacam-se a albumina e a transferrina, cujas concentrações séricas tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (KANEKO et al., 1997). Nos animais, as proteínas de fase aguda de maior importância variam de uma espécie para outra. Segundo GONZÁLES et al. (2007) a haptoglobina e soro amiloide A são consideradas

as proteínas de fase aguda de maior importância em ruminantes, podendo aumentar em até 100 vezes sua concentração dependendo do estímulo. A glicoproteína ácida e o fibrinogênio são proteínas de fase aguda moderada, aumentado duas a três vezes em resposta a estímulos (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). PIÑEIRO et al. (2004) relatam aumento de até 12 vezes de uma proteína de fase aguda em bovinos conhecida como ITIH4, dependendo do agente bacteriano. A concentração de proteína C-reativa de acordo com ECKERSALL & CONNER (1993) não sofre alterações durante a resposta de fase aguda, entretanto LEE et al. (2003) detectaram aumento desta proteína em vacas com processos inflamatórios, estresse e redução da condição corporal

Fracionamento eletroforético é um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação de proteínas dos fluídos corporais (KANEKO, et al., 1997). GODSON et al., (1996) relatou que a técnica de eletroforese em “gel de acrilamida” contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, necessitando micro-quantidades de amostras. Alterações em diferentes frações protéicas do soro foram observadas em camelos (BOID et al., 1980), bezerros (VERMA & GAUTAM, 1979) e em eqüinos (BREM et al., 1984) infectados com *T. evansi*. Em um cão infectado com este hematozoário, SANDOVAL et al. (1994) encontraram variações nos teores séricos das proteínas totais e na albumina e oscilações nos teores séricos da transferrina, haptoglobina e albumina foram obtidos por PASSOS (2004) em ovinos experimentalmente infectados. Em ratos Wistar experimentalmente infectados com *T. evansi*, TEIXEIRA et al. (2008) identificaram nominalmente 12 proteínas de fase aguda, com variados graus de oscilações durante o período de observação e PATELLI et al. (2008) trabalhando com caprinos experimentalmente infectados com a mesma cepa identificou 21 proteínas com pesos moleculares que variaram entre 16 e 165 kD. Destas, 6 foram identificadas nominalmente, sendo a transferrina, a albumina, a antitripsina, a haptoglobina, a glicoproteína ácida e a IgG de cadeia leve.

As proteínas de fase aguda têm atividades que contribuem para a defesa do hospedeiro, podendo paralisar diretamente o agente inflamatório, ajudando a minimizar

o dano local, bem como participar da reparação e regeneração tecidual. Sua concentração no plasma é aumentada rapidamente e muitos constituintes da ativação da cascata do complemento o qual resulta em acúmulo local de neutrófilos, macrófagos e proteínas plasmáticas. Estas participam da exterminação do agente infeccioso, expulsão do agente e fragmentos celulares e reparação do tecido afetado (STELL & WHITEHEAD, 1994).

Na clínica, os métodos de detecção de proteínas de fase aguda têm auxiliado o diagnóstico de processos inflamatórios. Em humanos, a dosagem de proteína C-reativa e soro amiloide A, têm sido empregada como método auxiliar de diagnóstico nos casos de danos teciduais e inflamações e ainda, para determinar o prognóstico e a resposta ao tratamento. Estudos para identificação destas proteínas têm sido conduzidos em animais domésticos, entretanto, as variações entre indivíduos e espécies são notáveis (GRUYS et al., 1994; ECKERSALL, 1995; HORADAGODA et al., 1999). Estudos comparativos sugerem que as proteínas de fase aguda são mais sensíveis para detecção de inflamação do que a análise hematológica (HORADAGODA et al., 1999). SKINNER & ROBERTS (1994), em estudo com ovinos, demonstraram que a haptoglobina foi melhor indicador de infecção bacteriana do que os exames hematológicos. SOLTER et al. (1991) demonstraram que a ceruloplasmina e a haptoglobina foram mais sensíveis para detecção de doenças inflamatórias em cães. Mudanças em diferentes frações protéicas do soro foram encontradas em camelos (BOID et al., 1980), bezerros (VERMA & GAUTAN, 1979) e eqüinos (RAZA et al., 1981; BREM et al., 1984) infectados com *T. evansi*, cujo fator comum foi o aumento de frações de gama-globulina e diminuição dos níveis de albumina. MONZON & VILLAVICENCIO (1990) trabalhando com hamster infectados com *T. evansi* e comparando os resultados encontrados com eqüinos naturalmente e experimentalmente infectados, relataram em ambas as espécies decréscimo significativo das frações de albumina e aumento de gama-globulinas. SANDOVAL et al. (1994) relataram em cães infectados com *T. evansi* diminuição das proteínas totais e albumina. HEBERT & LUMSDEN (1976) relataram aumento dos níveis de proteínas C-reativas e haptoglobina em camundongos e SHAPIRO & BLACK (1992) em ratos,

afirmam que o *T. brucei* é um parasita invasor de tecidos e provoca extensivos danos nesta espécie.

Em bovinos infectados pelo *T. evansi*, SINGLA et al., (1996) encontraram hipertrofia de linfonodos e de testículos. Lesões no sistema nervosos central foram observadas por SINGH & MISRA (1988), que consistiam principalmente de infiltrados perivasculares em meninges, cérebro e medula espinhal. Segundo SINGH & MISRA (1988) ocorre significativo aumento do número de linfócitos quando há invasão do líquido cefalorraquidiano pelo *T. evansi*, acarretando aumento da reação inflamatória nas meninges e na medula espinhal.

Em búfalos DAMAYANTI et al. (1994) encontraram petéquias no coração e presença de hidropericardio, congestão hepática, baço com superfícies irregulares e necrose multifocal, degeneração tubular renal, e nefrite intersticial não supurativa, miosite intersticial, hiperplasia de medula óssea com aumento de células eritrocitárias e megacariócitos, cérebro com nódulos gliais e manguitos perivasculares com infiltrados linfocíticos, hemossiderose pulmonar, pneumonia intersticial caracterizada por infiltração mononuclear, congestão capilar e edema intersticial. PORCHINI (2000) em bovinos experimentalmente infectados com *T. evansi*, evidenciou linfonodos com intensa hiperplasia folicular, presença de figuras de mitose e diversas áreas hemorrágicas, fígado com congestão, esteatose e áreas com extenso processo inflamatório peri-portal e proliferação fibroblastica, presença de infiltrado de neutrófilos e eosinófilos nas mucosas do intestino delgado e de microabcessos em placas de Peyer. Ainda, no tronco encefálico visualizou discreto processo inflamatório perivascular e lesões com aspectos de nódulos gliais, e no córtex cerebral foram identificados manguitos perivasculares e glioses.

O diagnóstico do *T. evansi* depende da presença do parasita no sangue periférico, da sintomatologia clínica, da situação epidemiológica local e da presença de um hospedeiro (LOSOS, 1986). É sabido que a demonstração do parasito no sangue é a melhor forma de diagnosticar a tripanossomíase, mas a confiabilidade de técnicas parasitológicas frequentemente é questionada devido à insuficiência e flutuações cíclicas da parasitemia. (KASHIWAZAKI et al., 1998). A detecção direta do *T. evansi* é

usualmente realizada por meio de exame microscópico de amostras de sangue recém colhidas entre lâmina e lamínula, esfregaço sangüíneo ou ainda utilizando centrifugação onde os parasitas são concentrados para posterior visualização. Tais técnicas incluem pesquisa de parasita na papa leucocitária, técnica de microhematócrito (MHCT) e método de concentração de Strout (WOO, 1970). A prova biológica, também, é o método parasitológico indireto muito eficaz, que pode ser utilizado na detecção do *T. evansi* (MONZON & VILLAVICENCIO, 1990; POCHINI, 2000). Outros métodos que propiciêm evidência indireta da infecção por *T. evansi*, como as técnicas de detecção de anticorpos e de antígeno têm sido desenvolvidos e tem apresentado grande importância no diagnóstico das tripanossomíase (AQUINO, 2007). Várias técnicas para detecção de anticorpos têm sido estudadas para diagnóstico de *T evansi* nos diferentes hospedeiros, como a hemaglutinação (JAKTAR & SINGH, 1971; VERMA & GAUTMAN, 1978), aglutinação direta (MONZON et al., 1994), fixação de complemento (BAJYANA et al., 1987). No entanto, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ELISA-teste (Ac- ELISA) teem se mostrado mais sensíveis e de maior valor diagnóstico quando comparadas a todas as anteriores. A RIFI apresentou sensibilidade variando de 92,3% a 100% quando empregada em eqüinos (BAKOS & BUSTAMANTE, 1982; MONZON, 1987; MARQUES et al., 2001), enquanto no ELISA-teste a sensibilidade variou de 95% a 100% (PAYNE et al., 1991). Em cães experimentalmente infectados, ambos os testes apresentaram 100% de sensibilidade (AQUINO et al., 2002). Entretanto, com a introdução de técnicas moleculares de diagnóstico, vários ensaios baseados na detecção do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos e a técnica têm se mostrado mais sensível que os métodos parasitológicos convencionais no diagnóstico de várias espécies de tripanossomos em diferentes hospedeiros (WUYTS et al., 1995; MASAKE et al., 1997).

A surra em bovinos têm sido descrita como infecção subclínica, com sintomatologia inespecífica e de difícil diagnóstico. No Brasil, são praticamente desconhecidos dados sobre a incidência e prevalência do *T. evansi*, causando doença em animais domésticos e selvagens. Particularmente em bovinos, pouco se sabe a respeito da patogenicidade das cepas de *T. evansi* isoladas. Grande número de

bovinos são criados em regiões sabidamente endêmicas, entretanto, apenas FRANKE et al. (1994) relatam infecções assintomáticas em bovinos no Pantanal Mato-grossense.

A cepa de *T. evansi* isolada no Brasil (MOREIRA & MACHADO, 1985) mostrou-se ser altamente patogênica para eqüídeos (MARQUES, 1996; CADIOLI, 2001; LEMOS, 2003), cães (AQUINO, 1997) e ratos (TEIXEIRA, 2006), e moderadamente patogênica para quatís (HERRERA, 1998), bovinos (POCHINI, 2000), ovinos (PASSOS, 2004) e caprinos (PATELLI, 2006). Nos bovinos infectados com *T. evansi* estudados por POCHINI (2000) ficou evidente que os animais albergaram o tripomastigota por pelo menos seis meses, época em que as observações foram interrompidas. Pelo menos dois bovinos inoculados apresentaram nos exames histopatológicos, meningoencefalite e meningomielite não supurativa, embora não tenha sido possível verificar sintomatologia nervosa sob o ponto de vista clínico, provavelmente devido a interrupção das observações numa fase ainda precoce da evolução da enfermidade. Sabe-se que *T. evansi* penetra prematuramente no líquido cefalorraquidiano, mas não causa sintomatologia nervosa imediata (ROSENBUCH, 1925; KRANEVELD & DJAENOEDIN, 1949). O Brasil possui um rebanho bovino com cerca de 176 milhões de cabeças e grande biodiversidade, incluindo reservatórios e vetores das tripanossomiases.

2. OBJETIVOS

2.1 Reavaliar em bovinos a virulência de uma cepa criopreservada de *T. evansi* que foi isolada de um cão por MOREIRA & MACHADO (1985).

2.2 Verificar o tempo de evolução e as alterações clínicas de bovinos infectados experimentalmente com *T. evansi.*

2.3 Estudar as alterações celulares e parasitológicas do líquido cefalorraquidiano.

2.4 Estudar alterações hematológicas, bioquímicas e parasitológicas durante a evolução da doença.

2.5 Avaliar a resposta imunitária humoral, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imuno Enzimático (ELISA-teste), correlacionando os resultados com os sintomas clínicos, os achados laboratoriais e os anatomopatológicos.

2.6 Observar as lesões macroscópicas encontradas por ocasião das necropsias e as alterações histopatológicas de diversos órgãos e tecidos (linfonodos, fígado, baço, rins, pulmões, coração, cérebro, cerebelo, medula espinhal, tireóides e músculos esqueléticos).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais

Foram utilizados oito bovinos, fêmeas (n=7) e macho (n=1) com idade aproximada de 08 meses, com variados graus de mestiçagens, clinicamente sadios e sorologicamente negativos (RIFI) para à pesquisa de anticorpos anti-*T. evansi*. Os animais foram mantidos em baias devidamente teladas, junto ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinária – Câmpus de Jaboticabal - UNESP. Estes foram alimentados “ad libitum” com água, sal mineralizado, silagem de milho (*Zea mays*), feno de “Tifton” e ainda, suplementados com ração composta por milho (70%) e soja (30%), na proporção de 2 kg/animal/dia.

Antes do início do experimento, os animais foram vermifugados e submetidos a exames físicos e laboratoriais, cujos resultados foram confrontados com os da fase experimental. Destes oito animais, três foram mantidos como testemunhos (02, 04, 05) e os cinco restantes (01, 03, 06, 07, 08) foram inoculados com *T. evansi.*

Trabalho aprovado pela Comissão de ética e bem estar animal (CEBEA), protocolo n° 006882-06.

3.2 Preparo do inóculo

A cepa de *T. evansi* isolada de um cão naturalmente infectado junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV/UNESP (MOREIRA & MACHADO, 1985) encontra-se criopreservada em nitrogênio a -196º C. Após descongelamento em banho Maria a 37º C, a cepa foi inoculada em ratos Wistar, visando a replicação do agente, e obtenção de sangue parasitado, que serviu de inoculo para os bovinos. O sangue dos roedores parasitados, foram colhidos por punção cardíaca em recipientes contendo 20µL de heparina sódica/mL de sangue. Após a colheita, 1 µL de sangue foi diluído em

80 µL de ácido acético, e a contagem dos parasitas foi realizada em câmara de Neubauer. O sangue contendo os tripomastigotas de *T. evansi* foi diluído em igual quantidade de Alsever, e 10 mL de sangue/conservante foi inoculado nos bovinos. O sangue dos ratos infectados foi utilizado na preparação do substrato antigênico para a reação de inunofluorescência indireta (RIFI).

3.3 Infecção experimental

O inóculo foi padronizado, de maneira a se obter cerca de 2,2 x 10^7 tripomastigotas de *T. evansi* por mL de sangue.

Cinco bovinos do grupo G1 (01, 03, 06, 07 e 08) foram inoculados, via endovenosa, com 10 mL de sangue de rato parasitado de modo que cada animal recebeu cerca de 2,2 x 10^7 tripomastigotas.

3.4 Exames físicos

Os animais foram submetidos a exames físicos (temperatura retal, movimentos ruminais, frequência cardíaca e respiratória, aspecto das membranas mucosas nasais, conjuntivais, oral, vaginal e/ou prepucial e dos linfonodos mandibulares, maxilares, parotídeos, cervicais superficiais, subilíacos, mamários e outras observações clínicas quando necessárias) duas vezes ao dia, pela manhã e a tarde, durante 60 dias consecutivos e semanalmente até 165° DAI, após este período os exames foram realizados uma vez ao dia até 207° DAI, de quatorze em quatorze dias até 375° DAI e de 30 em 30 dias até 525° DAI.

3.5 Exames hematimétricos e bioquímicos

Foram realizados antes das inoculções, diariamente, até o 15° DAI, e posteriormente a intervalos semanais até 204° DAI, de 14 em 14 dias até 372° DAI e de 30 em 30 dias até 522° DAI, os hemogramas, os índices ictéricos, os níveis séricos de glicose e os proteinogramas. Para os hemogramas e determinações das parasitemias foram obtidos 5 mL de sangue venoso de cada animal, através da punção da veia jugular externa, com agulhas hipodérmicas 40 x 12 mm, segundo a técnica recomendada por et al. (1993). As amostras foram acondicionadas em tubos esterilizados, contendo ácido etilenodiaminotetrascético di-sódico (EDTA), na proporção de 1 mg/mL de sangue, conforme indicações de ROSENFELD (1955). Para as dosagens de glicose sangüínea, 2 mL de sangue, colhidos como descrito anteriormente, foram acondicionados, também, em tubos esterilizados contendo fluoreto de sódio na proporção de 3,5 mg/mL de sangue conforme indicação de FERREIRA NETO et al. (1981).

Para realização das demais provas bioquímicas e determinação da resposta imunitária humoral (RIFI e ELISA-teste), cerca de 20 mL de sangue venoso de cada animal, foram colhidos em tubos esterilizados, para obtenção do soro. O mesmo foi fracionado e parte envasado em alíquotas de 1mL e armazenado a -20ºC. Estas alíquotas foram empregadas no fracionamento de proteínas e no estudo da resposta imunitária humoral.

As contagens de hemácias e de leucócitos e a determinação dos teores de hemoglobina foram realizadas em contador automático (CC-510-Celm, Barueri, SP) de células acoplado a um hemoglobinômetro (HB-520-Celm, Barueri, SP).

As contagens diferenciais de leucócitos e as determinações das parasitemias foram realizadas em esfregaços sangüíneos corados pela técnica de May-Gruenwald e Giemsa. A contagem do número de parasitas foi realizada de acordo com a técnica preconizada por MARQUES (1996).

O volume globular foi determinado pelo método do microhematócrito e as provas bioquímicas (índice ictérico e concentração plasmática de glicose, proteína total,

albumina e globulinas) de acordo com as técnicas do bicromato de potássio, Folin-wu, Lowry e Verde de bromocresol, respectivamente (FERREIRA NETO et al.,1981; MATOS & MATOS, 1988).

Os índices hematimétricos volume globular médio (VGM) e a concentração de globular média (CHGM), foram calculados a partir dos resultados obtidos nas contagens de hemácias, nas dosagens de hemoglobina e nas determinações dos volumes globulares, de acordo com as fórmulas preconizadas por WINTROBE (1932).

Para a determinação da proteína total (biureto), albumina (verde de bromocresol) - métodos colorimétricos; a glicemia foi determinada por método cinético, utilizando kits (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG) e leitura em espectrofotômetro (Labtquest-Labtest, Lagoa Santa, MG) em comprimento de onda específico para cada constituinte.

O fracionamento das proteínas séricas foi realizado em gel de “acrilamida” contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970). Após o fracionamento o gel foi corado durante duas horas em solução de *comassie blue*, em seguida foi feito a descoloração em solução descolorante a base de metanol (250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 650 mL de água) até a total transparência do gel. Após a leitura (escaneamento) os géis foram conservados colocando-os em de ácido acético a 7%. As concentrações dessas frações foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu CS-9301, Tóquio, Japão) e como referência foi utilizada solução marcadora com pesos moleculares 205, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20 quilodáltons (KD), além de proteínas purificadas – haptoglobina, α1-antitripsina, transferrina e ceruloplasmina (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).

3.6 Parasitemia e prova biológica

A pesquisa de tripomastigotas no sangue periférico dos animais foi relizada diariamente até 15° DAI, em seguida semanalmente até 204° DAI e posteriormente de 14 em 14 dias até 372° DAI e de 30 em 30 dias até 522° DAI. Para a pesquisa direta,

empregou-se o exame da gota espessa e técnica de WOO (1970), método de Concentração de Strout e a contagem de parasitas em esfregaços sangüíneos corados pela técnica de May-Grunwald e Giemsa. A pesquisa indireta foi realizada através da prova biológica, inoculando-se, via intraperitoneal, em dois ratos, para cada amostra de sangue dos bovinos, 0,5 mL sangue diluído em igual volume de Alsever, no 15º, 30°, 45°, 60°, 75°, 90°, 120°, 150°, 180°, 210°, 240°, 270°, 300°, 330°, 360°, 390°, 420°, 450°, 480°, 510° e 520° DAI. Após a inoculação uma gota de sangue da ponta da cauda de cada roedor foi colhida de três em três dias totalizando 10 colheitas, ou seja, durante 30 dias. A pesquisa do *T. evansi* foi realizada através da gota espessa.

3.7 Exames do líquido cefalorraquidiano

Cerca de 3 mL de líquido cefaloraquidiano de cada bovino, foram colhidos imediatamente antes das inoculações, no 15° DAI e posteriormente de 30 em 30 dias até o final do período de observação. A técnica de colheita empregada foi a preconizada por ROSEMBERGER et al., (1993).

Realizou-se nestas amostras, exames físico, citológico, bioquímico (proteína total) de acordo com as técnicas descritas por FERREIRA NETTO et al. (1981). A pesquisa de *T. evansi* foi realizada pelas mesmas técnicas descritas no item 3.6.

3.8 Exames sorológicos

Amostras de sangue para obtenção de soros sangüíneos foram obtidos diariamente até o 15º DAI e posteriormente a intervalos semanais, de 14 em 14 dias e de 30 em 30 dias até o final do período de observação. Estas alíquotas de soros foram acondicionadas em “ependorf” e congeladas a –20ºC. A pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. evansi* foi relizada pela RIFI e ELISA – teste.

3.8.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

3.8.1.1 Preparo do substrato antigênico

Tripomastigotas foram separados do sangue dos roedores experimentalmente infectados com *T. evansi*, por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose, segundo técnica preconizada por LANGHAN & GODFREY (1970). Os tripomastigotas separados foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) de pH 7,4, e posteriormente, distribuídos em lâminas de microscopia, dentro de cavidades previamente delimitadas. As lâminas contendo o substrato antigênico foram secadas à temperatura ambiente, embrulhadas em papel higiênico extrafino, acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado, e congeladas a -20ºC até serem utilizadas.

3.8.1.2 Conjugado

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 – Catalogo - F7887- 2 mL)

3.8.1.3 Reação

Utilizou-se a técnica descrita por AQUINO et al. (1999) resumida a seguir: as lâminas preparadas para as provas de Imunofluorescência Indireta, conforme descrito no item 2.8.1.1, foram descongeladas à temperatura ambiente e em cada cavidade foram pipetadas diluições sucessivas de cada soro (1/40, 1/80 até 1/1280) a partir da mais diluída para a mais concentrada. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a

37°C por 35 minutos, a seguir, submetidas a três lavagens por imersão de cinco minutos cada em solução salina tamponada (PBS) de pH 7,2. Após secagem, as cavidades das lâminas foram recobertas com anticorpo de coelho anti-IgG bovino conjugado ao isotiocianato de fluoresceina diluído 1:32 em solução de PBS, contendo Azul de Evans 1 mg%. Após adição do conjugado, as laminas foram novamente incubadas a 37° C por 35 minutos e submetidas a tres lavagens por imersão de cinco minutos cada em PBS e a uma terceira lavagem de 30 segundos em água tridestilada. Após secagem, as lâminas foram recobertas com glicerina tamponada na proporção 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbomato 0,5 M pH 9,6, seguida da aplicação da lamínula e posteriormente observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus BX-FLA).

3.8.2 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste)

3.8.2.1 Preparo do substrato antigênico

Os tripomastigotas foram isolados conforme descrito no item 3.8.1.1. Após três lavagens com solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) de pH 7,4, os parasitas foram submetidos a cinco ciclos de congelamento a -70°C, seguidos de descongelamento a temperatura ambiente. A suspensão de parasitas lisada foi centrifugada a 10.000g durante 20 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C, e alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram congeladas a - 20°C até o uso. 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 e a concentrações de proteínas (µg/mL) calculada a partir de regressão linear de valores padrões.

3.8.2.2 Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado

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 µg/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 20 (PBS-Tween), acrescido de 5% de soro normal de coelho. O conjugado usado, constituiu de IgG de coelho anti IgG de bovino acoplado à fosfatase alcalina (Sigma - A0793- 1 mL), sendo diluído em PBS-Tween 20 acrescido de 5% de soro normal de coelho. Soros de referência positivo foram obtidos de animais experimentalmente infectados, colhidos aleatoriamente em várias datas e os soros de referência negativos foram obtido dos bovinos antes das inoculações.

3.8.2.3 Descrição da reação

A cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunclon Surface-polishop - Catalogo N° 167008), 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 5 µg/mL. As placas foram incubadas durante 12-14 horas à temperatura de geladeira em câmera úmida e após lavadas por três vezes consecutivas em PBS-Tween 20. As placas foram bloqueadas em tampão de carbonato-bicarbonato de sódio adicionado de 5% de leite em pó desnatado e colocadas em câmera úmida a 37°C por 90 minutos e, a seguir, lavadas conforme descrito anteriormente. Os soros testes e os referências positivo e negativo foram ensaiados em duplicatas e diluídos em PBS-Tween 20, adicionados de 5% de soro normal de coelho, seguindo-se nova incubação e lavagem, como na etapa anterior. A cada cavidade adicionou-se 100 µL de conjugado diluído (1:30.000) em PBS-Tween 20 acrescido de 5% de soro normal de coelho, seguindo-se nova

incubação e lavagem, após esta etapa, a cada depressão foi adicionado 100 µL do substrato de enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8), incubando-se a reação por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido este prazo 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 (Microplate Reader MRX, Dynex), 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.

3.8.2.4 Tratamento dos dados

Os valores da densidade ótica (D.O) média dos soros foram agrupados em nível de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9. O limite máximo do nível zero foi determinado pela média dos valores de densidade óptica de soros de animais não imunes ao *T. evansi*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite os intervalos entre os outros níveis de ELISA, foram definidos por acréscimo de 35% conforme preconizado por MACHADO et al. (1997).

O ponto de corte do teste de ELISA empregado correspondeu a 2,5 o valor médio das densidades óticas dos soros de animais não imunes.

3.9 Exames anatomopatológicos

Ao final do período de observação (525° DAI) a eutanásia foi realizada utilizando-se 0,1mg/kg de xilazina por via intramuscular e 10 mL de lidocaína a 2% por via subaracnóide. Os animais foram necropsiados e minuciosamente examinados, seguindo-se as técnicas usuais, com separação de órgãos em conjunto. Estudos histopatológicos foram realizados em fragmentos de tireóide, linfonodos, pulmões,

fígado, coração, baço, rins, intestino, músculo esquelético, medula espinhal, cérebro e cerebelo, conservados em formalina tamponada a 10%. A técnica histopatológica utilizada foi a preconizada por MICHALANY (1980).

3.10 Análise estatística dos dados

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas dentro de cada dia de observação, utilizando-se o teste t de Student para comparações múltiplas das médias ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

1. RESULTADOS

4.1 Infecção experimental

A cepa de *T. evansi* criopreservada demonstrou após descongelamento e avaliação pelo método da gota espessa, motilidade vigorosa dos tripomastigotas. Os cinco ratos Wistar inoculados, via intraperitoneal, com a cepa criopreservada de *T. evansi* apresentaram parasitemias a partir do 3º DAI.

A observação dos bovinos durante 60 minutos após as inoculações, nada revelou que pudesse ser decorrente do procedimento realizado.

4.2 Parasitemia e prova biológica

Durante todo período experimental, nos esfregaços corados pelo método May-Gruenwald, gota espessa e técnica de WOO (1970), não foi possível identificar *T. evansi*. Entretanto, o parasita foi reisolado através da prova biológica nos bovinos 01, 06 e 08 no 15° DAI, bovinos 06 e 07 no 30° DAI, bovinos 01 e 06 no 45° DAI, bovino 06 no 60° DAI, bovino 01 no 75° DAI. Não se verificou parasitemia no bovino 03 (inoculado com *T. evansi)* e 02, 04 e 05 (testemunhos) até o 520° DAI.

4.3 Achados clínicos

Nos exames clínicos realizados nos bovinos antes das inoculações nenhuma anormalidade clínica foi notada com relação a temperatura retal, batimentos cardíacos, frequência respiratória, movimentos ruminais, aspectos de membranas mucosas

(nasais, conjuntivais, oral, vaginal e/ou prepucial) e dos linfonodos externos (mandibulares, maxilares, parotídeos, cervicais superficiais, sublíacos e mamários).

Os bovinos 01 e 08 (G1) apresentaram aumentos de volume dos linfonodos sublíaco direito e cervicais, respectivamente, durante quase todo período experimental. Apenas o bovino 08 apresentou edema de pálpebras do 134° ao 136° DAI.

Na Tabela 1 e Figuras 1, 2, 3 e 4 encontram-se as média e níveis de significância relativos à temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos rumenais, respectivamente. Certifica-se que o grupo inoculado (G1) apresentou em média temperatura mais elevada no 29°, 30°, 33°, 35°, 36°, 42°, 44°, 54°, 67°, 74°, 81°, 109° e 200° DAI.

Com relação a frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais notaram-se apenas pequenas oscilações pontuais ao longo do período de observação, entretanto, sempre dentro dos limites de normalidade considerados para a espécie bovina.

Tabela 1. Médias e significâncias do teste t da temperatura retal (Cº), frequência cardíaca (batimentos/minuto), frequência respiratória (movimentos/minuto) e movimentos ruminais (movimentos/5 minutos), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI		Temperatura Médias			Frequência cardíaca Médias			Frequência respiratória Médias			Movimentos ruminais Médias		
		G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	M	39,00	38,80	0,56^{ns}	76,80	78,00	0,77^{ns}	27,40	25,70	0,64^{ns}	6,00	6,00	1,00^{ns}
	T	39,90	39,80	0,88^{ns}	90,80	90,70	0,98^{ns}	38,00	37,00	0,84^{ns}	6,20	5,30	0,05*
1	M	38,80	38,70	0,66^{ns}	55,60	62,70	0,41^{ns}	26,00	25,00	0,81^{ns}	4,80	5,00	0,81^{ns}
	T	39,90	39,70	0,57^{ns}	97,60	78,30	0,14^{ns}	38,70	37,20	0,77^{ns}	6,40	7,00	0,30^{ns}
2	M	38,80	38,40	0,16^{ns}	85,60	75,30	0,40^{ns}	27,20	24,30	0,44^{ns}	6,60	7,00	0,58^{ns}
	T	39,40	39,20	0,18^{ns}	94,40	93,30	0,93^{ns}	36,00	28,20	0,16^{ns}	6,20	7,00	0,16^{ns}
3	M	38,50	38,20	0,56^{ns}	81,20	81,30	0,99^{ns}	24,00	22,70	0,62^{ns}	6,60	7,00	0,27^{ns}
	T	39,40	39,40	0,93^{ns}	85,20	90,70	0,56^{ns}	37,30	32,00	0,22^{ns}	7,00	7,00	1,00^{ns}
4	M	38,50	38,20	0,33^{ns}	86,40	86,00	0,96^{ns}	32,80	31,30	0,41^{ns}	7,40	8,00	0,30^{ns}
	T	39,30	39,10	0,75^{ns}	79,20	80,70	0,65^{ns}	28,00	28,00	1,00^{ns}	7,00	7,00	1,00^{ns}
5	M	38,00	38,30	0,49^{ns}	74,40	74,70	0,96^{ns}	24,00	25,30	0,84^{ns}	7,00	7,00	1,00^{ns}
	T	39,10	40,00	0,25^{ns}	81,20	82,00	0,85^{ns}	34,70	28,00	0,24^{ns}	7,00	6,70	0,22^{ns}
6	M	38,20	38,60	0,50^{ns}	76,80	78,00	0,77^{ns}	24,00	26,70	0,48^{ns}	6,80	7,00	0,77^{ns}
	T	39,70	40,00	0,68^{ns}	83,20	81,30	0,63^{ns}	34,00	27,20	0,32^{ns}	6,60	6,70	0,88^{ns}
7	M	38,20	39,50	0,04^{ns}	74,40	84,70	0,26^{ns}	20,40	30,00	0,13^{ns}	6,20	7,00	0,27^{ns}
	T	39,10	40,00	0,09^{ns}	73,20	72,00	0,91^{ns}	24,00	24,40	0,95^{ns}	6,80	7,00	0,48^{ns}
8	M	37,90	38,30	0,18^{ns}	72,80	54,70	0,04^{ns}	23,20	20,00	0,16^{ns}	7,00	6,70	0,62^{ns}
	T	39,50	39,30	0,59^{ns}	76,80	78,00	0,88^{ns}	24,00	23,20	0,81^{ns}	6,60	6,70	0,88^{ns}
9	M	38,50	38,40	0,38^{ns}	69,20	68,00	0,88^{ns}	22,40	24,00	0,58^{ns}	7,40	7,00	0,48^{ns}
	T	39,60	38,90	0,08^{ns}	77,60	73,30	0,58^{ns}	30,70	24,80	0,08^{ns}	7,40	8,00	0,12^{ns}
10	M	38,50	38,20	0,50^{ns}	71,20	69,30	0,80^{ns}	26,40	22,70	0,31^{ns}	6,60	7,00	0,27^{ns}
	T	39,70	39,30	0,19^{ns}	73,60	80,00	0,29^{ns}	32,00	26,40	0,13^{ns}	7,40	8,00	0,41^{ns}
11	M	38,40	38,10	0,37^{ns}	77,20	76,00	0,86^{ns}	24,40	24,00	0,96^{ns}	6,80	6,70	0,72^{ns}
	T	39,40	39,30	0,60^{ns}	80,80	80,70	0,98^{ns}	39,30	24,00	0,01**	6,40	6,70	0,54^{ns}
12	M	38,20	38,10	0,80^{ns}	82,40	79,30	0,53^{ns}	20,00	28,00	0,08^{ns}	5,80	6,00	0,77^{ns}
	T	39,60	39,20	0,15^{ns}	90,80	85,30	0,21^{ns}	34,70	29,60	0,49^{ns}	6,00	6,70	0,42^{ns}
13	M	38,30	37,90	0,10^{ns}	89,60	79,30	0,12^{ns}	23,20	25,30	0,62^{ns}	6,60	6,30	0,54^{ns}
	T	39,70	39,00	0,08^{ns}	90,80	90,70	0,98^{ns}	26,70	24,40	0,76^{ns}	6,20	6,30	0,85^{ns}
14	M	38,20	37,60	0,04^{ns}	88,00	81,30	0,38^{ns}	20,80	21,30	0,89^{ns}	6,00	6,00	1,00^{ns}
	T	39,20	39,00	0,50^{ns}	92,80	89,30	0,49^{ns}	92,80	89,30	0,49^{ns}	5,60	6,70	0,25^{ns}
15	M	38,20	37,90	0,21^{ns}	91,60	84,00	0,27^{ns}	23,20	22,70	0,85^{ns}	5,80	6,70	0,33^{ns}
	T	39,40	39,20	0,68^{ns}	89,60	84,00	0,42^{ns}	25,33	32,00	0,24^{ns}	5,80	6,30	0,54^{ns}
16	M	38,50	38,20	0,23^{ns}	88,00	73,30	0,08^{ns}	20,80	24,00	0,34^{ns}	5,80	6,70	0,33^{ns}
	T	39,50	39,00	0,10^{ns}	90,40	92,00	0,79^{ns}	33,33	28,80	0,16^{ns}	6,00	6,30	0,62^{ns}
17	M	38,50	38,30	0,28^{ns}	90,00	76,70	0,10^{ns}	27,20	29,30	0,80^{ns}	6,00	6,30	0,62^{ns}
	T	39,20	39,00	0,49^{ns}	90,40	89,30	0,76^{ns}	38,67	34,40	0,65^{ns}	6,20	6,00	0,77^{ns}
18	M	38,40	38,10	0,36^{ns}	78,00	68,70	0,31^{ns}	24,00	19,00	0,49^{ns}	5,20	6,00	0,34^{ns}
	T	39,40	39,00	0,28^{ns}	91,20	84,00	0,36^{ns}	36,67	33,60	0,79^{ns}	6,00	6,70	0,34^{ns}
19	M	38,30	38,00	0,22^{ns}	95,20	84,00	0,21^{ns}	24,80	24,70	0,98^{ns}	6,20	5,70	0,47^{ns}
	T	39,10	38,80	0,27^{ns}	92,80	90,70	0,77^{ns}	40,00	36,80	0,68^{ns}	5,80	6,70	0,26^{ns}
20	M	38,80	38,80	0,95^{ns}	90,40	84,00	0,36^{ns}	21,60	26,70	0,18^{ns}	5,60	5,30	0,72^{ns}
	T	39,60	39,60	0,89^{ns}	98,80	94,70	0,64^{ns}	42,67	32,80	0,28^{ns}	5,80	6,30	0,47^{ns}
21	M	38,70	38,70	0,88^{ns}	88,00	78,70	0,25^{ns}	27,20	30,70	0,69^{ns}	6,00	5,70	0,22^{ns}
	T	39,50	39,40	0,76^{ns}	93,60	93,30	0,94^{ns}	38,67	36,40	0,78^{ns}	6,00	6,30	0,22^{ns}
22	M	38,60	38,30	0,61^{ns}	85,60	82,70	0,66^{ns}	28,00	21,30	0,34^{ns}	5,80	6,30	0,37^{ns}
	T	39,40	39,30	0,90^{ns}	86,40	94,70	0,03*	29,33	37,60	0,46^{ns}	6,20	5,70	0,37^{ns}

Continua...

Continuação

23	M	38,20	38,50	0,30 ns	80,00	81,30	0,76 ns	25,60	28,00	0,74 ns	6,00	6,00	1,00 ns
	T	39,20	39,20	0,97 ns	78,40	88,00	0,10 ns	36,00	31,20	0,62 ns	5,00	5,30	0,52 ns
24	M	38,40	38,40	0,76 ns	77,60	81,30	0,36 ns	22,40	22,70	0,97 ns	5,80	5,00	0,27 ns
	T	38,90	38,90	0,73 ns	87,20	89,70	0,58 ns	36,00	31,20	0,67 ns	5,60	5,30	0,54 ns
25	M	38,50	38,10	0,17 ns	73,60	78,70	0,35 ns	21,60	21,30	0,97 ns	5,80	6,00	0,81 ns
	T	39,10	38,90	0,30 ns	91,20	88,00	0,54 ns	34,67	30,40	0,65 ns	5,00	5,30	0,62 ns
26	M	38,50	38,30	0,47 ns	84,80	85,30	0,94 ns	28,00	28,00	1,00 ns	6,20	6,30	0,72 ns
	T	39,10	38,80	0,32 ns	88,00	89,30	0,84 ns	36,00	32,80	0,75 ns	6,20	6,00	0,48 ns
27	M	38,50	38,30	0,17 ns	72,80	78,70	0,44 ns	27,20	24,00	0,72 ns	5,80	5,30	0,24 ns
	T	39,30	38,90	0,15 ns	88,80	93,30	0,48 ns	32,00	35,20	0,75 ns	6,80	5,00	0,06 ns
28	M	38,50	38,40	0,48 ns	81,60	81,30	0,95 ns	24,80	25,30	0,91 ns	6,00	5,30	0,34 ns
	T	38,80	38,40	0,25 ns	77,60	76,00	0,63 ns	18,67	20,80	0,70 ns	5,60	5,00	0,30 ns
29	M	38,10	38,40	0,10 ns	86,40	85,30	0,88 ns	22,40	21,30	0,83 ns	5,80	5,70	0,82 ns
	T	39,00	38,70	0,05*	76,00	73,30	0,48 ns	26,67	20,00	0,17 ns	6,20	6,00	0,77 ns
30	M	38,00	38,00	0,92 ns	76,80	73,30	0,17 ns	20,00	17,30	0,58 ns	6,60	5,30	0,22 ns
	T	39,10	38,70	0,02*	88,00	89,30	0,84 ns	21,33	24,00	0,42 ns	5,80	5,70	0,88 ns
31	M	38,20	38,10	0,79 ns	72,80	74,70	0,81 ns	17,60	17,30	0,95 ns	6,20	5,00	0,05 ns
	T	38,90	38,60	0,20 ns	77,60	88,00	0,12 ns	21,33	20,80	0,90 ns	5,80	5,70	0,82 ns
32	M	38,00	38,00	0,96 ns	72,80	76,00	0,56 ns	16,80	17,30	0,85 ns	6,20	5,30	0,05 ns
	T	38,90	38,60	0,20 ns	84,00	92,00	0,29 ns	28,00	25,60	0,62 ns	5,60	5,70	0,93 ns
33	M	38,00	37,90	0,65 ns	78,40	77,30	0,85 ns	14,40	16,00	0,48 ns	5,40	5,30	0,91 ns
	T	39,40	38,80	0,05 *	96,00	92,00	0,55 ns	28,00	30,40	0,68 ns	5,80	5,00	0,27 ns
34	M	38,50	38,20	0,32 ns	80,40	90,70	0,14 ns	24,80	22,70	0,81 ns	5,60	4,70	0,06 ns
	T	39,30	39,20	0,07 ns	88,80	78,70	0,05 *	26,67	26,00	0,93 ns	5,80	6,00	0,70 ns
35	M	38,30	37,90	0,12 ns	73,60	80,00	0,27 ns	18,40	21,30	0,35 ns	5,80	6,00	0,77 ns
	T	39,00	38,60	0,05*	90,40	90,70	0,95 ns	23,33	28,40	0,61 ns	6,20	5,70	0,19 ns
36	M	38,20	38,10	0,58 ns	88,80	77,30	0,20 ns	20,00	17,30	0,60 ns	5,40	5,70	0,67 ns
	T	39,20	38,70	0,00**	84,80	76,00	0,20 ns	18,67	21,60	0,12 ns	5,80	5,00	0,02 ns
37	M	38,10	38,10	0,93 ns	76,60	77,00	0,90 ns	20,60	17,30	0,14 ns	5,60	4,70	0,06 ns
	T	38,40	38,40	0,86 ns	77,60	77,30	0,96 ns	16,00	20,80	0,17 ns	6,20	6,00	0,70 ns
38	M	38,10	38,20	0,59 ns	73,20	72,00	0,90 ns	16,80	16,00	0,70 ns	6,20	5,30	0,17 ns
	T	38,80	38,90	0,57 ns	82,40	84,00	0,81 ns	20,00	20,80	0,88 ns	6,00	5,30	0,22 ns
39	M	37,90	37,90	0,92 ns	76,80	72,00	0,50 ns	15,80	16,00	0,95 ns	5,40	5,30	0,91 ns
	T	38,80	38,50	0,14 ns	76,00	84,00	0,16 ns	18,67	18,40	0,94 ns	5,20	5,70	0,43 ns
40	M	38,10	38,20	0,70 ns	75,20	74,70	0,90 ns	15,20	17,30	0,37 ns	5,40	5,00	0,27 ns
	T	38,80	38,90	0,74 ns	83,20	84,00	0,92 ns	14,67	19,20	0,30 ns	5,60	6,00	0,58 ns
41	M	38,10	38,30	0,44 ns	80,80	78,00	0,13 ns	18,80	16,00	0,40 ns	5,20	5,70	0,24 ns
	T	39,00	38,80	0,67 ns	83,20	84,00	0,88 ns	18,67	20,00	0,74 ns	6,00	6,30	0,72 ns
42	M	38,30	38,20	0,93 ns	79,20	77,30	0,63 ns	16,80	16,00	0,70 ns	5,40	5,00	0,58 ns
	T	39,10	38,60	0,01 **	88,80	85,30	0,60 ns	18,67	23,20	0,48 ns	5,80	5,70	0,85 ns
43	M	38,30	38,20	0,93 ns	76,80	80,00	0,45 ns	17,60	16,00	0,58 ns	5,60	5,30	0,76 ns
	T	39,00	38,70	0,27 ns	86,40	82,70	0,16 ns	24,00	19,20	0,12 ns	5,60	5,70	0,93 ns
44	M	38,30	38,10	0,48 ns	85,60	78,70	0,03 *	20,80	18,70	0,54 ns	5,80	5,30	0,59 ns
	T	39,30	38,60	0,01 **	88,00	86,70	0,84 ns	28,00	21,60	0,40 ns	5,40	5,00	0,27 ns
45	M	38,60	38,20	0,20 ns	79,20	85,30	0,42 ns	18,40	18,70	0,95 ns	5,60	4,70	0,16 ns
	T	39,50	39,00	0,23 ns	84,80	84,00	0,81 ns	30,67	29,60	0,88 ns	6,00	5,00	0,22 ns
46	M	38,40	38,20	0,37 ns	83,20	84,00	0,86 ns	18,40	16,00	0,50 ns	5,80	6,00	0,70 ns
	T	39,20	38,60	0,21 ns	87,20	85,30	0,70 ns	22,67	28,80	0,11 ns	5,20	5,70	0,24 ns
47	M	38,40	38,10	0,34 ns	72,00	76,00	0,37 ns	23,60	20,00	0,48 ns	5,00	5,00	1,00 ns
	T	39,50	39,20	0,35 ns	83,20	88,00	0,27 ns	24,00	28,00	0,48 ns	5,40	5,70	0,67 ns
48	M	38,30	38,10	0,51 ns	80,00	74,70	0,50 ns	25,60	18,70	0,19 ns	5,80	5,70	0,88 ns
	T	39,40	39,20	0,33 ns	83,20	82,70	0,91 ns	26,67	28,40	0,80 ns	5,80	6,00	0,48 ns
49	M	38,00	38,30	0,15 ns	81,60	81,30	0,97 ns	20,80	21,30	0,82 ns	5,80	6,00	0,81 ns
	T	39,10	39,00	0,71 ns	80,00	80,00	1,00 ns	25,33	24,80	0,89 ns	5,60	5,70	0,88 ns
50	M	38,50	37,90	0,26 ns	80,00	74,70	0,50 ns	19,20	20,00	0,83 ns	5,60	4,70	0,06 ns
	T	39,00	38,60	0,34 ns	85,60	80,00	0,21 ns	29,33	24,00	0,45 ns	5,60	5,00	0,12 ns

Continua...

Continuação

51	M	38,50	38,00	0,46 ns	86,40	72,00	0,01 **	21,60	20,00	0,63 ns	5,60	5,30	0,54 ns
	T	39,50	38,70	0,17 ns	88,80	88,00	0,81 ns	28,00	24,00	0,40 ns	5,60	5,70	0,88 ns
52	M	38,40	37,70	0,30 ns	76,00	73,30	0,58 ns	24,00	24,00	1,00 ns	5,40	5,00	0,48 ns
	T	39,30	39,10	0,53 ns	85,60	85,30	0,96 ns	32,00	28,00	0,56 ns	6,00	6,30	0,52 ns
53	M	38,20	38,20	0,81 ns	80,00	86,70	0,11 ns	24,40	21,30	0,50 ns	5,40	5,70	0,67 ns
	T	38,70	38,60	0,41 ns	87,20	84,00	0,51 ns	22,67	23,20	0,94 ns	5,80	5,00	0,27 ns
54	M	38,30	38,10	0,04*	79,20	86,70	0,45 ns	20,00	25,30	0,32 ns	5,40	5,00	0,48 ns
	T	39,00	38,50	0,02 **	83,20	86,70	0,62 ns	24,00	26,40	0,64 ns	5,20	5,30	0,72 ns
55	M	38,10	37,90	0,70 ns	76,80	74,70	0,37 ns	20,80	20,00	0,88 ns	5,40	4,30	0,04 **
	T	38,80	38,80	0,82 ns	83,20	84,00	0,87 ns	25,33	28,00	0,73 ns	5,80	5,30	0,24 ns
56	M	38,20	38,10	0,40 ns	76,80	73,30	0,42 ns	23,20	25,30	0,74 ns	5,60	5,00	0,30 ns
	T	38,90	38,80	0,43 ns	83,20	80,00	0,48 ns	32,00	30,00	0,78 ns	5,40	5,30	0,88 ns
57	M	38,10	37,90	0,46 ns	87,20	88,00	0,94 ns	20,80	22,70	0,75 ns	5,40	4,70	0,12 ns
	T	39,10	38,80	0,18 ns	84,80	85,30	0,89 ns	22,67	25,20	0,58 ns	5,60	5,00	0,12 ns
58	M	38,00	38,00	0,86 ns	78,40	80,00	0,83 ns	18,40	18,70	0,91 ns	5,60	5,30	0,54 ns
	T	39,30	38,90	0,08 ns	86,40	82,70	0,49 ns	26,00	22,80	0,53 ns	5,60	5,30	0,54 ns
59	M	38,40	38,10	0,14 ns	72,80	68,00	0,50 ns	19,20	22,70	0,46 ns	4,80	4,70	0,72 ns
	T	39,30	39,10	0,26 ns	84,00	80,00	0,28 ns	26,67	22,80	0,43 ns	5,20	5,70	0,24 ns
60	M	38,40	38,10	0,14 ns	88,80	82,70	0,31 ns	24,00	18,70	0,22 ns	5,60	5,30	0,54 ns
	T	38,70	38,70	0,62 ns	87,20	89,30	0,79 ns	22,67	28,00	0,22 ns	5,20	6,00	0,02 **
67	M	38,10	38,20	0,74 ns	84,40	76,00	0,07 ns	20,80	24,00	0,34 ns	5,40	6,00	0,30 ns
	T	39,30	38,70	0,03*	83,20	82,70	0,93 ns	28,00	24,00	0,48 ns	6,00	6,30	0,68 ns
74	M	38,30	38,00	0,12 ns	83,20	81,30	0,43 ns	22,40	25,30	0,56 ns	5,60	5,70	0,91 ns
	T	39,20	38,70	0,03*	82,40	82,70	0,94 ns	25,33	25,60	0,93 ns	6,00	6,30	0,52 ns
81	M	38,20	38,20	0,73 ns	79,20	78,70	0,93 ns	22,40	18,70	0,51 ns	5,80	5,70	0,82 ns
	T	39,20	38,50	0,04*	84,00	82,70	0,78 ns	22,67	23,20	0,88 ns	5,80	6,70	0,17 ns
88	M	38,30	38,30	0,95 ns	83,20	81,30	0,66 ns	20,00	18,70	0,72 ns	5,60	4,70	0,06 ns
	T	39,00	38,60	0,15 ns	80,80	84,00	0,34 ns	22,67	23,20	0,92 ns	6,20	5,70	0,37 ns
95	M	38,20	38,00	61,9 ns	82,40	92,00	0,01*	17,20	24,00	0,09 ns	5,80	5,00	0,16 ns
	T	39,00	38,80	0,54 ns	83,20	82,70	0,93 ns	21,33	22,40	0,67 ns	5,20	6,70	0,04 *
102	M	38,10	38,30	0,47 ns	80,00	84,00	0,22 ns	23,20	21,30	0,68 ns	5,40	6,30	0,31 ns
	T	39,10	38,50	0,13 ns	88,80	84,00	0,34 ns	21,33	24,80	0,33 ns	5,80	6,00	0,70 ns
109	M	38,30	38,10	0,20 ns	84,80	84,00	0,86 ns	21,60	21,30	0,96 ns	5,00	5,30	0,62 ns
	T	39,30	38,50	0,02*	84,00	85,30	0,52 ns	25,33	20,80	0,21 ns	5,60	6,30	0,12 ns
116	M	38,10	38,20	0,41 ns	83,20	80,00	0,51 ns	25,60	24,00	0,79 ns	5,60	5,70	0,88 ns
	T	39,30	38,50	0,08 ns	76,80	90,70	0,01**	24,00	22,00	0,61 ns	5,60	5,70	0,88 ns
123	M	38,00	38,20	0,66 ns	76,40	92,00	0,00**	23,60	22,70	0,70 ns	5,40	5,30	0,91 ns
	T	39,20	38,90	0,38 ns	84,80	82,70	0,72 ns	25,33	26,40	0,79 ns	6,00	5,00	0,06 ns
130	M	38,30	38,20	0,71 ns	80,00	85,30	0,08 ns	21,60	18,70	0,58 ns	6,20	5,30	0,17 ns
	T	39,20	38,40	0,15 ns	85,60	81,30	0,34 ns	22,67	26,40	0,40 ns	5,20	5,70	0,43 ns
137	M	38,20	38,20	0,96 ns	79,20	77,30	0,68 ns	23,20	22,70	0,92 ns	5,40	5,70	0,67 ns
	T	39,00	38,90	0,71 ns	85,60	86,70	0,72 ns	22,67	20,00	0,48 ns	6,00	5,70	0,62 ns
144	M	38,00	38,20	0,40 ns	84,80	84,00	0,77 ns	21,60	21,30	0,97 ns	6,20	5,00	0,12 ns
	T	39,00	38,70	0,34 ns	80,00	84,00	0,28 ns	24,00	22,00	0,43 ns	5,60	5,30	0,67 ns
151	M	38,40	38,20	0,49 ns	76,80	78,70	0,70 ns	20,00	20,00	1,00 ns	5,80	5,30	0,43 ns
	T	39,00	38,60	0,30 ns	82,40	81,30	0,79 ns	30,67	26,40	0,30 ns	6,00	5,70	0,62 ns
158	M	38,30	38,00	0,32 ns	82,40	82,70	0,95 ns	22,40	20,00	0,48 ns	6,20	6,00	0,70 ns
	T	39,40	38,80	0,17 ns	89,60	84,00	0,21 ns	18,67	23,20	0,02*	5,60	6,00	0,27 ns
165	M	38,20	38,10	0,78 ns	84,00	88,00	0,14 ns	20,80	18,70	0,37 ns	5,20	6,30	0,02 *
	T	39,20	38,70	0,12 ns	86,40	78,70	0,08 ns	24,00	23,20	0,86 ns	5,80	6,70	0,05*
172	M	38,40	38,20	0,52 ns	81,60	86,70	0,52 ns	21,60	18,70	0,41 ns	5,20	5,30	0,72 ns
179	M	38,20	38,10	0,59 ns	81,20	85,30	0,19 ns	21,60	22,70	0,72 ns	5,60	5,30	0,54 ns
186	M	38,20	38,00	0,09 ns	83,20	82,00	0,79 ns	20,40	22,70	0,52 ns	5,80	5,70	0,82 ns
193	M	38,10	38,00	0,52 ns	82,40	81,30	0,72 ns	21,60	20,70	0,63 ns	5,40	5,30	0,91 ns
200	M	38,40	38,00	0,01 **	83,20	86,70	0,42 ns	21,60	20,00	0,77 ns	5,60	5,30	0,54 ns
207	M	38,60	38,10	0,34 ns	84,80	82,70	0,68 ns	20,80	20,00	0,81 ns	5,80	5,30	0,43 ns
221	M	38,40	38,30	0,83 ns	78,40	82,70	0,19 ns	24,80	18,70	0,18 ns	5,80	6,00	0,77 ns

Continua...

Continuação

235	M	38,10	38,20	0,66 ns	77,60	84,00	0,19 ns	23,20	20,00	0,02 *	5,40	6,00	0,12 ns
249	M	38,20	38,10	0,42 ns	82,40	80,00	0,57 ns	24,00	22,70	0,72 ns	5,60	5,70	0,91 ns
263	M	38,30	38,20	0,30 ns	83,20	82,70	0,82 ns	23,60	22,70	0,73 ns	6,00	5,70	0,52 ns
277	M	38,10	38,00	0,47 ns	83,20	81,30	0,63 ns	24,80	20,70	0,13 ns	6,00	5,30	0,22 ns
291	M	38,20	38,00	0,19 ns	84,80	86,70	0,68 ns	21,60	20,00	0,58 ns	6,00	5,30	0,03*
305	M	38,30	38,10	0,39 ns	84,80	82,70	0,67 ns	23,20	20,00	0,27 ns	6,00	5,30	0,22 ns
319	M	38,20	38,30	0,68 ns	84,00	82,70	0,72 ns	21,60	18,70	0,12 ns	6,20	6,00	0,70 ns
333	M	38,40	38,20	0,48 ns	84,80	84,00	0,85 ns	19,20	20,00	0,70 ns	6,20	6,00	0,70 ns
347	M	38,30	38,10	0,26 ns	84,40	80,00	0,33 ns	21,80	22,70	0,78 ns	6,20	5,70	0,37 ns
361	M	38,20	38,20	0,56 ns	85,20	82,70	0,13 ns	21,60	22,70	0,54 ns	5,60	5,70	0,88 ns
375	M	38,26	38,23	0,93 ns	81,60	81,33	0,97 ns	21,60	20,00	0,63 ns	5,80	5,33	0,24 ns
405	M	38,18	38,10	0,56 ns	87,20	88,00	0,94 ns	24,80	25,33	0,91 ns	6,00	5,33	0,34 ns
435	M	37,96	38,07	0,55 ns	85,20	80,00	0,41 ns	27,20	26,67	0,94 ns	5,60	5,33	0,54 ns
465	M	38,36	38,00	0,06 ns	85,60	82,00	0,21 ns	24,40	24,00	0,93 ns	5,40	5,00	0,48 ns
495	M	38,32	38,10	0,16 ns	83,60	82,67	0,78 ns	24,80	22,67	0,37 ns	6,20	6,33	0,72 ns
525	M	38,10	38,20	0,85 ns	84,80	84,00	0,86 ns	26,40	24,00	0,66 ns	6,20	5,67	0,19 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

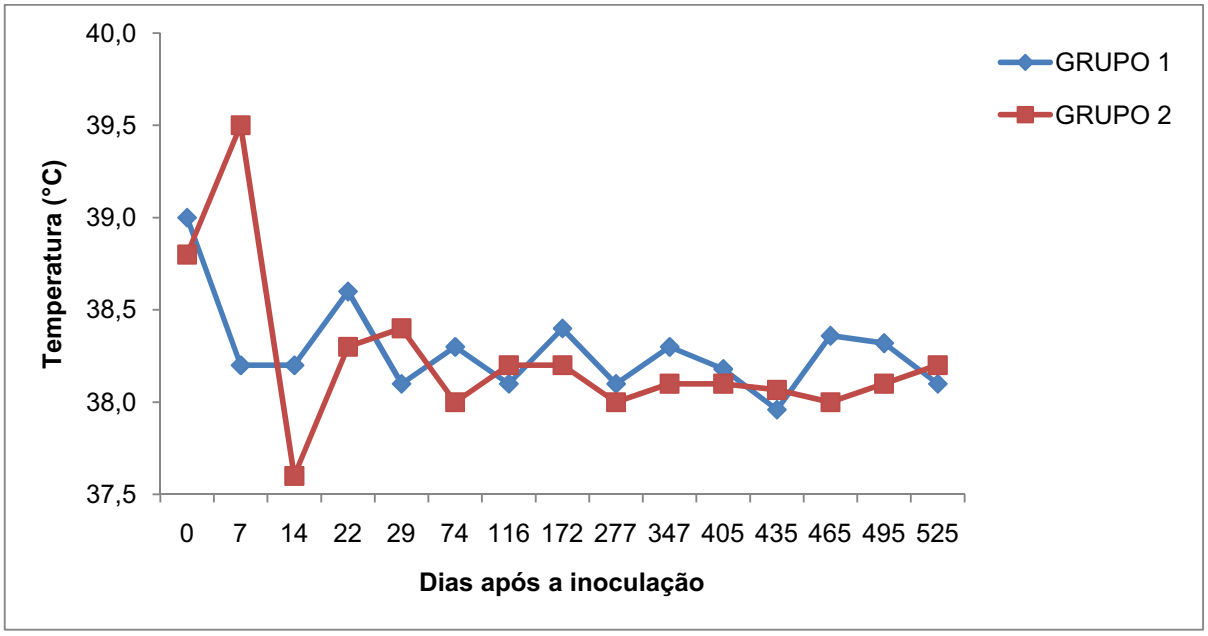

Figura 1. Médias da temperatura retal (Cº), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

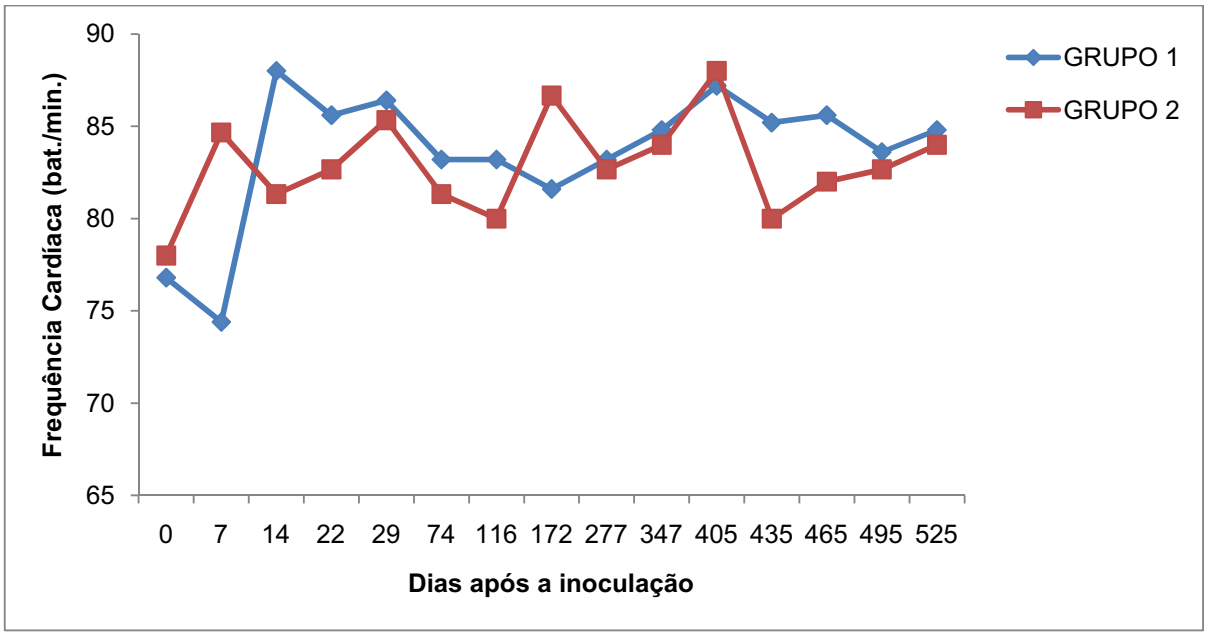

Figura 2. Médias da frequência cardíaca (movimentos/minuto), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

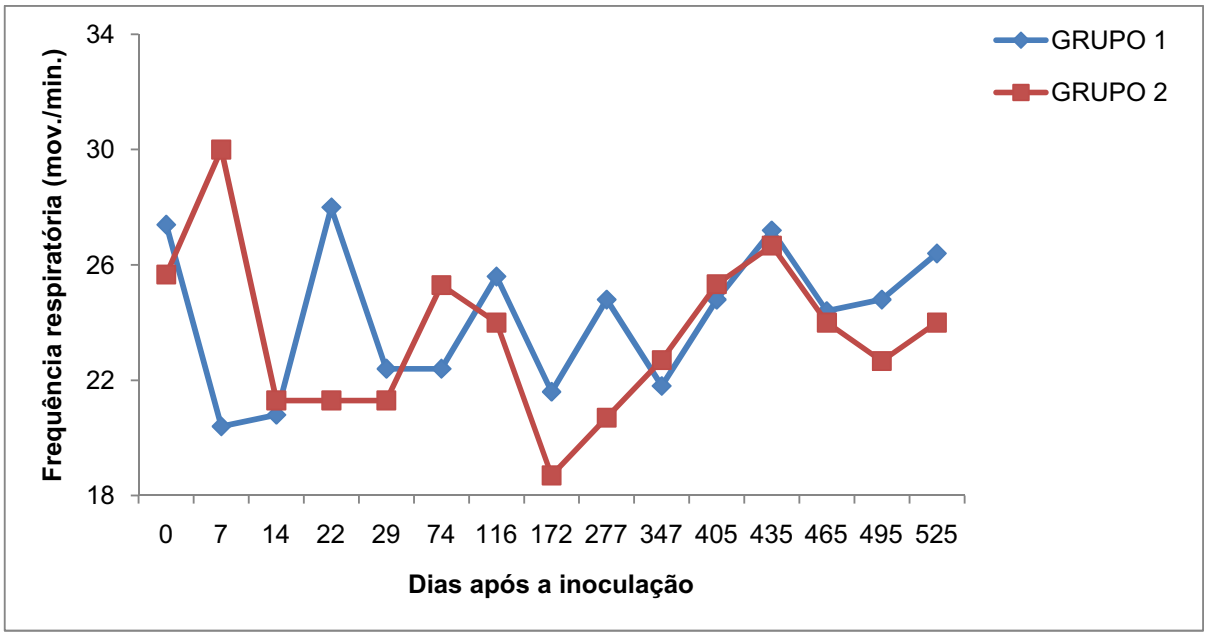

Figura 3. Médias da frequência respiratória (movimentos/minuto), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

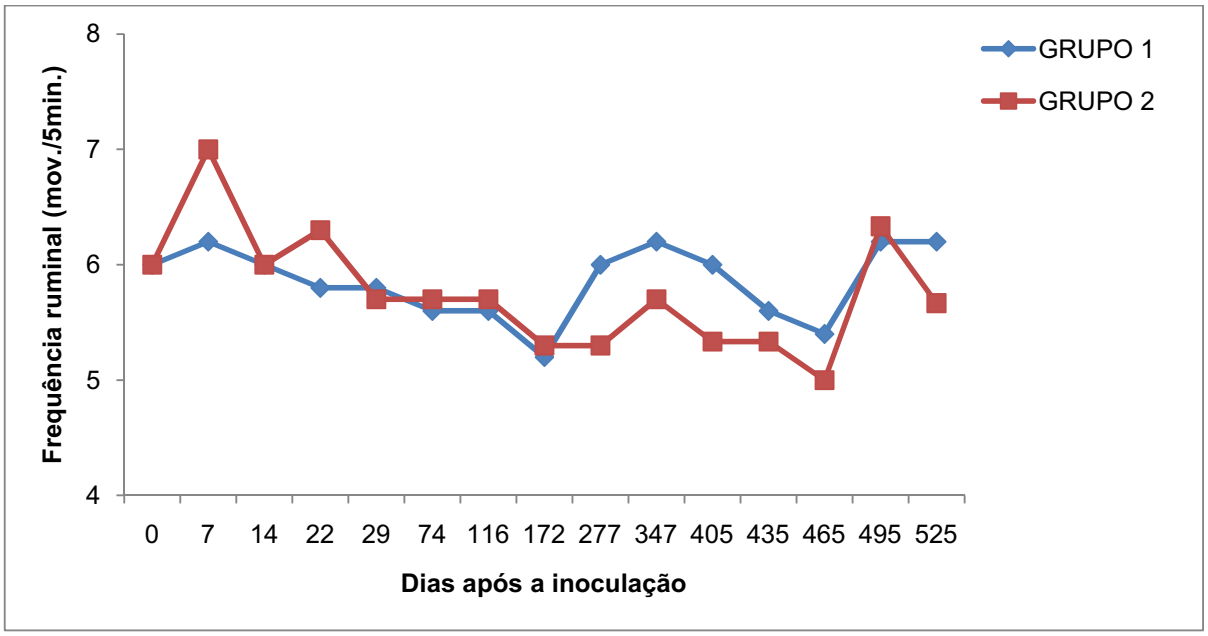

Figura 4. Médias dos movimentos ruminais (mov./5min), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

4.4 Patologia clínica

4.4.1 Análise do líquido cefalorraquidiano

Os exames físicos do líquido cefalorraquidiano, revelaram apectos perfeitamente límpidos e coloração transparente. As contagens de hemácias, leucócitos totais e diferenciais (polimorfonucleares e mononucleares) e dosagens de proteínas totais não revelaram alterações significativas, portanto, todos os parâmetros analizados estão dentro dos limites fisiológicos considerados para a espécie bovina. Ainda, pelos métodos diretos e indiretos de pesquisa de *T. evansi* não se evidenciou em nenhum momento a presença do parasita.

4.4.2 Hemograma

Médias e níveis de significância das contagens de hemácias, leucócitos, teores de hemoglobina, volumes globulares, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagem de leucócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, estão representadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 e Figuras 5 a 17 respectivamente.

Os eritrogramas dos bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* revelam que a cepa empregada não foi capaz de provocar anemia.

O número de leucócitos do grupo inoculado apresentou redução significativa ao 260° DAI. As contagens de linfócitos e basófilos não apresentaram variações sigificativas entre os grupos. As contagens de neutrófilos segmentados e bastonetes, nos animais inoculados com *T. evansi* diminuiram sinificativamente no 5° DAI.

Tabela 2. Médias e significâncias do teste t das contagens de hemácias (x10^6/µL), hemoglobina (g / dL), volume globular (%) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Hemácia			Hemoglobina			Volume globular		
	Médias			Médias			Médias		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	4,7	5,0	0,2946 ns	10,6	10,8	0,7907 ns	32,8	33,0	0,9399 ns
1	4,6	4,9	0,3255 ns	10,4	10,9	0,6553 ns	31,8	34,0	0,5020 ns
2	4,7	5,3	0,1789 ns	10,9	12,3	0,1629 ns	31,4	34,7	0,3013 ns
3	4,8	5,3	0,3662 ns	10,5	11,7	0,1181 ns	29,6	33,0	0,1888 ns
4	5,0	5,4	0,5136 ns	10,0	11,4	0,2003 ns	29,4	33,0	0,2338 ns
5	4,7	4,9	0,6847 ns	10,7	11,8	0,2545 ns	30,2	32,0	0,4536 ns
6	5,3	5,2	0,7668 ns	10,6	11,4	0,4833 ns	30,6	32,3	0,5743 ns
7	5,3	5,5	0,6313 ns	10,8	10,9	0,9337 ns	31,6	31,3	0,9302 ns
8	5,1	5,1	0,9985 ns	10,5	11,3	0,5126 ns	30,4	31,7	0,6591 ns
9	4,6	4,8	0,8232 ns	10,3	10,5	0,8303 ns	30,2	29,7	0,8437 ns
10	4,8	4,5	0,4746 ns	9,40	11,2	0,01770 *	29,2	29,7	0,8629 ns
11	4,8	4,7	0,9712 ns	10,4	10,6	0,8490 ns	30,0	29,3	0,8202 ns
12	4,4	4,9	0,5189 ns	10,2	10,6	0,6612 ns	29,8	30,0	0,9407 ns
13	4,4	5,3	0,1042 ns	10,2	10,5	0,8254 ns	29,4	30,0	0,8383 ns
14	4,5	5,1	0,2161 ns	9,40	10,7	0,1293 ns	27,4	30,7	0,2552 ns
15	4,5	5,4	0,2169 ns	9,30	10,6	0,1391 ns	27,6	31,0	0,1888 ns
22	4,8	5,2	0,3721 ns	10,3	10,6	0,6093 ns	30,6	31,0	0,8286 ns
29	4,8	4,9	0,8437 ns	10,9	10,6	0,5752 ns	32,0	31,3	0,7091 ns
36	5,1	5,1	0,9928 ns	11,4	11,9	0,4996 ns	31,8	31,3	0,8015 ns
43	5,8	5,9	0,7337 ns	11,1	11,5	0,5208 ns	32,2	32,0	0,9234 ns
50	4,8	5,1	0,3142 ns	11,0	11,7	0,1933 ns	32,4	33,0	0,7310 ns
57	5,5	5,0	0,5792 ns	11,1	11,2	0,9134 ns	32,2	32,3	0,9441 ns
64	4,9	5,2	0,7229 ns	10,4	11,1	0,3420 ns	31,8	32,0	0,9217 ns
71	6,3	5,8	0,6720 ns	11,4	11,7	0,7338 ns	32,6	33,7	0,6836 ns
78	5,6	5,7	0,8507 ns	11,8	11,6	0,8195 ns	33,6	31,3	0,4276 ns
85	5,8	6,4	0,3083 ns	11,8	12,5	0,5756 ns	34,6	36,3	0,5490 ns
92	5,5	5,1	0,3507 ns	11,5	12,0	0,5364 ns	33,6	34,7	0,6547 ns
99	5,6	5,8	0,5555 ns	11,9	11,7	0,8315 ns	34,0	33,7	0,8971 ns
106	6,3	5,3	0,1258 ns	12,3	11,5	0,3900 ns	35,8	33,0	0,3308 ns
113	6,3	5,7	0,4414 ns	12,3	11,7	0,5644 ns	35,2	34,0	0,6906 ns
120	5,9	5,6	0,5367 ns	13,1	12,1	0,2713 ns	36,4	34,0	0,3891 ns
127	5,6	5,6	0,9535 ns	12,5	12,7	0,8325 ns	34,4	34,7	0,9271 ns
134	5,1	5,0	0,7823 ns	12,5	12,1	0,5263 ns	34,6	33,0	0,4243 ns
141	5,5	5,7	0,5482 ns	12,5	12,4	0,9499 ns	35,8	34,0	0,3699 ns
148	5,9	5,9	0,9015 ns	12,7	12,5	0,6072 ns	35,4	34,0	0,5820 ns
155	5,8	5,6	0,4774 ns	12,9	12,4	0,4995 ns	35,8	34,7	0,6280 ns
162	6,0	5,9	0,7940 ns	12,9	12,5	0,5751 ns	36,2	35,7	0,8182 ns
169	5,6	5,4	0,4483 ns	13,0	12,3	0,3801 ns	36,0	34,0	0,3794 ns
176	6,1	5,8	0,4159 ns	13,9	12,4	0,2256 ns	36,4	33,3	0,3684 ns
183	6,0	6,0	0,9242 ns	12,9	12,5	0,5551 ns	36,0	34,0	0,4046 ns
190	5,9	5,7	0,5959 ns	13,1	12,2	0,0971 ns	34,8	33,7	0,5469 ns
197	6,0	5,2	0,0741 ns	13,0	12,5	0,6923 ns	36,8	34,3	0,4512 ns
204	5,8	5,6	0,5950 ns	13,2	12,7	0,4527 ns	38,0	36,0	0,2026 ns
218	6,3	6,0	0,4180 ns	12,8	12,2	0,5841 ns	40,8	36,3	0,1683 ns
232	6,3	6,4	0,7361 ns	14,2	13,0	0,3528 ns	38,6	33,3	0,0342*
246	7,0	6,1	0,1800 ns	13,6	12,3	0,2214 ns	38,0	33,0	0,0314*
260	5,9	5,6	0,4892 ns	12,9	12,4	0,4900 ns	37,2	34,7	0,3201 ns
274	7,8	5,9	0,0094**	14,2	12,5	0,0930 ns	40,4	35,7	0,0535 ns

Continua...

Continuação

288	6,1	5,4	0,0970 ns	13,2	12,3	0,3432 ns	37,0	34,0	0,2416 ns
302	5,9	5,8	0,7508 ns	13,3	12,4	0,2052 ns	38,2	33,3	0,0594 ns
316	6,7	6,0	0,3249 ns	13,1	12,5	0,5684 ns	38,4	34,0	0,2837 ns
330	6,8	5,2	0,0030**	13,7	12,5	0,1307 ns	39,0	34,3	0,1160 ns
344	7,1	5,6	0,0238 ns	14,2	12,7	0,1749 ns	40,0	36,0	0,1445 ns
358	6,8	6,0	0,2664 ns	13,7	12,2	0,2914 ns	37,6	36,3	0,7221 ns
372	6,9	6,4	0,4159 ns	13,9	13,0	0,3644 ns	40,6	33,3	0,0343*
402	6,5	6,1	0,5928 ns	14,0	12,3	0,2295 ns	37,0	33,0	0,0338*
432	8,2	6,4	0,2338 ns	14,3	13,1	0,4322 ns	39,8	35,3	0,2454 ns
462	8,1	6,0	0,0003 **	14,8	12,2	0,0282 ns	40,6	34,3	0,0327*
492	7,2	6,0	0,0161 ns	13,9	12,5	0,1768 ns	31,8	32,0	0,9217 ns
522	8,2	8,9	0,3732 ns	14,3	13,9	0,7216 ns	38,4	35,0	0,3579 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

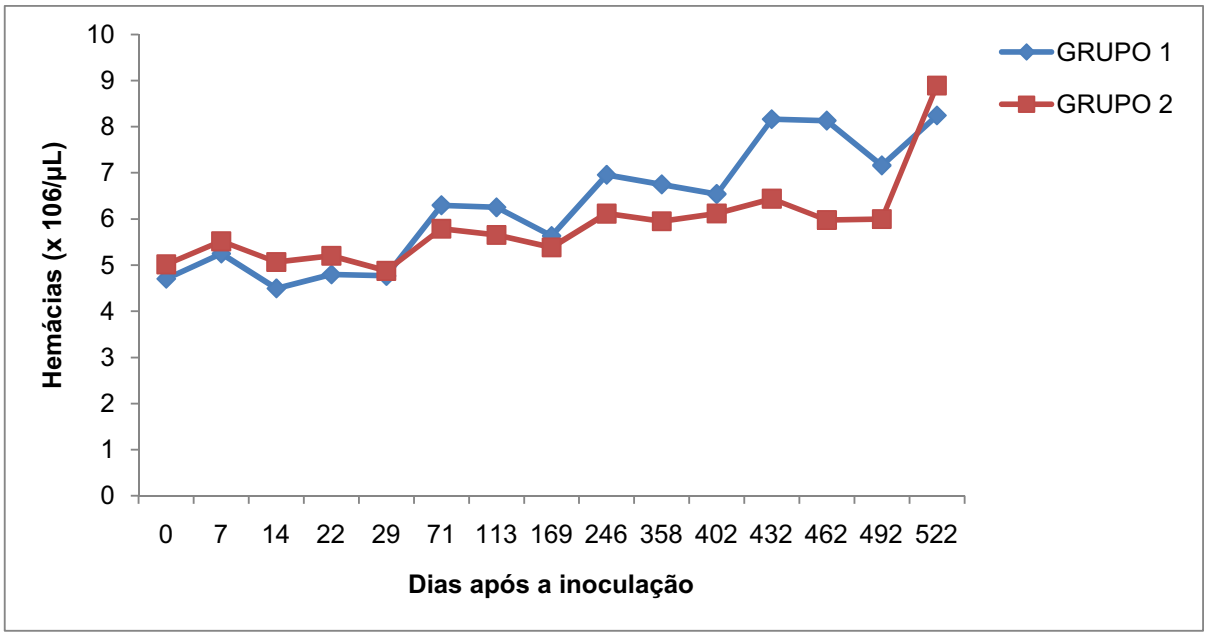

Figura 5. Médias da contagem de hemácias (x10^6/µL), em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e nos animais do grupo testemunho (G2).

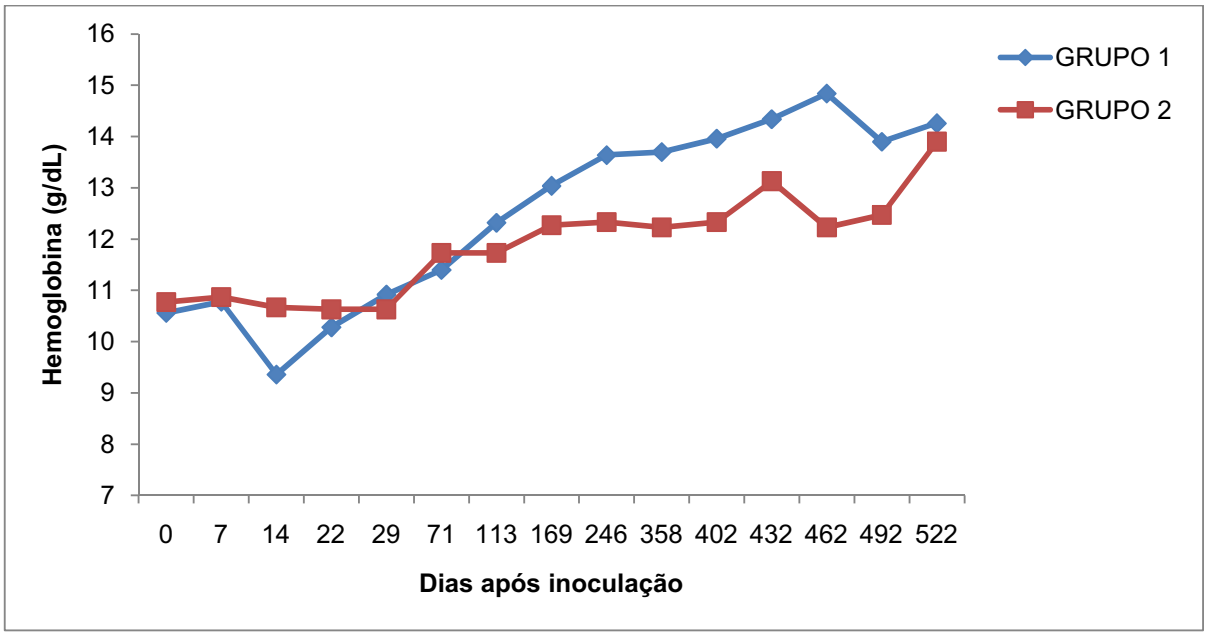

Figura 6. Médias dos teores de hemoglobina (g / dL) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

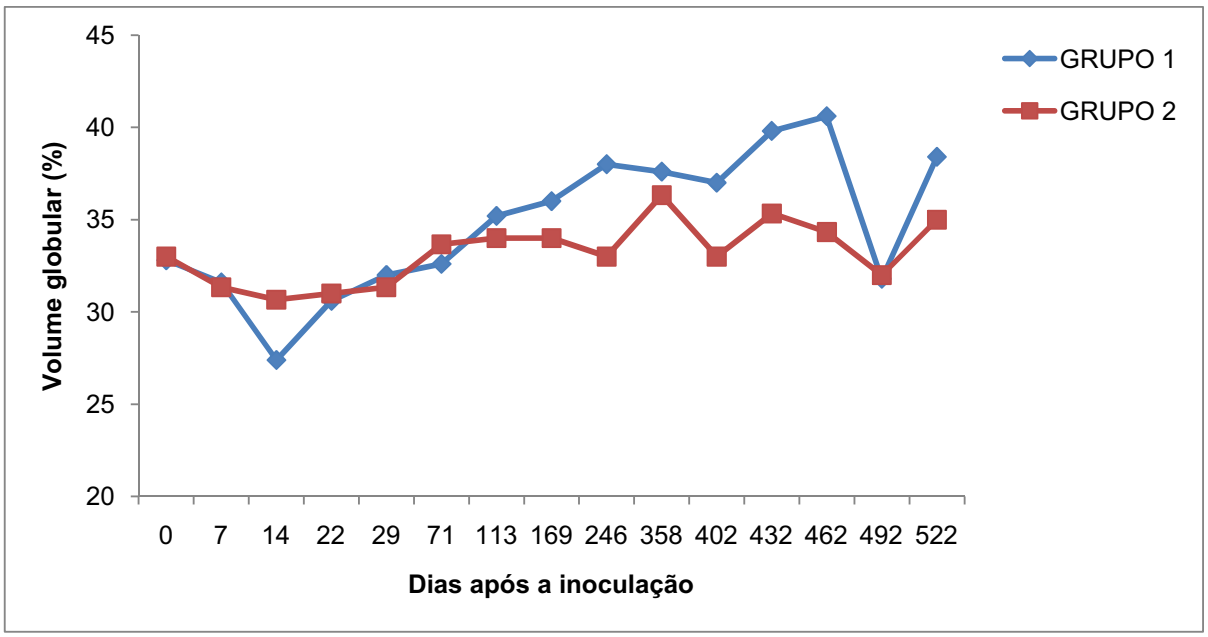

Figura 7. Médias do volume globular (%) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

Tabela 3. Médias e significâncias do teste t dos volumes corpuscular médio -VGM (fl), hemoglobina corpuscular média-HGM (µµg) e concentração de hemoglobina corpuscular media -CHGM (g / dL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	VGM			HGM			CHGM		
	Médias			Médias			Médias		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	70,0	66,0	0,5438 ^{ns}	22,5	21,6	0,6260 ^{ns}	32,3	32,7	0,8156 ^{ns}
1	69,8	69,2	0,9260 ^{ns}	22,7	22,1	0,8126 ^{ns}	32,5	32,0	0,6368 ^{ns}
2	67,7	66,0	0,8241 ^{ns}	23,5	23,5	0,9940 ^{ns}	34,7	35,7	0,1120 ^{ns}
3	61,8	62,9	0,8675 ^{ns}	22,0	22,4	0,8563 ^{ns}	35,5	35,7	0,8762 ^{ns}
4	58,8	62,0	0,5140 ^{ns}	20,0	21,6	0,4276 ^{ns}	34,0	34,7	0,4665 ^{ns}
5	64,4	65,9	0,7933 ^{ns}	22,7	24,3	0,4773 ^{ns}	35,3	36,9	0,1600 ^{ns}
6	57,5	61,8	0,4019 ^{ns}	19,9	21,7	0,3331 ^{ns}	34,6	35,3	0,6297 ^{ns}
7	60,7	57,9	0,7213 ^{ns}	20,7	20,0	0,7749 ^{ns}	34,1	34,8	0,6543 ^{ns}
8	60,0	63,0	0,6860 ^{ns}	20,7	22,4	0,4893 ^{ns}	34,5	35,6	0,1175 ^{ns}
9	65,6	62,9	0,5961 ^{ns}	22,5	22,4	0,9934 ^{ns}	34,2	35,5	0,3689 ^{ns}
10	61,3	67,7	0,2495 ^{ns}	19,9	25,8	0,0966 ^{ns}	32,6	38,0	0,2060 ^{ns}
11	63,2	62,7	0,9269 ^{ns}	22,0	22,7	0,7739 ^{ns}	34,8	36,2	0,2728 ^{ns}
12	67,6	64,4	0,7447 ^{ns}	23,2	22,9	0,9385 ^{ns}	34,3	35,9	0,6175 ^{ns}
13	67,6	58,2	0,2186 ^{ns}	23,3	20,3	0,2882 ^{ns}	34,5	34,9	0,7058 ^{ns}
14	61,0	60,8	0,9647 ^{ns}	20,8	21,3	0,7807 ^{ns}	34,2	34,9	0,5115 ^{ns}
15	61,1	59,2	0,7319 ^{ns}	20,5	20,4	0,9454 ^{ns}	33,5	34,3	0,1458 ^{ns}
22	64,2	60,2	0,5257 ^{ns}	21,6	20,6	0,6369 ^{ns}	33,6	34,3	0,4133 ^{ns}
29	67,3	66,0	0,8401 ^{ns}	23,0	22,4	0,8035 ^{ns}	34,2	34,0	0,7196 ^{ns}
36	62,3	61,5	0,8824 ^{ns}	22,2	23,2	0,4694 ^{ns}	35,8	37,9	0,3473 ^{ns}
43	56,0	54,4	0,7112 ^{ns}	19,2	19,6	0,7628 ^{ns}	34,5	36,0	0,3649 ^{ns}
50	68,1	65,5	0,6204 ^{ns}	23,2	23,2	0,9952 ^{ns}	34,1	35,5	0,2131 ^{ns}
57	60,4	64,2	0,6032 ^{ns}	20,7	22,2	0,4869 ^{ns}	34,5	34,6	0,9947 ^{ns}
64	66,0	62,7	0,6489 ^{ns}	21,4	21,8	0,8543 ^{ns}	32,8	34,7	0,2408 ^{ns}
71	53,2	59,7	0,3410 ^{ns}	18,6	20,9	0,3774 ^{ns}	34,9	34,9	0,9246 ^{ns}
78	59,9	54,9	0,3152 ^{ns}	21,1	20,3	0,5911 ^{ns}	35,2	37,3	0,2118 ^{ns}
85	59,9	57,7	0,6415 ^{ns}	20,5	19,8	0,6928 ^{ns}	34,2	34,3	0,8871 ^{ns}
92	61,4	67,8	0,1943 ^{ns}	20,9	23,4	0,1340 ^{ns}	34,1	34,5	0,5045 ^{ns}
99	60,7	58,0	0,5074 ^{ns}	21,3	20,3	0,5141 ^{ns}	35,0	34,9	0,9171 ^{ns}
106	57,4	62,1	0,2916 ^{ns}	19,7	21,7	0,1028 ^{ns}	34,5	34,9	0,5636 ^{ns}
113	56,9	60,2	0,4002 ^{ns}	19,9	20,8	0,5368 ^{ns}	35,1	34,5	0,6081 ^{ns}
120	62,0	60,9	0,7174 ^{ns}	22,4	21,7	0,6062 ^{ns}	36,1	35,6	0,4591 ^{ns}
127	61,9	62,2	0,9609 ^{ns}	22,5	22,9	0,8425 ^{ns}	36,4	36,8	0,7104 ^{ns}
134	67,7	65,5	0,5312 ^{ns}	24,5	24,0	0,6892 ^{ns}	36,2	36,7	0,6897 ^{ns}
141	65,5	60,1	0,2733 ^{ns}	22,8	22,0	0,6084 ^{ns}	34,9	36,6	0,0378 ^{ns}
148	60,0	58,0	0,6703 ^{ns}	21,6	21,3	0,8475 ^{ns}	36,2	36,8	0,7575 ^{ns}
155	61,7	62,1	0,8887 ^{ns}	22,3	22,1	0,8750 ^{ns}	36,1	35,7	0,6525 ^{ns}
162	60,2	60,9	0,8566 ^{ns}	21,6	21,4	0,9007 ^{ns}	35,8	35,2	0,5132 ^{ns}
169	63,9	63,2	0,7698 ^{ns}	23,2	22,8	0,7299 ^{ns}	36,2	36,1	0,8512 ^{ns}
176	59,6	58,0	0,7921 ^{ns}	22,8	21,4	0,5640 ^{ns}	38,2	37,5	0,8350 ^{ns}
183	60,4	57,1	0,5470 ^{ns}	21,6	20,9	0,7327 ^{ns}	35,8	36,7	0,3400 ^{ns}
190	60,3	59,6	0,8678 ^{ns}	22,2	22,1	0,9170 ^{ns}	35,5	36,0	0,5908 ^{ns}
197	61,5	66,1	0,1890 ^{ns}	21,8	24,1	0,1611 ^{ns}	35,4	36,4	0,2580 ^{ns}
204	66,0	64,3	0,5418 ^{ns}	22,9	22,8	0,8762 ^{ns}	34,8	35,4	0,7342 ^{ns}
218	63,5	61,0	0,2801 ^{ns}	20,4	20,5	0,8942 ^{ns}	32,2	33,7	0,1982 ^{ns}
232	60,6	52,2	0,0246*	22,7	20,3	0,0695 ^{ns}	37,4	39,0	0,0772 ^{ns}
246	55,2	54,1	0,8018 ^{ns}	19,7	20,2	0,5899 ^{ns}	36,0	37,4	0,6042 ^{ns}
260	63,4	62,1	0,6752 ^{ns}	22,0	22,1	0,9422 ^{ns}	34,8	35,7	0,3194 ^{ns}
274	52,0	60,9	0,0221 *	18,3	21,4	0,0242 ^{ns}	35,1	35,2	0,9815 ^{ns}

Continua...

Continuação

288	60,3	63,2	0,2732 ns	21,5	22,8	0,2436 ns	35,6	36,1	0,5366 ns
302	54,1	58,0	0,7927 ns	22,6	21,4	0,4468 ns	34,9	37,5	0,3333 ns
316	57,7	57,1	0,9112 ns	19,7	20,9	0,4321 ns	34,4	36,7	0,3081 ns
330	57,1	66,1	0,0206 *	20,1	24,1	0,0138 ns	35,3	36,4	0,1918 ns
344	56,2	64,3	0,0103*	19,9	22,8	0,0090 ns	35,4	35,4	0,9926 ns
358	57,3	61,0	0,6866 ns	20,5	20,5	0,9930 ns	36,7	33,7	0,4020 ns
372	59,1	52,2	0,0354 ns	20,2	20,3	0,9101 ns	34,2	39,0	0,0014 *
402	57,8	54,1	0,5387 ns	21,8	20,2	0,5894 ns	37,6	37,4	0,9187 ns
432	50,1	54,9	0,3703 ns	18,2	20,4	0,4169 ns	36,2	36,9	0,7871 ns
462	50,0	57,4	0,0391 ns	18,3	20,4	0,1070 ns	36,6	35,6	0,4719 ns
492	44,4	53,3	0,0001**	19,4	20,8	0,2622 ns	43,8	39,0	0,0909 ns
522	47,0	39,4	0,1187 ns	17,4	15,8	0,3051 ns	37,2	40,3	0,3751 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

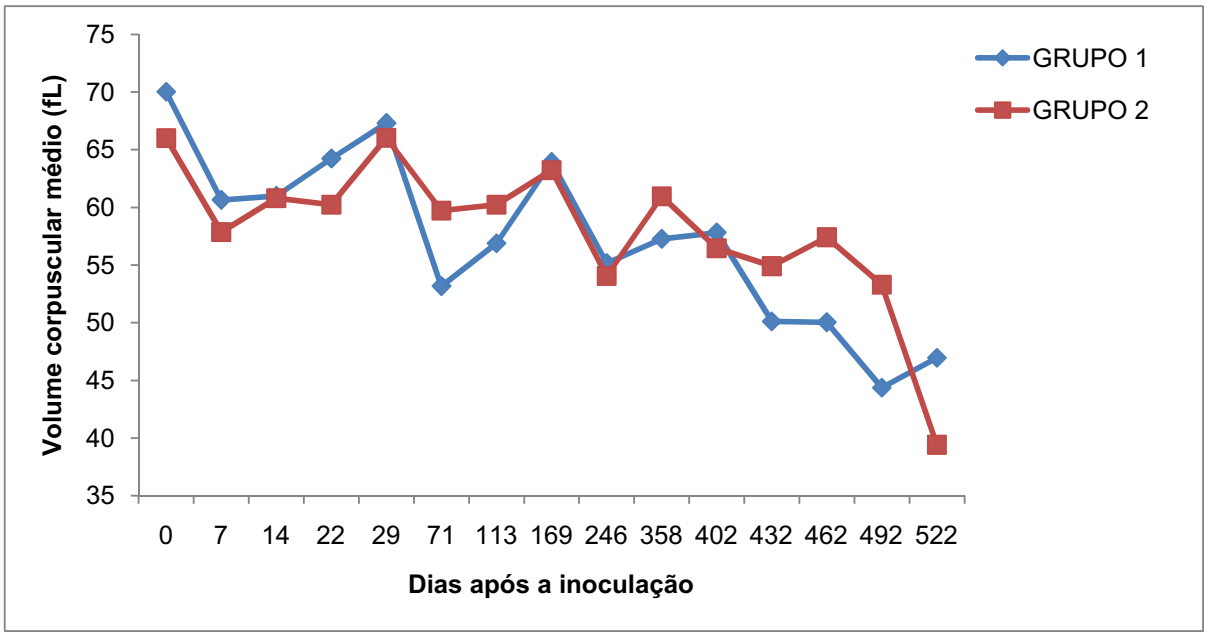

Figura 8. Médias do volume corpuscular médio (fl), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

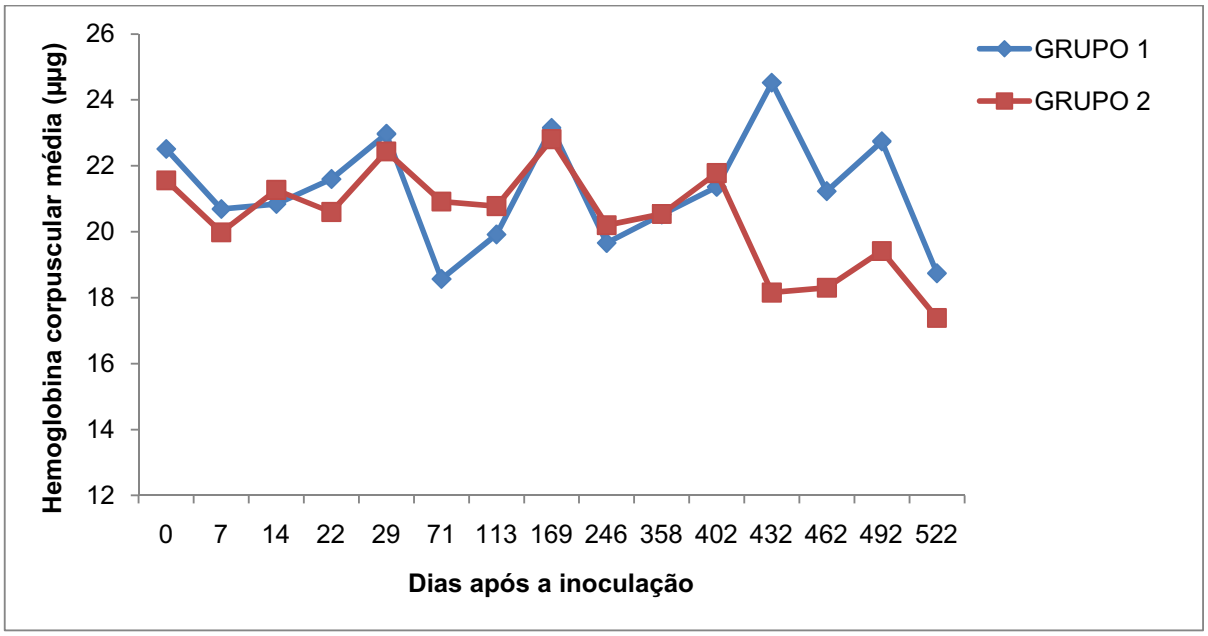

Figura 9. Médias da hemoglobina corpuscular média (µµg), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

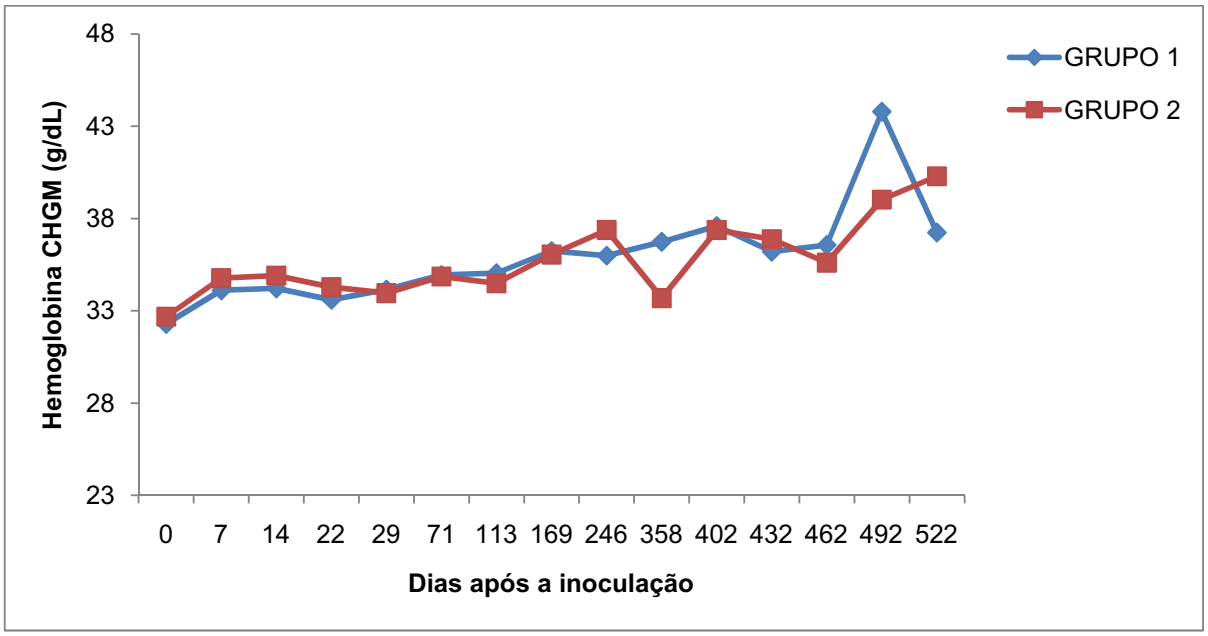

Figura 10. Médias da concentração de hemoglobina corpuscular media (g / dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

Tabela 4. Médias e significâncias do teste t das contagens de leucócitos (x10^3/µL, linfócitos (µL), basófios (µL) e eosinófilos (µL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Leucócitos			Linfocitos			Basófilo			Eosinófilo		
	Médias			Médias			Médias			Médias		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	7,42	8,67	0,3310 ns	5451,60	6251,67	0,4880 ns	0,00	0,00	-	306,60	539,67	0,1721 ns
1	6,28	7,70	0,1450 ns	4999,80	6048,33	0,1986 ns	0,00	0,00	-	73,60	154,00	0,2396 ns
2	6,20	8,50	0,1403 ns	4610,80	5941,33	0,1796 ns	0,00	0,00	-	101,60	347,33	0,0060**
3	6,88	9,00	0,2253 ns	5469,40	7145,67	0,2514 ns	0,00	0,00	-	13,20	124,67	0,0021**
4	8,06	9,40	0,3716 ns	6600,80	7788,00	0,4260 ns	0,00	0,00	-	129,20	97,00	0,7693 ns
5	9,56	12,23	0,1180 ns	7440,80	8321,67	0,4575 ns	0,00	0,00	-	243,40	274,67	0,7487 ns
6	9,34	11,53	0,1172 ns	7111,80	8244,33	0,1553 ns	0,00	0,00	-	247,00	215,00	0,8031 ns
7	8,16	9,57	0,3059 ns	5960,20	6022,00	0,9452 ns	0,00	0,00	-	236,60	195,00	0,8168 ns
8	9,94	11,67	0,0996 ns	8002,80	9405,00	0,0338*	0,00	0,00	-	94,80	116,00	0,7916 ns
9	7,12	8,20	0,1005 ns	5358,80	7074,00	0,0039**	0,00	0,00	-	220,40	86,33	0,1698 ns
10	11,32	9,90	0,1855 ns	8670,00	7860,00	0,2355 ns	0,00	0,00	-	97,60	167,00	0,3500 ns
11	6,18	8,07	0,0418 ns	4760,20	5721,00	0,0801 ns	0,00	0,00	-	59,20	112,33	0,4753 ns
12	8,76	10,57	0,1616 ns	6091,80	7656,00	0,1322 ns	0,00	0,00	-	40,40	221,00	0,0883 ns
13	8,30	11,70	0,0875 ns	5945,40	7763,00	0,0750 ns	0,00	0,00	-	104,40	204,33	0,4680 ns
14	6,50	7,87	0,3706 ns	4438,40	4838,33	0,5230 ns	0,00	0,00	-	78,20	199,67	0,1599 ns
15	7,46	10,37	0,0429 ns	5445,80	6761,00	0,0470*	0,00	0,00	-	26,80	108,00	0,1960 ns
22	8,48	10,17	0,0926 ns	6636,40	7467,00	0,3094 ns	0,00	0,00	-	118,80	305,00	0,0187*
29	8,44	9,90	0,1866 ns	6365,80	6485,00	0,9114 ns	0,00	0,00	-	0,00	200,00	0,0058**
36	8,16	9,13	0,5152 ns	6252,60	6977,33	0,5573 ns	0,00	0,00	-	131,60	157,67	0,8338 ns
43	11,88	12,33	0,7861 ns	8448,40	8855,67	0,7934 ns	31,00	0,00	0,4816 ns	102,80	361,33	0,0939 ns
50	7,98	9,87	0,2343 ns	5721,00	7072,67	0,3076 ns	0,00	0,00	-	267,20	390,33	0,4835 ns
57	8,22	9,03	0,5578 ns	6468,00	7007,00	0,6813 ns	0,00	0,00	-	162,00	242,33	0,6749 ns
64	6,68	7,67	0,3964 ns	5215,20	5779,33	0,5092 ns	0,00	0,00	-	91,80	362,33	0,0726 ns
71	6,44	8,40	0,0666 ns	4906,00	6070,00	0,2022 ns	0,00	0,00	-	126,20	153,00	0,8200 ns
78	7,56	7,87	0,7935 ns	5272,40	5341,33	0,9498 ns	0,00	0,00	-	128,20	208,00	0,4304 ns
85	8,00	9,47	0,1636 ns	5675,20	6470,33	0,3275 ns	31,40	0,00	0,2785 ns	53,00	252,67	0,1550 ns
92	7,36	8,47	0,4179 ns	5307,20	5837,67	0,5357 ns	0,00	0,00	-	156,60	428,67	0,1859 ns
99	6,96	9,10	0,2562 ns	5184,60	5799,00	0,6607 ns	0,00	0,00	-	124,80	481,00	0,2598 ns
106	5,94	7,43	0,3831 ns	4454,80	4849,33	0,7531 ns	0,00	0,00	-	40,20	181,00	0,0421*
113	7,16	9,10	0,1792 ns	5325,00	6710,67	0,1132 ns	12,00	0,00	0,4816 ns	115,20	278,33	0,1600 ns
120	6,20	7,20	0,3829 ns	4858,40	5480,00	0,4806 ns	0,00	0,00	-	100,60	212,67	0,1156 ns
127	7,24	8,70	0,2858 ns	5627,00	5617,67	0,9923 ns	0,00	33,33	0,2199 ns	74,80	274,00	0,2334 ns
134	5,84	7,13	0,1695 ns	4354,60	5562,67	0,0473*	11,20	0,00	0,4816 ns	28,00	359,67	0,1358 ns

Continua...

Continuação

141	7,06	9,00	0,1966 ns	5015,60	6451,33	0,1468 ns	0,00	0,00	-	61,60	223,67	0,0757 ns
148	7,74	8,50	0,5493 ns	5473,80	5982,00	0,4840 ns	0,00	0,00	-	156,20	335,33	0,0661 ns
155	8,24	9,57	0,3970 ns	6036,20	6657,00	0,5058 ns	0,00	0,00	-	59,40	324,33	0,0179
162	7,86	9,30	0,3171 ns	5674,20	6228,67	0,5382 ns	0,00	0,00	-	127,40	432,33	0,1259 ns
169	5,36	7,30	0,1147 ns	4169,60	5720,00	0,1562 ns	0,00	0,00	-	19,60	141,33	0,0676 ns
176	6,28	7,10	0,4228 ns	4828,20	4799,00	0,9689 ns	0,00	0,00	-	75,40	90,33	0,8656 ns
183	6,40	6,90	0,7248 ns	4791,20	4556,67	0,8663 ns	0,00	0,00	-	230,80	95,33	0,4710 ns
190	6,32	7,10	0,5871 ns	4816,20	4739,00	0,9509 ns	0,00	0,00	-	209,80	120,00	0,5373 ns
197	7,34	8,07	0,6861 ns	6285,60	6574,67	0,8218 ns	0,00	0,00	-	96,40	169,00	0,5776 ns
204	7,80	8,67	0,5691 ns	4843,20	3706,67	0,2518 ns	0,00	0,00	-	84,80	155,67	0,5804v
218	6,90	8,23	0,2896 ns	4396,20	5143,33	0,2022 ns	0,00	0,00	-	119,60	132,00	0,9014 ns
232	6,86	10,30	0,0701 ns	4764,72	6277,67	0,2892 ns	0,00	0,00	-	191,40	754,00	0,0919 ns
246	4,98	6,77	0,1509 ns	3308,40	4632,33	0,0995 ns	0,00	0,00	-	73,60	156,00	0,5493 ns
260	4,58	9,57	0,0009**	3057,60	6657,00	0,0006**	0,00	0,00	-	92,80	324,33	0,0997 ns
274	7,34	9,30	0,1758 ns	5181,40	6228,67	0,3616 ns	0,00	0,00	-	240,20	432,33	0,4543 ns
288	7,24	7,30	0,9592 ns	4711,00	5720,00	0,2916 ns	0,00	0,00	-	562,60	141,33	0,0157*
302	10,24	7,10	0,0453 ns	5782,80	4799,00	0,2826 ns	0,00	0,00	-	128,60	90,33	0,5967 ns
316	7,54	6,90	0,6877 ns	5204,40	4556,67	0,5184 ns	0,00	0,00	-	244,00	95,33	0,0922 ns
330	9,54	8,07	0,4286 ns	5740,20	6574,67	0,3512 ns	0,00	0,00	-	179,60	169,00	0,9587 ns
344	9,36	8,67	0,6984 ns	6705,20	3706,67	0,0858 ns	0,00	0,00	-	423,60	155,67	0,3409 ns
358	9,66	8,23	0,4096 ns	6490,40	5143,33	0,2562 ns	0,00	0,00	-	129,80	132,00	0,9839 ns
372	8,18	10,30	0,2003 ns	5676,60	6277,67	0,5227 ns	0,00	0,00	-	332,20	754,00	0,2965 ns
402	9,22	6,77	0,0322 ns	6773,80	4632,33	0,0565 ns	0,00	0,00	-	159,60	156,00	0,9794 ns
432	7,82	7,17	0,5701 ns	5361,00	5457,33	0,9122 ns	37,20	0,00	0,2666 ns	250,80	146,67	0,5288 ns
462	8,04	8,50	0,6529 ns	5083,40	5159,43	0,9242 ns	0,00	0,00	-	305,20	356,93	0,6665 ns
492	7,62	7,60	0,9780 ns	4746,80	5237,33	0,3808 ns	0,00	0,00	-	250,60	298,00	0,7533 ns
522	9,80	9,77	0,9873 ns	6291,20	6242,33	0,9690 ns	0,00	0,00	-	162,60	160,33	0,9874 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

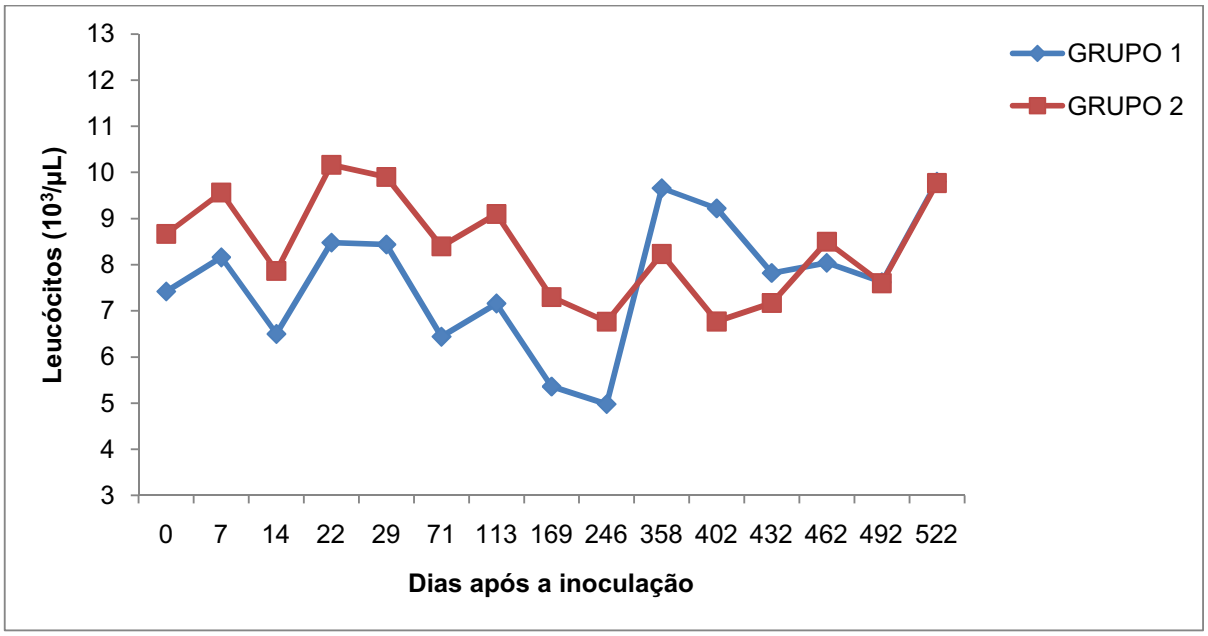

Figura 11. Médias da contagem de leucócitos (x10^3/µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

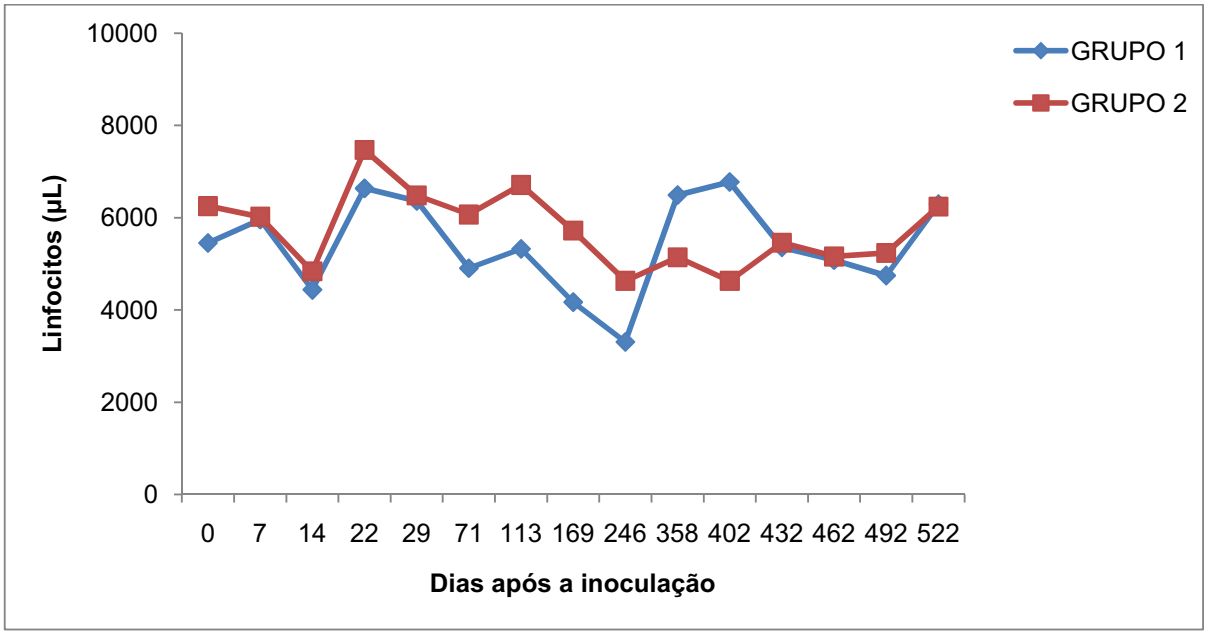

Figura 12. Médias da contagem de linfócitos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

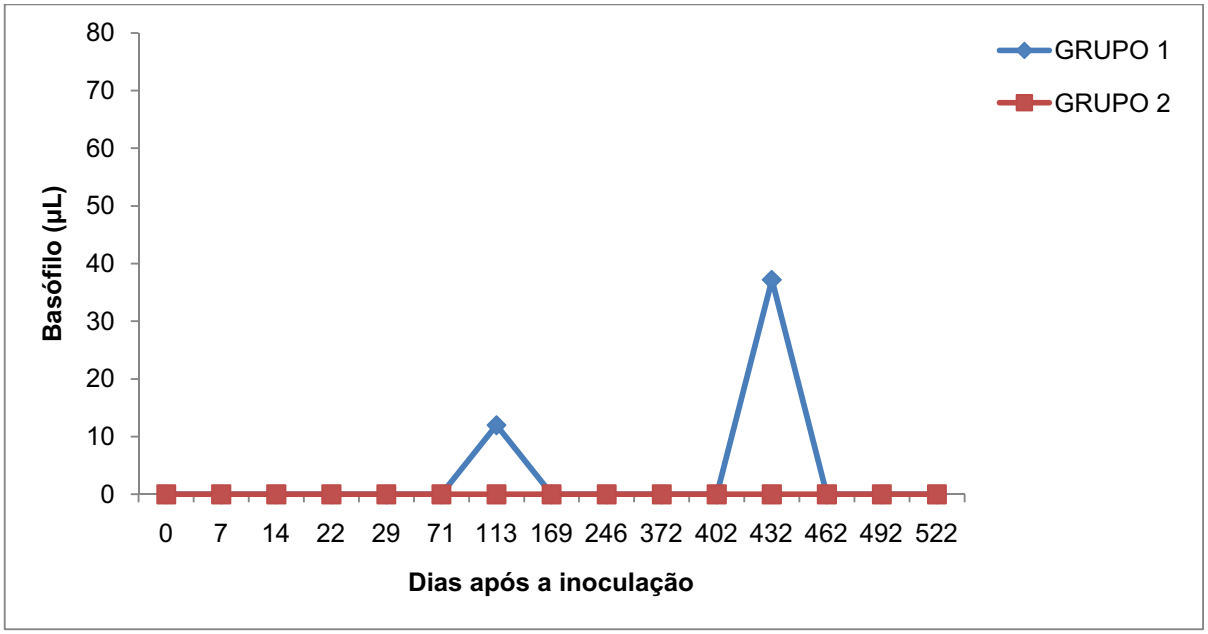

Figura 13. Médias da contagem de basófilos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

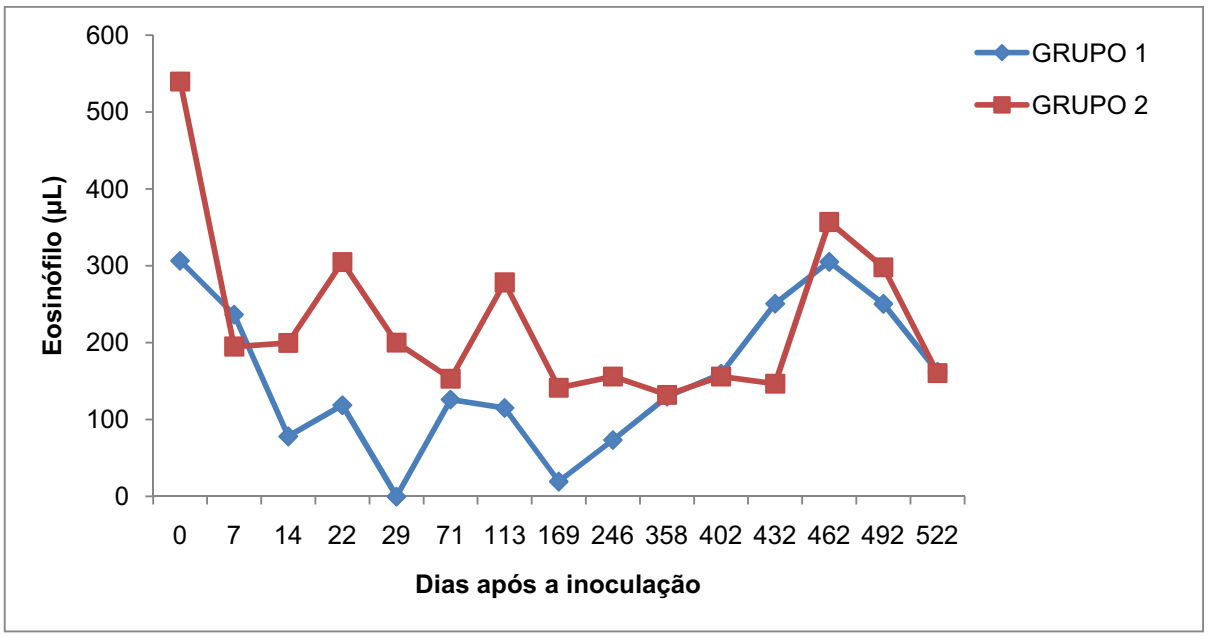

Figura 14. Médias da contagem de eosinófilos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

Tabela 5. Médias e significâncias do teste t das contagens de monócitos (µL), neutrófilos segmentados (µL) e neutrofilos bastonetes (µL), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

	Monócito			Neutrófilos segmentados			Neutrófilos bastonetes		
	Média		Teste t	Média		Teste t	Média		Teste t
	G1	G2		G1	G2		G1	G2	
0	67,20	32,33	0,3402 ns	1594,60	1843,00	0,3760 ns	0,00	0,00	-
1	52,40	28,67	0,6439 ns	1154,20	1469,00	0,3356 ns	0,00	0,00	-
2	15,00	21,33	0,8111 ns	1437,60	2168,67	0,2591 ns	35,00	21,33	0,6097 ns
3	12,20	0,00	0,4816 ns	1385,20	1729,67	0,3693 ns	0,00	0,00	-
4	0,00	0,00	-	1330,00	1515,00	0,6352 ns	0,00	0,00	-
5	60,40	46,67	0,7842 ns	1815,40	3590,33	0,0080**	0,00	0,00	-
6	93,40	146,67	0,0234 ns	1887,80	2927,33	0,0881 ns	0,00	0,00	-
7	38,60	84,67	0,3711 ns	1924,60	3265,00	0,0498*	0,00	0,00	-
8	0,00	32,67	0,2199 ns	1767,40	2005,33	0,7652 ns	75,00	107,67	0,6140 ns
9	27,80	82,00	0,0561 ns	1484,60	957,67	0,2345 ns	13,80	0,00	0,4816 ns
10	0,00	71,33	0,2199 ns	2552,40	1766,00	0,1723 ns	0,00	35,67	0,2199 ns
11	14,00	29,00	0,6143 ns	1346,60	2204,33	0,0729 ns	0,00	0,00	-
12	31,60	32,00	0,9913 ns	2256,20	2212,00	0,9606 ns	0,00	32,33	0,2199 ns
13	0,00	43,33	0,2199 ns	2250,20	3615,67	0,1825 ns	0,00	42,67	0,2196 ns
14	10,80	57,67	0,1211 ns	1972,60	2746,00	0,4457 ns	0,00	0,00	-
15	13,40	74,33	0,1125 ns	1974,00	3394,00	0,0848 ns	0,00	29,33	0,2198 ns
22	37,20	36,67	0,9900 ns	1576,40	2291,00	0,4124 ns	111,20	67,00	0,5825 ns
29	49,00	195,00	0,1082 ns	1957,60	2790,00	0,4022 ns	67,60	230,00	0,1138 ns
36	34,00	0,00	0,4816 ns	1668,60	1788,00	0,8322 ns	73,20	210,33	0,0937 ns
43	54,00	87,33	0,7408 ns	3163,20	2869,67	0,7017 ns	80,60	159,33	0,3248 ns
50	0,00	0,00	-	1914,60	2365,33	0,4530 ns	77,20	38,33	0,5867 ns
57	14,40	33,33	0,5638 ns	1528,80	1662,33	0,6723 ns	46,80	88,33	0,5951 ns
64	11,80	27,67	0,5583 ns	1323,40	1364,33	0,9211 ns	37,80	133,00	0,2632 ns
71	47,20	26,33	0,4362 ns	1320,60	2150,67	0,0251*	40,00	0,00	0,1320 ns
78	116,40	0,00	0,1883 ns	2043,00	2317,33	0,6284 ns	0,00	0,00	-
85	34,40	33,33	0,9783 ns	2160,40	2677,00	0,3892 ns	45,60	33,33	0,7404 ns
92	57,60	27,33	0,5770 ns	1838,60	2148,67	0,6104 ns	0,00	24,33	0,2199 ns
99	33,20	81,33	0,3119 ns	1617,40	2738,67	0,0454 ns	0,00	0,00	-
106	33,80	21,67	0,7282 ns	1411,20	2381,33	0,1063 ns	0,00	0,00	-
113	0,00	0,00	-	1647,40	2086,67	0,6287 ns	60,40	24,33	0,4107 ns
120	37,40	43,00	0,8765 ns	1203,60	1464,33	0,4468 ns	0,00	0,00	-
127	20,40	0,00	0,4816 ns	1396,00	2683,67	0,0414 ns	101,40	91,33	0,8831 ns
134	46,80	69,67	0,6907 ns	1319,00	1141,33	0,6072 ns	80,40	0,00	0,1824 ns
141	0,00	36,33	0,2199 ns	1963,20	2252,33	0,6474 ns	19,60	36,33	0,6690 ns
148	60,60	90,33	0,5836 ns	2049,40	2092,33	0,9347 ns	0,00	0,00	-
155	70,60	0,00	0,0356 ns	2073,80	2585,33	0,4871 ns	0,00	0,00	-
162	34,60	36,67	0,9604 ns	2023,80	2602,33	0,3479 ns	0,00	0,00	-
169	34,00	0,00	0,1293 ns	1136,80	1419,33	0,4018 ns	0,00	19,33	0,2199 ns
176	0,00	23,67	0,2199 ns	1350,60	2210,67	0,3456 ns	16,20	0,00	0,4816 ns
183	10,60	21,33	0,6281 ns	1313,00	2226,67	0,1170 ns	54,40	0,00	0,1445 ns
190	0,00	0,00	-	1182,00	1929,67	0,1480 ns	0,00	0,00	-
197	21,80	0,00	0,4816 ns	903,60	1275,00	0,4992 ns	32,60	48,00	0,6475 ns
204	11,60	0,00	0,4816 ns	2778,40	4672,33	0,2379 ns	82,00	132,00	0,7194 ns
218	11,60	0,00	0,4816 ns	2361,00	2958,00	0,4814 ns	11,60	0,00	0,4816 ns
232	33,24	41,33	0,8517 ns	1789,00	3053,33	0,3340 ns	85,64	173,67	0,2518 ns

Continua...

Continuação

246	19,20	22,33	0,9211 ns	1290,00	1933,67	0,4100 ns	84,80	22,33	0,3084 ns
260	30,80	0,00	0,1167 ns	1398,80	2585,33	0,0213 ns	0,00	0,00	-
274	25,40	36,67	0,7562 ns	1783,00	2602,33	0,2748 ns	110,00	0,00	0,1230 ns
288	59,80	0,00	0,0294*	1906,60	1419,33	0,3572 ns	0,00	19,33	0,2199 ns
302	25,80	23,67	0,9576 ns	4242,40	2210,67	0,2784 ns	60,40	0,00	0,1324 ns
316	0,00	21,33	0,2199 ns	2091,60	2226,67	0,8512 ns	0,00	0,00	-
330	65,20	0,00	0,1260 ns	3555,00	1275,00	0,0850 ns	0,00	48,00	0,0341 ns
344	21,20	0,00	0,4816 ns	2174,40	4672,33	0,0723 ns	35,60	132,00	0,3801 ns
358	10,80	0,00	0,4816 ns	3007,80	2958,00	0,9448 ns	21,20	0,00	0,4816 ns
372	0,00	41,33	0,2199 ns	3266,60	3053,33	0,8620 ns	0,00	173,67	0,0016**
402	91,80	22,33	0,1112 ns	2179,40	1933,67	0,5917 ns	15,40	22,33	0,8003 ns
432	67,20	23,67	0,3374 ns	2103,80	2131,67	0,9558 ns	37,20	0,00	0,2666 ns
462	83,20	64,67	0,7624 ns	2651,60	3039,40	0,5299 ns	0,00	0,00	-
492	32,40	29,33	0,9312 ns	1798,40	1826,00	0,9602 ns	77,00	23,33	0,4285 ns
522	83,60	97,67	0,6871 ns	2444,20	2774,33	0,6540 ns	0,00	0,00	-

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

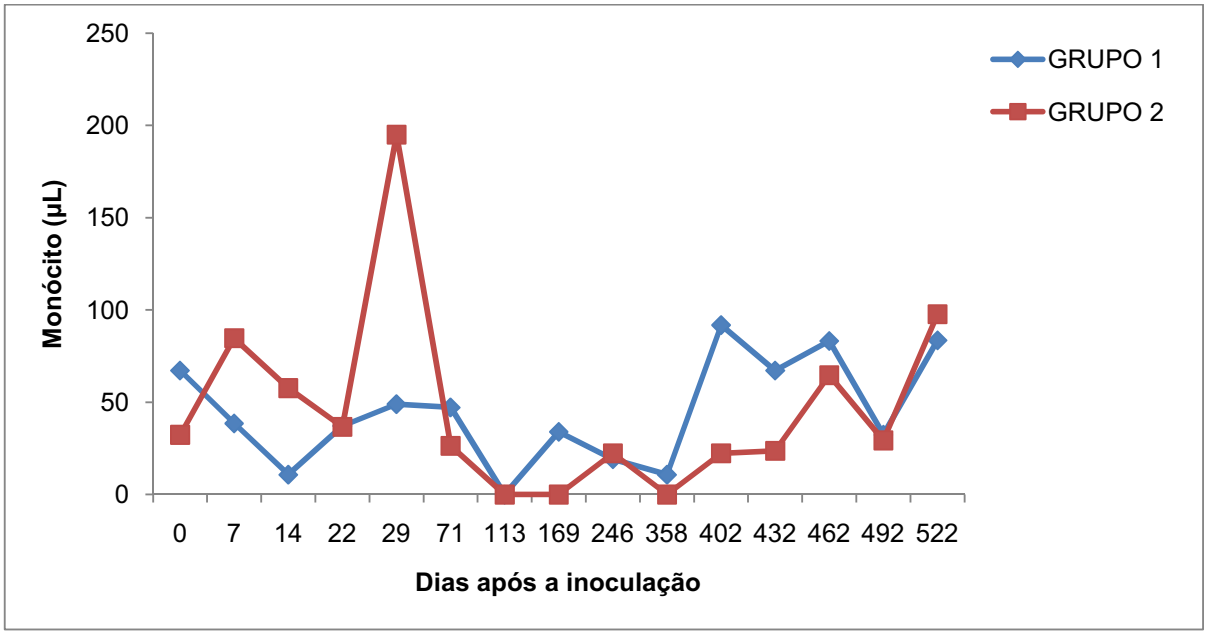

Figura 15. Médias da contagem de monócitos (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

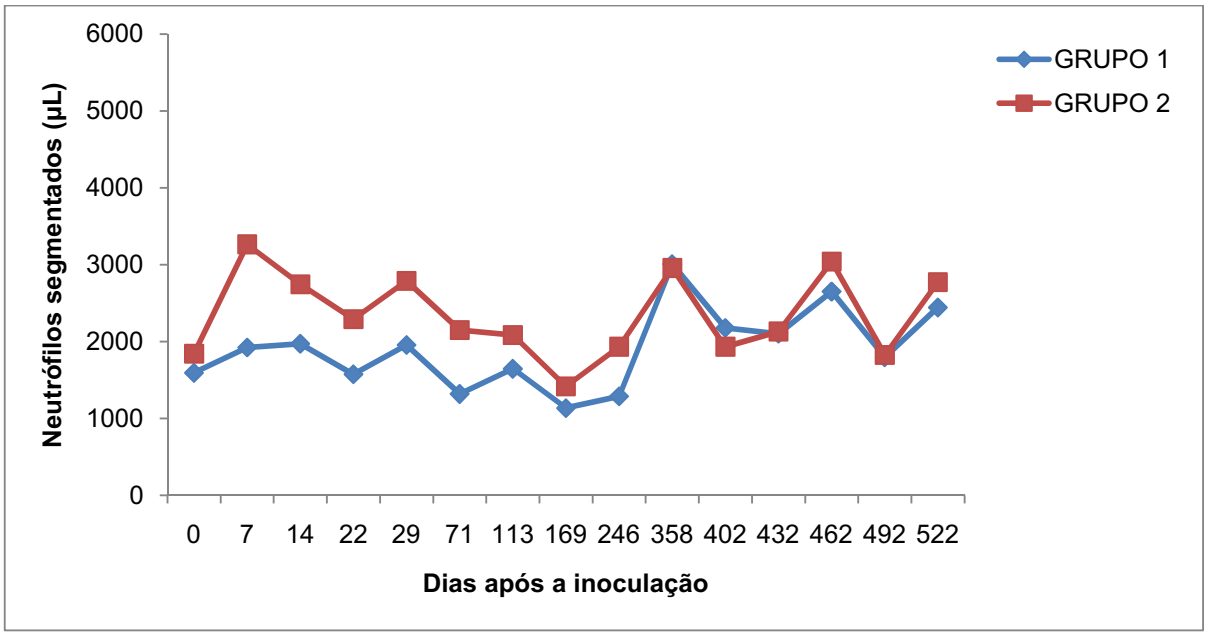

Figura 16. Médias da contagem de neutrófilos segmentados (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

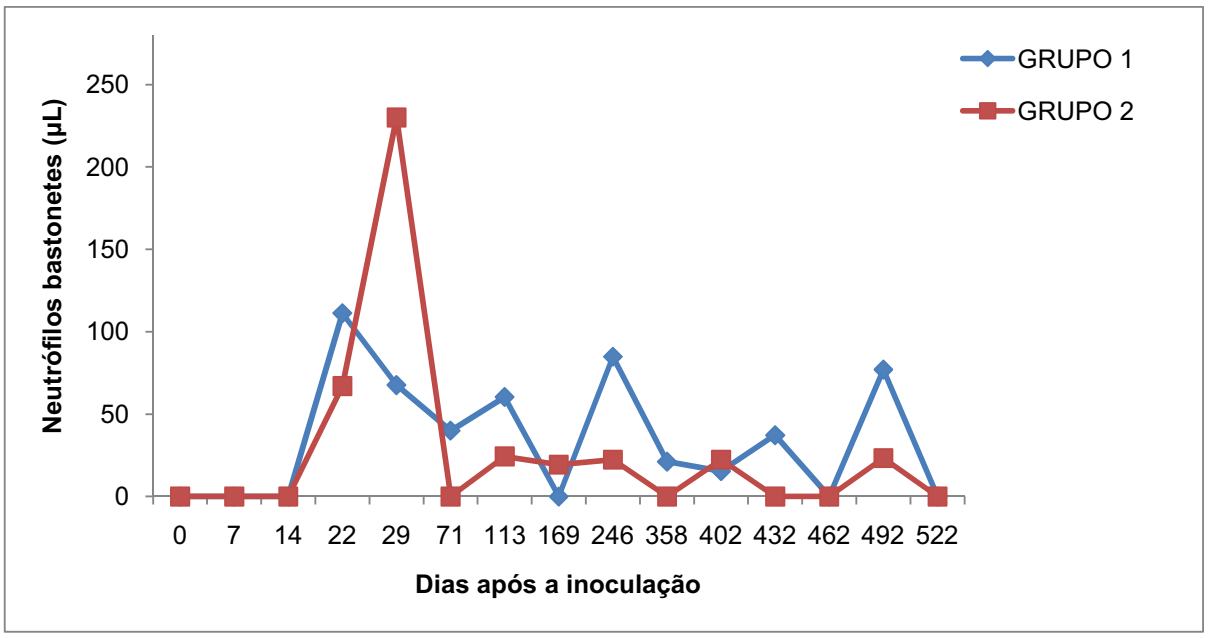

Figura 17. Médias da contagem de neutrófilos bastonetes (µL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

4.4.3. Análises bioquímicas

Os resultados médios e níveis de significância dos exames bioquímicos do soro sanguíneo/plasma encontram-se nas Tabelas 6 e 7 e Figuras 18 a 22.

Os níveis séricos de proteína total apresentaram aumentos significativos no 260°, 274°, 344°, 358° e 372° DAI, coincidentes com o aumento dos teores de globulinas.

Os teores plasmáticos de glicose, revelaram aumento e redução significativas no 113° DAI e 344° DAI, respectivamente.

Na Tabela 7 observa-se que o índice ictérico foi significativamente mais elevado no 372° DAI no grupo de bovinos inoculados com *T. evansi*.

Tabela 6. Médias e significâncias do teste t dos níveis séricos de proteína total (g / dL), albumina (g / dL) e globulinas (g/dL) em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Proteína total			Albumina			Globulinas		
	Médias		Teste T	Médias		Teste T	Médias		Teste T
	G1	G2		G1	G2		G1	G2	
0	6,96	6,82	0,6214 ns	2,16	2,14	0,8802 ns	4,81	4,68	0,6545 ns
1	6,93	7,02	0,7520 ns	2,42	2,51	0,6902 ns	4,50	4,51	0,9760 ns
2	6,73	6,71	0,9074 ns	2,31	2,30	0,9309 ns	4,42	4,41	0,9545 ns
3	6,59	6,57	0,9259 ns	2,32	2,21	0,3984 ns	4,28	4,36	0,7445 ns
4	6,55	6,66	0,7335 ns	2,29	2,29	0,9823 ns	4,26	4,37	0,7277 ns
5	6,81	6,80	0,9619 ns	2,30	2,31	0,8930 ns	4,51	4,48	0,9330 ns
6	6,71	6,71	0,9908 ns	2,27	2,24	0,8151 ns	4,44	4,47	0,9325 ns
7	6,55	6,45	0,7014 ns	2,37	2,18	0,3432 ns	4,18	4,27	0,7972 ns
8	6,90	6,89	0,9723 ns	2,25	2,15	0,5166 ns	4,64	4,74	0,7003 ns
9	6,75	6,24	0,1559 ns	2,32	2,30	0,8529 ns	4,42	3,95	0,1880 ns
10	7,03	6,94	0,8098 ns	2,30	2,14	0,1998 ns	4,73	4,80	0,8803 ns
11	6,67	6,78	0,7626 ns	2,20	2,09	0,3970 ns	4,47	4,69	0,5373 ns
12	6,68	6,63	0,8637 ns	2,06	1,95	0,4382 ns	4,62	4,68	0,7998 ns
13	6,48	6,75	0,5156 ns	2,07	2,02	0,6312 ns	4,41	4,72	0,3986 ns
14	6,61	6,79	0,5606 ns	2,18	2,08	0,5305 ns	4,43	4,71	0,3194 ns
15	6,78	7,20	0,3414 ns	2,20	2,26	0,6789 ns	4,58	4,93	0,4274 ns
22	6,66	6,81	0,5050 ns	2,20	2,16	0,8386 ns	4,47	4,65	0,5502 ns
29	6,84	6,69	0,5639 ns	2,13	1,97	0,2749 ns	4,71	4,72	0,9708 ns
36	7,07	6,78	0,3670 ns	2,34	2,25	0,4659 ns	4,73	4,53	0,5933 ns
43	6,84	6,62	0,4657 ns	2,44	2,36	0,6087 ns	4,40	4,26	0,6346 ns
50	6,80	6,83	0,9213 ns	2,30	2,31	0,9893 ns	4,50	4,53	0,9139 ns
57	7,02	7,00	0,9610 ns	2,21	2,25	0,7546 ns	4,80	4,75	0,8679 ns
64	6,76	6,81	0,8455 ns	2,27	2,36	0,5458 ns	4,49	4,45	0,8634 ns
71	7,75	7,33	0,2499 ns	2,70	2,74	0,7508 ns	5,05	4,59	0,2389 ns
78	6,74	6,82	0,7544 ns	2,38	2,49	0,4736 ns	4,36	4,34	0,9252 ns
85	6,88	6,98	0,7521 ns	2,41	2,54	0,4529 ns	4,47	4,44	0,9335 ns
92	7,13	7,17	0,8745 ns	2,58	2,64	0,4656 ns	4,55	4,53	0,9592 ns
99	7,19	7,19	0,9984 ns	2,61	2,60	0,9815 ns	4,59	4,59	0,9950 ns
106	7,35	7,46	0,7637 ns	2,75	2,75	1,0000 ns	4,60	4,71	0,7372 ns
113	7,36	7,24	0,7333 ns	2,73	2,76	0,7780 ns	4,63	4,48	0,6649 ns
120	7,51	7,50	0,9803 ns	2,84	2,79	0,6472 ns	4,67	4,70	0,9176 ns
127	7,45	7,23	0,6312 ns	2,87	2,83	0,7951 ns	4,58	4,40	0,6228 ns
134	7,29	7,33	0,8869 ns	2,66	2,76	0,3593 ns	4,63	4,57	0,8459 ns
141	7,34	7,06	0,4577 ns	2,64	2,67	0,7950 ns	4,70	4,39	0,4227 ns
148	6,99	7,05	0,8776 ns	2,75	2,85	0,4056 ns	4,24	4,21	0,9334 ns
155	7,02	6,95	0,7959 ns	2,77	2,87	0,5574 ns	4,25	4,08	0,5664 ns
162	7,09	7,07	0,9464 ns	2,90	2,98	0,5893 ns	4,20	4,10	0,7277 ns
169	6,91	7,01	0,7094 ns	2,72	2,80	0,5514 ns	4,19	4,21	0,9385 ns
176	7,06	7,17	0,6652 ns	3,13	3,18	0,8357 ns	3,94	3,99	0,8548 ns
183	6,59	6,72	0,6846 ns	2,89	2,92	0,8446 ns	3,70	3,80	0,7351 ns
190	6,67	6,71	0,8942 ns	2,82	2,85	0,8698 ns	3,64	3,74	0,7343 ns
197	6,85	6,83	0,9383 ns	2,82	2,76	0,6552 ns	4,03	4,07	0,8747 ns
204	7,23	7,12	0,7963 ns	2,87	2,86	0,9143 ns	4,36	4,26	0,8237 ns
218	7,00	6,69	0,3979 ns	2,68	2,73	0,7773 ns	4,31	3,96	0,3272 ns
232	7,18	6,69	0,2223 ns	2,68	2,83	0,5609 ns	4,50	3,86	0,2342 ns
246	7,52	6,98	0,2477 ns	2,78	2,86	0,5695 ns	4,74	4,12	0,1885 ns
260	7,73	6,95	0,0151*	2,82	2,87	0,7955 ns	4,92	4,08	0,0050*
274	8,06	7,07	0,0245 *	2,84	2,98	0,3193 ns	5,22	4,10	0,0060**
288	7,66	7,01	0,0777 ns	2,61	2,80	0,1901 ns	5,05	4,21	0,0287*

Continua...

Continuação

302	7,70	7,17	0,1096 ns	2,99	3,18	0,4760 ns	4,71	3,99	0,0933 ns
316	7,56	6,72	0,3039 ns	2,90	2,92	0,8274 ns	4,66	3,80	0,3009 ns
330	7,52	6,83	0,0400 ns	2,80	2,76	0,8280 ns	4,73	4,07	0,0585 ns
344	7,87	7,12	0,0391*	3,04	2,86	0,3706 ns	4,83	4,26	0,0396 ns
358	7,46	6,69	0,0197*	2,97	2,73	0,1229 ns	4,49	3,96	0,0734 ns
372	8,06	6,69	0,0247*	2,90	2,83	0,6571 ns	5,15	3,86	0,0222*
402	7,61	6,98	0,1272 ns	2,90	2,86	0,8114 ns	4,71	4,12	0,1504 ns
432	7,41	7,17	0,2744 ns	2,82	2,77	0,8324 ns	4,59	4,40	0,6633 ns
462	7,45	6,78	0,0530 ns	3,02	2,56	0,0129 ns	4,43	4,21	0,5099 ns
492	7,02	7,00	0,9610 ns	2,34	2,44	0,6444 ns	4,67	4,56	0,7772 ns
522	8,15	7,56	0,1514 ns	2,78	2,85	0,6327 ns	5,37	4,71	0,1100 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

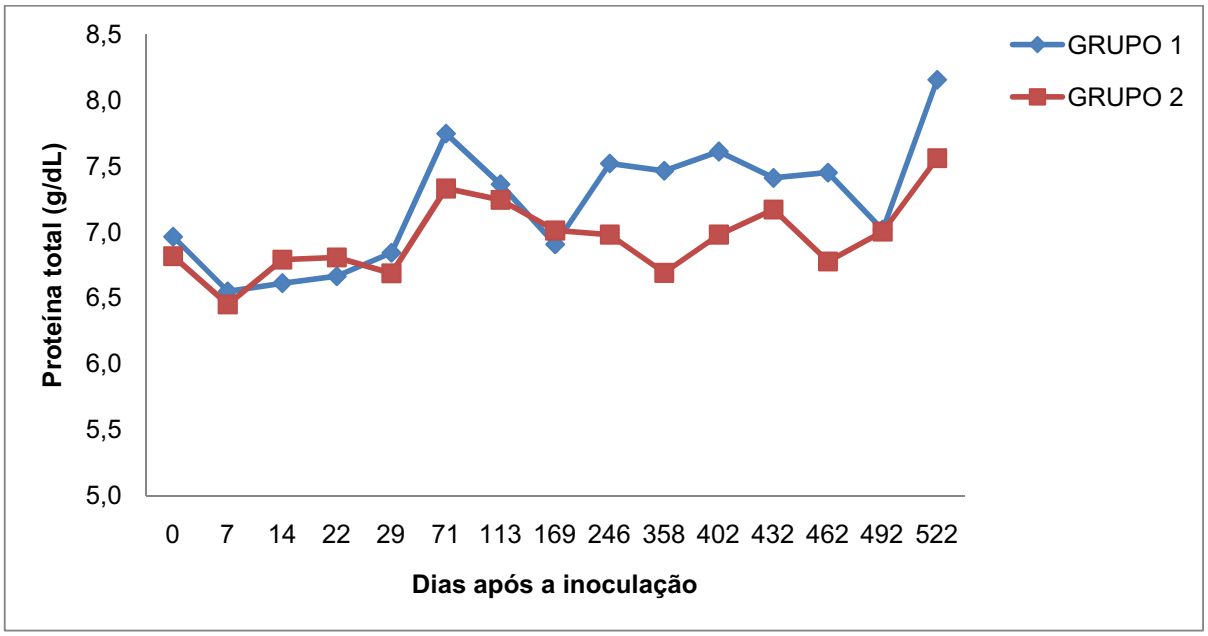

Figura 18. Médias dos teores séricos da proteína total (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animias do grupo testemunho (G2).

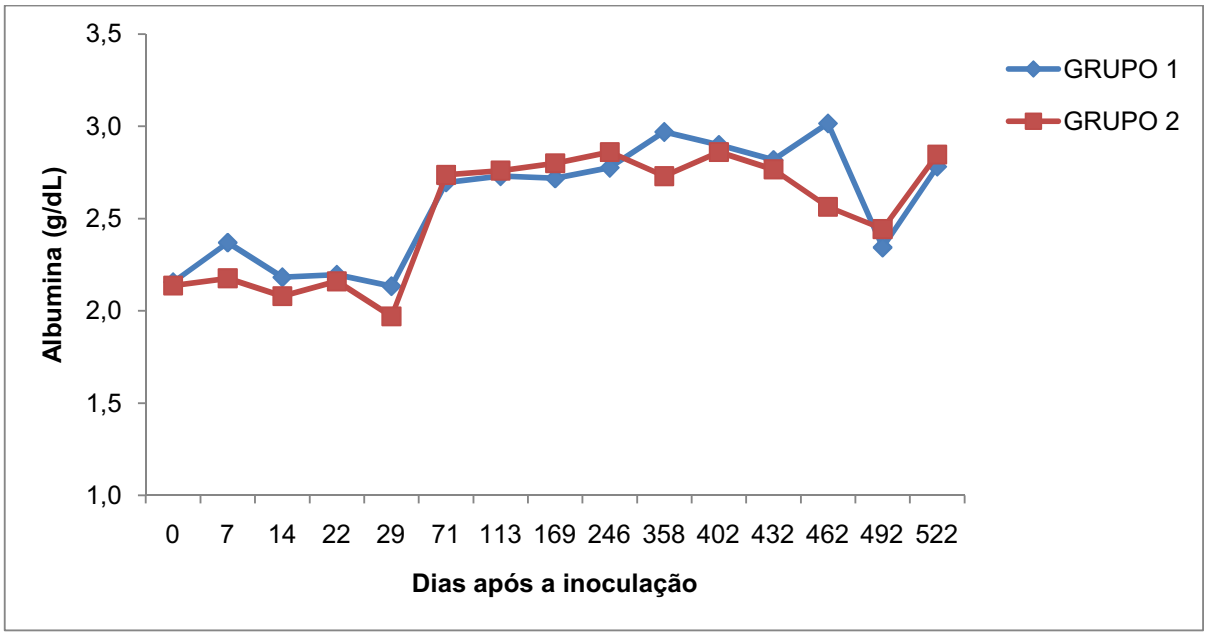

Figura 19. Médias dos teores séricos da albumina (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

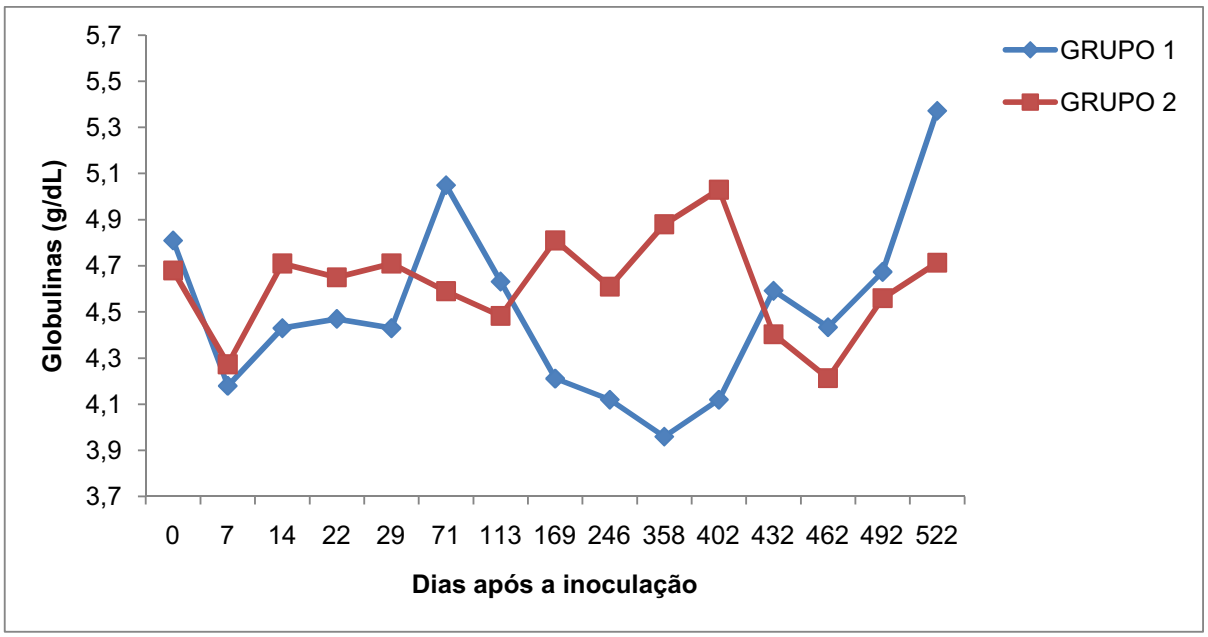

Figura 20. Médias dos teores séricos de globulinas (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e nos do grupo testemunho (G2).

Tabela 7. Médias e significâncias do teste t dos níveis séricos de glicose (g / dL) e índice ictérico (unidades), em bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

	Glicose			Índice ictérico		
	Médias			Médias		
DAI	G1	G2	Teste T	G1	G2	Teste T
0	88,70	68,55	0,3931 ns	5,01	5,57	0,5240 ns
1	95,36	90,00	0,7316 ns	4,86	7,24	0,1105 ns
2	87,09	71,47	0,1761 ns	7,67	5,37	0,0753 ns
3	79,74	70,47	0,1764 ns	4,69	5,58	0,4752 ns
4	76,98	66,74	0,1092 ns	5,90	4,50	0,3449 ns
5	76,75	69,70	0,2267 ns	6,30	6,94	0,4497 ns
6	76,75	67,79	0,0891 ns	7,37	7,70	0,8093 ns
7	71,00	65,10	0,1414 ns	6,74	7,63	0,2160 ns
8	75,37	70,09	0,3496 ns	7,43	8,84	0,4094 ns
9	77,21	73,53	0,5199 ns	6,53	6,63	0,9425 ns
10	75,37	70,85	0,4234 ns	10,18	8,97	0,4107 ns
11	73,07	75,83	0,6549 ns	8,29	8,72	0,8309 ns
12	80,20	75,45	0,1799 ns	5,12	5,12	0,9946 ns
13	76,98	70,47	0,2420 ns	9,47	8,97	0,8303 ns
14	81,12	76,98	0,4355 ns	8,46	9,66	0,6192 ns
15	79,28	76,21	0,4565 ns	7,65	8,20	0,6797 ns
22	76,06	72,77	0,4811 ns	9,84	11,70	0,4987 ns
29	76,52	70,85	0,1812 ns	8,42	7,98	0,7228 ns
36	80,42	77,36	0,3410 ns	10,21	8,82	0,4435 ns
43	79,74	77,74	0,5853 ns	9,36	7,55	0,4638 ns
50	77,90	73,15	0,3199 ns	8,59	7,72	0,5742 ns
57	70,18	71,74	0,5895 ns	11,95	12,70	0,6501 ns
64	71,60	73,09	0,1652 ns	8,46	8,65	0,8958 ns
71	72,42	74,80	0,2860 ns	7,38	9,17	0,2498 ns
78	68,76	71,40	0,2859 ns	8,57	7,83	0,4239 ns
85	67,73	66,98	0,7844 ns	7,81	7,64	0,8571 ns
92	63,64	62,22	0,6976 ns	8,35	9,12	0,5538 ns
99	65,69	62,90	0,3701 ns	10,28	8,34	0,2803 ns
106	65,28	53,58	0,2130 ns	7,02	6,85	0,8122 ns
113	71,40	68,00	0,0267*	7,74	7,37	0,6901 ns
120	69,76	63,24	0,0722 ns	7,00	6,48	0,6446 ns
127	63,85	63,92	0,9817 ns	7,79	7,07	0,4604 ns
134	69,36	66,98	0,5366 ns	9,30	8,73	0,7582 ns
141	68,14	66,30	0,5733 ns	8,59	7,52	0,4254 ns
148	68,15	65,96	0,4698 ns	6,92	6,75	0,7611 ns
155	62,83	67,32	0,1035 ns	7,54	7,49	0,9616 ns
162	73,99	72,58	0,2974 ns	8,86	8,09	0,6336 ns
169	69,99	68,14	0,3785 ns	8,41	7,95	0,6348 ns
176	79,77	71,48	0,0507 ns	7,76	7,75	0,9908 ns
183	67,54	67,76	0,9444 ns	7,90	8,42	0,6326 ns
190	70,83	69,73	0,7880 ns	7,95	8,83	0,2945 ns
197	79,61	67,40	0,4164 ns	8,58	9,50	0,6472 ns
204	88,21	80,36	0,4738 ns	8,64	7,44	0,3913 ns
218	75,32	73,32	0,5837 ns	8,72	8,06	0,4695 ns
232	63,77	59,62	0,2999 ns	7,93	7,12	0,4659 ns
246	74,44	64,06	0,0874 ns	8,90	10,85	0,2907 ns
260	67,54	67,32	0,9430 ns	8,93	7,49	0,0671 ns
274	75,55	72,58	0,6122 ns	7,94	8,09	0,8968 ns
288	68,65	68,14	0,8207 ns	6,78	7,95	0,1386 ns

Continua...

Continuação

302	63,84	71,48	0,0631 ns	8,38	7,75	0,7480 ns
316	71,09	67,76	0,4419 ns	7,46	8,42	0,2884 ns
330	65,25	67,40	0,5437 ns	7,55	9,50	0,1687 ns
344	62,23	80,36	0,0123*	8,33	7,44	0,3477 ns
358	71,90	73,32	0,7243 ns	8,79	8,06	0,4412 ns
372	66,01	59,62	0,1509 ns	10,88	7,12	0,0185*
402	67,06	64,06	0,3422 ns	7,98	10,85	0,1150 ns
432	66,47	62,77	0,5321 ns	8,60	8,16	0,7376 ns
462	73,71	56,05	0,2229 ns	7,17	7,45	0,6240 ns
492	88,21	80,36	0,4738 ns	7,38	9,59	0,1189 ns
522	68,67	69,43	0,8727 ns	7,67	8,66	0,2297 ns

DAI – dias após a inoculação;
NS- não significativo; * significativo a nível de 5% de probabilidade; ** significativo a nível de 1% de probabilidade.

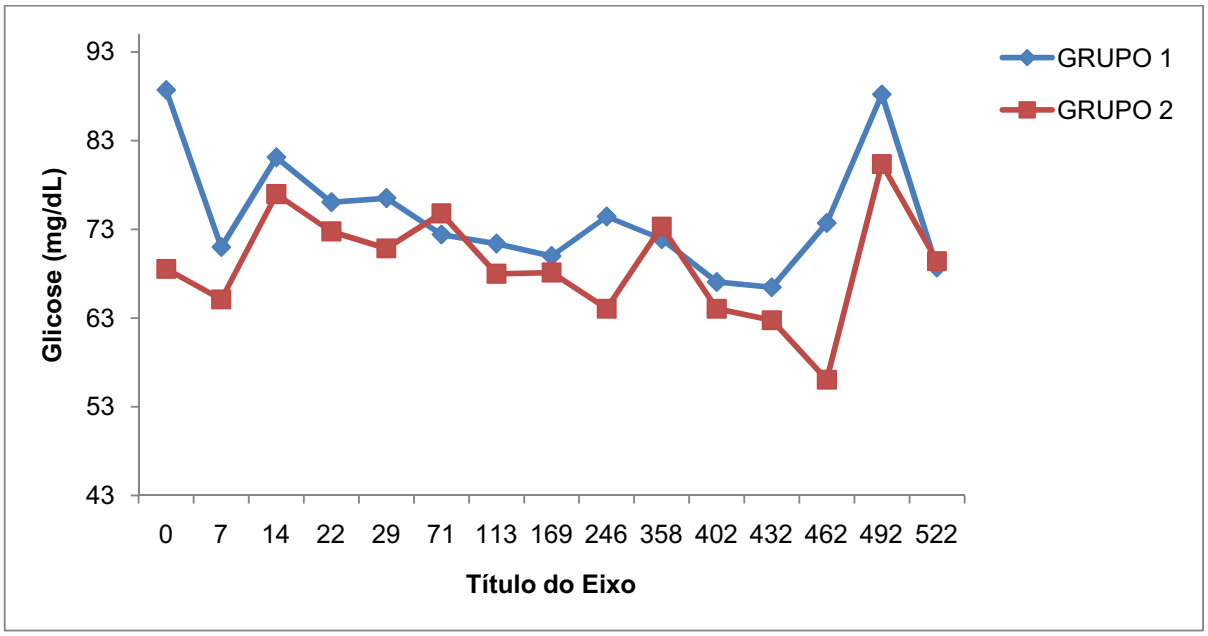

Figura 21. Médias dos teores plasmáticos de glicose (g/dL), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

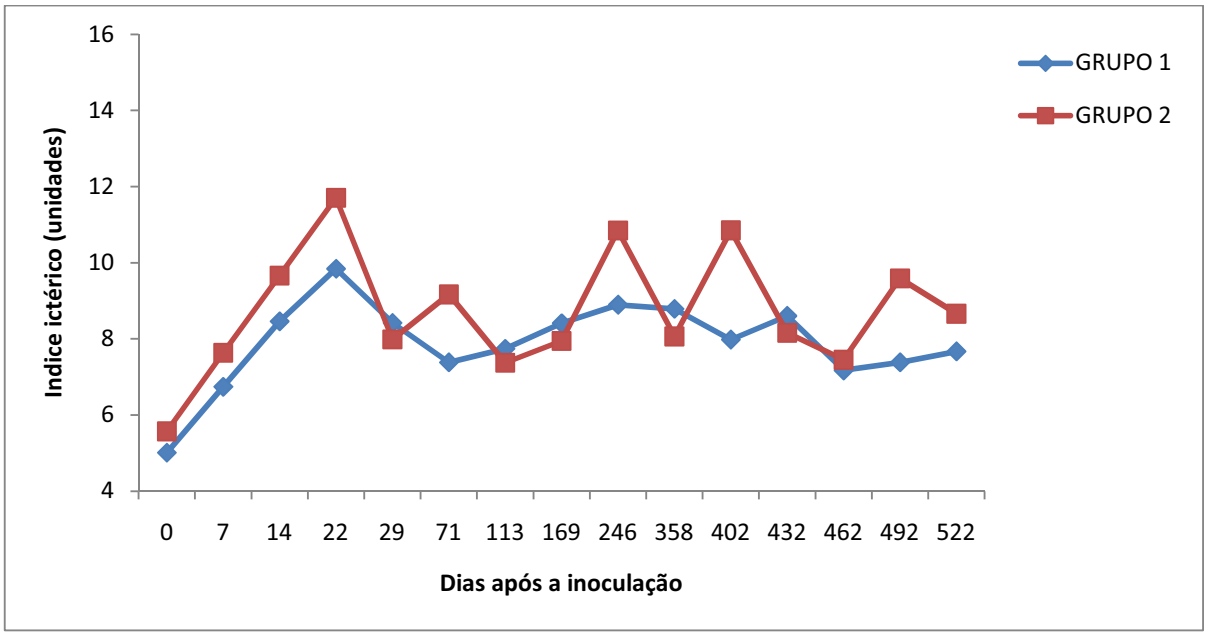

Figura 22. Médias dos valores do índice ictérico (unidades), de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e dos animais do grupo testemunho (G2).

4.4.4 Proteinograma

Foram identificadas 26 proteínas com pesos moleculáres que variaram entre 20 e 245 KD. Destas, apenas oito foram identificadas, nominalmente, sendo imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada, haptoglobina, glicoproteína ácida e imunoglobulina G (IgG) de cadeia leve.

As médias, desvio padrão e teste t, das 26 proteínas encontradas estão apresentados nas Tabelas 08 a 13 e Figuras 23 a 30, respectivamente.

Dentre as proteínas encontradas cinco são consideradas proteínas de fase aguda: ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida. A ceruloplasmina apresentou aumentos significativos no 288°, 316°, 330° e 492° DAI e redução no 274° DAI. Transferrina apresentou elevações significatiavas aos 57°, 302°, 316°, 330°DAI e redução no 288° DAI. Albumina apresentou elevação significativa aos 522° DAI e reduções no 462° e 492° DAI. Haptoglobina apresentou aumento aos 432° DAI. A glicoproteína ácida apresentou aumentos no 402° e 492° DAI.

A IgA apresentou reduções significativas no 5°, 7°, 402° e 462° DAI. A IgG de cadeia pesada apresentou aumentos significativos no 274°, 316°, 358°, 402° e 492° DAI.

IgG de cadeia leve apresentou aumentos significativos no 402° e 492° DAI.

Tabela 8. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

Proteínas / Pesos Moleculáres KD															
DAI	PT			NI / 245			NI / 215			NI / 206			IgA / 180		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	7,04	6,82	0,42 ns	2,09	4,07	0,09 ns	2,33	2,51	0,83 ns	3,39	4,72	0,50 ns	107,93	165,48	0,02*
1	6,90	7,02	0,69 ns	2,51	2,15	0,81 ns	0,96	1,14	0,81 ns	2,51	2,79	0,88 ns	115,26	154,17	0,06 ns
2	6,54	6,71	0,20 ns	4,85	2,80	0,56 ns	1,03	0,58	0,54 ns	9,32	8,67	0,70 ns	106,84	81,66	0,38 ns
3	6,60	6,57	0,89 ns	0,18	1,81	0,00**	5,44	6,05	0,86 ns	2,01	74,92	0,02	105,15	104,09	0,97 ns
4	6,61	6,66	0,87 ns	1,06	4,93	0,14 ns	7,16	5,09	0,80 ns	12,80	61,55	0,28 ns	129,34	152,11	0,33 ns
5	6,75	6,80	0,86 ns	3,84	3,80	0,98 ns	5,23	8,53	0,42 ns	9,40	6,97	0,47 ns	129,05	212,21	0,01**
6	6,69	6,71	0,95 ns	3,22	4,58	0,52 ns	6,71	7,10	0,89 ns	8,23	5,28	0,38 ns	147,30	208,55	0,06 ns
7	6,51	6,45	0,80 ns	1,25	3,78	0,06 ns	3,35	4,28	0,65 ns	3,36	3,66	0,88 ns	104,07	166,68	0,01*
14	6,74	6,79	0,88 ns	3,47	4,66	0,37 ns	2,37	2,26	0,89 ns	7,15	1,68	0,19 ns	121,00	141,19	0,67 ns
29	6,90	6,69	0,51 ns	3,56	2,69	0,75 ns	5,08	6,80	0,67 ns	11,72	26,52	0,41 ns	107,81	79,82	0,31 ns
57	6,94	7,00	0,79 ns	3,37	4,78	0,59 ns	1,91	3,43	0,24 ns	11,45	10,48	0,87 ns	106,59	119,61	0,81 ns
85	7,01	6,98	0,94 ns	4,23	7,18	0,30 ns	6,43	7,49	0,78 ns	9,25	11,96	0,66 ns	83,76	105,78	0,58 ns
120	7,52	7,50	0,94 ns	8,61	0,64	0,44 ns	13,76	15,35	0,83 ns	8,87	13,74	0,53 ns	127,06	178,26	0,13 ns
148	6,84	7,05	0,45 ns	2,39	3,61	0,59 ns	10,02	12,00	0,68 ns	24,82	25,69	0,96 ns	160,82	159,74	0,98 ns
176	7,18	7,17	0,96 ns	8,55	12,12	0,40 ns	9,06	13,16	0,14 ns	10,51	4,98	0,05*	117,86	136,19	0,61 ns
204	7,07	7,12	0,92 ns	3,81	1,97	0,4 ns	5,01	8,58	0,14 ns	7,48	9,22	0,58 ns	70,35	61,92	0,76 ns
232	7,20	4,31	0,12 ns	5,43	5,13	0,93 ns	7,02	10,09	0,37 ns	9,94	6,48	0,63 ns	109,83	88,47	0,46 ns
246	7,66	6,98	0,13 ns	1,95	6,59	0,20 ns	8,10	5,67	0,57 ns	22,74	20,55	0,85 ns	252,80	159,33	0,29 ns
260	7,77	6,95	0,01*	2,26	3,33	0,74 ns	12,44	3,03	0,05 ns	18,04	2,53	0,23 ns	181,56	144,84	0,57 ns
274	8,08	7,07	0,02*	10,04	2,07	0,10 ns	11,84	4,07	0,07 ns	22,13	30,86	0,73 ns	128,05	85,24	0,42 ns
288	7,58	7,01	0,09 ns	3,21	4,51	0,62 ns	7,94	2,44	0,03*	14,97	11,86	0,60 ns	146,92	120,38	0,39 ns
302	7,78	7,17	0,09 ns	1,09	5,62	0,12 ns	5,36	7,63	0,57 ns	35,20	12,49	0,53 ns	95,83	107,66	0,77 ns
316	7,54	6,72	0,30 ns	8,68	0,57	0,02*	14,13	13,73	0,91 ns	5,28	12,26	0,28 ns	127,20	159,69	0,38 ns
330	7,52	6,83	0,04*	3,53	3,53	1,0 ns 0	7,61	11,56	0,34 ns	7,38	24,99	0,12 ns	107,87	155,05	0,27 ns
358	7,46	6,69	0,02*	3,36	11,28	0,06 ns	8,97	12,34	0,68 ns	21,90	30,38	0,72 ns	190,65	116,59	0,32 ns
402	7,61	6,98	0,13 ns	0,00	2,00	0,13 ns	3,05	8,46	0,24 ns	12,53	9,03	0,37 ns	137,43	60,62	0,01*
432	7,41	7,17	0,27 ns	0,00	2,02	0,22 ns	1,04	9,20	0,00**	3,16	12,26	0,03*	116,68	96,63	0,70 ns
462	7,45	6,78	0,05 ns	0,00	0,00	-	4,23	3,86	0,88 ns	5,28	3,96	0,80 ns	112,24	210,09	0,03*
492	7,02	7,00	0,96 ns	0,00	1,96	0,13 ns	42,13	8,46	0,54 ns	14,61	9,02	0,48 ns	97,09	61,04	0,24 ns
522	8,15	7,45	0,11 ns	0,00	3,54	0,22 ns	2,62	5,63	0,04*	4,28	1,73	0,35 ns	150,66	209,62	0,09 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

Tabela 9. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Proteínas / Pesos Moleculáres KD														
	IN / 170			NI / 159			NI / 142			Ceruloplasmina / 128			NI / 122		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	64,81	101,75	0,04*	14,45	17,37	0,28 ns	29,29	29,44	0,98 ns	42,05	42,46	0,96 ns	54,91	53,20	0,89 ns
1	54,53	58,06	0,89 ns	23,89	19,58	0,69 ns	25,62	27,07	0,81 ns	49,93	34,36	0,27 ns	43,28	50,10	0,64 ns
2	22,78	28,09	0,78 ns	19,48	33,95	0,38 ns	26,33	24,61	0,81 ns	39,24	37,29	0,82 ns	32,64	24,02	0,59 ns
3	4,57	42,87	0,16 ns	12,73	21,74	0,09 ns	13,89	25,71	0,25 ns	31,62	26,16	0,56 ns	28,89	26,85	0,89 ns
4	29,03	47,95	0,46 ns	25,81	25,21	0,94 ns	22,65	36,42	0,17 ns	30,51	21,91	0,27 ns	26,48	16,98	0,29 ns
5	44,74	0,00	0,15 ns	23,36	24,53	0,75 ns	27,78	27,43	0,95 ns	40,75	22,84	0,09 ns	33,89	30,62	0,59 ns
6	28,66	34,25	0,83 ns	18,88	30,61	0,01*	20,06	32,05	0,17 ns	39,54	48,15	0,58 ns	27,63	23,83	0,31 ns
7	43,77	74,94	0,04*	14,84	15,42	0,64 ns	27,74	34,43	0,32 ns	47,54	54,15	0,65 ns	31,21	42,96	0,26 ns
14	52,57	89,34	0,15 ns	14,12	15,14	0,76 ns	26,15	40,26	0,13 ns	55,08	59,96	0,73 ns	38,25	56,95	0,14 ns
29	51,62	59,97	0,82 ns	19,07	23,95	0,21 ns	28,96	27,59	0,85 ns	46,86	34,11	0,29 ns	43,31	33,58	0,59 ns
57	42,01	86,11	0,05*	14,56	17,23	0,39 ns	26,82	24,15	0,76 ns	47,11	32,63	0,31 ns	42,03	52,50	0,60 ns
85	37,00	33,74	0,89 ns	32,30	18,59	0,54 ns	17,76	10,56	0,15 ns	30,29	20,99	0,43 ns	27,06	38,97	0,15 ns
120	31,52	10,65	0,41 ns	6,99	11,22	0,50 ns	7,78	5,85	0,68 ns	29,94	20,01	0,23 ns	19,69	33,06	0,32 ns
148	79,40	199,23	0,03*	18,86	26,59	0,00**	24,01	19,34	0,20 ns	40,01	34,23	0,55v	34,50	31,99	0,79 ns
176	24,88	29,16	0,84 ns	18,90	19,28	0,85 ns	13,34	18,65	0,38 ns	25,69	24,13	0,79 ns	48,02	50,53	0,81 ns
204	30,72	71,62	0,19 ns	33,27	15,02	0,48 ns	21,03	16,22	0,38 ns	30,90	23,49	0,24 ns	30,49	33,10	0,86 ns
232	3,51	68,31	0,08 ns	17,68	19,56	0,44 ns	18,07	21,09	0,67 ns	34,22	23,72	0,07 ns	52,05	55,00	0,72 ns
246	23,46	110,77	0,07 ns	18,64	24,15	0,46 ns	33,63	24,44	0,25 ns	54,93	50,54	0,77 ns	57,79	24,89	0,03*
260	59,92	91,96	0,46 ns	21,78	15,38	0,25 ns	37,65	40,81	0,79 ns	62,74	60,68	0,88 ns	60,95	57,81	0,86 ns
274	102,72	64,05	0,53 ns	16,87	25,07	0,11 ns	24,35	29,30	0,28 ns	58,11	36,28	0,28 ns	67,47	36,32	0,27 ns
288	101,34	86,30	0,51 ns	15,49	17,22	0,73 ns	32,26	24,20	0,13 ns	62,27	32,75	0,00**	90,40	52,58	0,03*
302	106,60	35,16	0,26 ns	18,99	19,07	0,97 ns	30,98	10,67	0,11 ns	69,71	21,67	0,00**	50,47	39,73	0,52 ns
316	39,74	9,59	0,45 ns	15,37	9,97	0,4 ns 1	27,41	5,21	0,00**	61,97	17,89	0,00**	87,11	29,55	0,02*
330	139,56	193,61	0,18 ns	53,17	25,82	0,58 ns	38,32	18,67	0,04*	69,55	33,14	0,01*	107,47	30,98	0,02*
358	49,58	17,93	0,49 ns	22,18	18,96	0,50 ns	27,34	20,09	0,19 ns	60,55	33,87	0,11 ns	62,94	31,05	0,24 ns
402	15,43	70,49	0,03*	30,98	14,69	0,00**	33,42	15,90	0,06 ns	49,60	22,91	0,02	51,96	32,37	0,23 ns
432	32,78	74,07	0,45 ns	6,05	20,98	0,03*	8,80	22,54	0,04*	61,18	25,41	0,00**	4,02	58,78	0,00**
462	0,00	0,00	-	5,70	0,00	0,48 ns	12,69	20,97	0,24 ns	67,26	53,61	0,64 ns	6,51	6,52	1,00 ns
492	14,62	70,21	0,03*	21,60	14,74	0,40 ns	35,94	15,97	0,05 ns	43,64	23,16	0,04*	40,53	32,40	0,69 ns
522	0,00	7,07	0,22 ns	5,06	7,28	0,80 ns	18,52	25,95	0,31 ns	84,54	68,58	0,36 ns	4,79	14,30	0,29 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

Tabela 10. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

Proteínas / Pesos Moleculáres KD												
DAI	IN / 115			IN / 101			IN / 90			Transferrina / 82		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	15,39	15,98	0,91 ns	34,51	34,71	0,98 ns	114,20	112,44	0,91 ns	249,91	282,06	0,20 ns
1	16,96	15,19	0,45 ns	33,59	30,89	0,76 ns	114,48	122,24	0,69 ns	251,01	279,22	0,21 ns
2	12,65	16,61	0,49 ns	26,78	26,80	1,00 ns	114,25	113,92	0,98 ns	243,89	263,34	0,25 ns
3	9,93	12,27	0,71 ns	20,98	20,21	0,91 ns	116,75	69,43	0,15 ns	262,45	323,43	0,26 ns
4	32,79	22,70	0,50 ns	46,58	35,46	0,71 ns	84,99	94,03	0,70 ns	218,28	228,10	0,84 ns
5	32,37	25,19	0,17 ns	48,18	36,55	0,70 ns	158,24	114,46	0,47 ns	956,20	270,38	0,50 ns
6	17,96	5,09	0,13 ns	37,81	21,43	0,30 ns	65,27	87,65	0,53 ns	222,38	242,38	0,63 ns
7	10,27	15,78	0,09 ns	21,93	32,73	0,05 ns	110,04	104,87	0,68 ns	232,85	256,79	0,29 ns
14	12,42	14,85	0,44 ns	26,24	23,50	0,75 ns	116,89	128,27	0,52 ns	278,63	302,58	0,22 ns
29	15,86	14,56	0,81 ns	36,87	25,36	0,27 ns	157,22	123,53	0,10 ns	331,55	360,69	0,25 ns
57	14,19	22,86	0,18 ns	36,89	37,84	0,91 ns	145,07	101,86	0,16 ns	328,13	380,45	0,01*
85	13,66	10,05	0,69 ns	41,59	32,49	0,58 ns	68,61	68,62	1,00 ns	261,60	269,56	0,76 ns
120	8,88	6,71	0,75 ns	28,22	31,55	0,58 ns	139,25	112,66	0,38 ns	337,70	381,32	0,42 ns
148	25,13	23,46	0,87 ns	65,85	47,79	0,34 ns	194,33	108,23	0,33 ns	1164,38	383,09	0,51 ns
176	11,33	11,26	0,98 ns	34,60	35,63	0,83 ns	94,21	77,56	0,37 ns	248,14	264,26	0,19 ns
204	18,74	17,20	0,68 ns	33,86	33,25	0,91 ns	99,73	85,92	0,48 ns	248,81	264,71	0,51 ns
232	19,25	20,52	0,73 ns	37,49	33,99	0,58 ns	96,68	81,03	0,34 ns	244,29	262,85	0,37 ns
246	26,82	22,52	0,39 ns	53,87	41,83	0,30 ns	115,63	90,16	0,21 ns	337,35	316,43	0,59 ns
260	29,58	15,17	0,02*	52,27	24,58	0,03*	119,48	130,45	0,60 ns	368,30	309,62	0,11 ns
274	31,46	13,98	0,03*	41,00	28,85	0,36 ns	68,55	129,75	0,01*	243,11	382,72	0,01**
288	29,31	22,85	0,11 ns	55,76	37,93	0,24 ns	89,30	102,02	0,45 ns	231,05	380,37	0,00**
302	32,49	10,30	0,01**	66,88	33,38	0,17 ns	113,22	70,17	0,32 ns	1710,94	276,56	0,29 ns
316	20,42	6,00	0,02*	59,36	28,23	0,41 ns	72,42	100,96	0,07 ns	177,97	342,41	0,00**
330	36,03	22,84	0,18 ns	52,59	46,31	0,15 ns	80,31	104,95	0,19 ns	241,70	371,01	0,00**
358	35,46	17,10	0,04*	40,57	45,39	0,76 ns	89,00	126,09	0,45 ns	220,99	1628,52	0,21 ns
402	32,4	16,84	0,21 ns	39,20	32,48	0,23 ns	123,5	84,37	0,06 ns	197,23	259,37	0,05 ns
432	15,79	21,88	0,34 ns	43,51	36,56	0,59 ns	57,31	86,66	0,30 ns	1026,81	282,48	0,56 ns
462	21,27	15,21	0,57v	42,89	36,14	0,66 ns	61,31	51,31	0,79 ns	188,98	169,13	0,62 ns
492	29,85	16,90	0,26 ns	36,01	32,63	0,46 ns	115,02	84,75	0,18 ns	182,24	260,37	0,02*
522	19,31	31,39	0,53 ns	34,16	32,45	0,94 ns	105,59	58,99	0,37 ns	213,68	225,17	0,86 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

Tabela 11. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Proteínas / Pesos Moleculáres KD											
	Albumina / 66			IgG de cadeia pesada / 57			IN / 47			Haptoglobina / 42		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	4294,25	4103,05	0,37 ns	1195,81	1143,9	0,67 ns	11,38	9,84	0,63	8,39	6,98	0,69 ns
1	4319,27	4303,27	0,94 ns	1181,81	1197,96	0,90 ns	10,89	12,89	0,63 ns	10,02	14,00	0,47 ns
2	3773,45	3842,19	0,76 ns	1249,39	1270,85	0,86 ns	17,10	14,80	0,63 ns	21,66	24,42	0,71 ns
3	4121,85	3854,3	0,31 ns	981,63	1103,95	0,44 ns	16,29	10,31	0,24 ns	17,62	19,59	0,67 ns
4	3658,01	3746,08	0,68 ns	1199,46	1244,62	0,77 ns	16,72	10,19	0,42 ns	27,60	19,04	0,49 ns
5	3306,55	3767,43	0,48 ns	1053,30	1317,42	0,51 ns	18,82	13,57	0,41 ns	18,93	22,64	0,58 ns
6	3720,1	3688,68	0,81 ns	1321,31	1239,14	0,65 ns	16,30	15,78	0,93 ns	33,20	32,21	0,89 ns
7	4041,41	3857,89	0,33 ns	1108,56	1042,84	0,66 ns	14,13	9,05	0,09 ns	11,49	9,67	0,73 ns
14	3858,61	4024,86	0,54 ns	1192,25	1152,45	0,83 ns	16,23	9,99	0,08 ns	14,54	13,59	0,89 ns
29	3755,83	3674,81	0,75 ns	1230,06	1156,17	0,65 ns	21,36	8,78	0,03*	17,29	17,21	0,98 ns
57	3883,39	3931,11	0,75 ns	1386,27	1272,98	0,52 ns	22,82	17,49	0,25 ns	22,88	24,68	0,81 ns
85	4073,73	4310,20	0,24 ns	1123,94	1068,99	0,65 ns	12,87	13,26	0,96 ns	13,96	17,64	0,62 ns
120	4795,17	5030,30	0,37 ns	891,19	879,91	0,97 ns	7,74	9,03	0,77 ns	146,76	9,74	0,45 ns
148	3415,13	4215,93	0,39 ns	923,33	1061,04	0,72 ns	13,58	9,48	0,39 ns	26,85	26,03	0,93 ns
176	4362,05	4605,58	0,25 ns	1068,31	879,26	0,27 ns	10,27	4,19	0,39 ns	15,37	15,69	0,97 ns
204	4540,07	4610,48	0,74 ns	932,09	780,76	0,38 ns	13,58	6,22	0,29 ns	16,57	15,95	0,87 ns
232	4291,64	4087,16	0,46 ns	1131,28	994,87	0,52 ns	17,97	6,39	0,10 ns	16,21	23,58	0,24 ns
246	4277,39	4156,05	0,64 ns	1345,28	1068,51	0,17 ns	17,40	7,94	0,16 ns	17,40	15,38	0,61 ns
260	4342,95	4128,14	0,31 ns	1395,53	1171,41	0,15 ns	15,95	10,26	0,10 ns	24,93	13,69	0,18 ns
274	4349,87	3894,09	0,19 ns	1535,58	1218,96	0,04*	21,08	9,28	0,44 ns	28,06	17,96	0,52 ns
288	4398,4	3935,34	0,10 ns	1352,75	1272,99	0,55 ns	21,99	17,52	0,14 ns	16,06	24,73	0,34 ns
302	3167,53	4423,6	0,23 ns	927,14	1097,66	0,76 ns	24,23	7,89	0,11 ns	31,62	19,37	0,43 ns
316	4418,81	4512,12	0,86 ns	1279,54	787,82	0,00**	15,81	8,11	0,13 ns	14,87	8,71	0,16 ns
330	4129,23	4083,43	0,74 ns	1463,09	1026,00	0,06 ns	16,79	9,14	0,26 ns	24,43	25,19	0,92 ns
358	4273,54	3102,00	0,22 ns	1371,38	559,04	0,02*	19,31	7,48	0,08 ns	27,86	15,59	0,07 ns
402	3937,26	4521,26	0,08 ns	1250,44	765,62	0,00**	28,14	6,06	0,03*	43,96	15,59	0,02*
432	3916,84	4381,57	0,64 ns	929,94	1066,85	0,69 ns	12,89	7,04	0,16 ns	15,34	25,68	0,21 ns
462	4588,73	3977,54	0,03*	1003,91	1099,59	0,50 ns	12,20	10,48	0,59 ns	20,53	15,71	0,52 ns
492	3618,65	4535,28	0,00**	1156,20	768,96	0,01*	16,65	6,09	0,13 ns	59,41	15,62	0,12 ns
522	5107,52	4532,23	0,01*	1171,06	1216,94	0,77 ns	19,57	14,89	0,58 ns	13,11	17,18	0,32 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

Tabela 12. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Proteínas / Pesos Moleculáres KD														
	Glicoproteína ácida / 38			IN / 35			IN / 29			IN / 27			IgG de cadeia leve / 26		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	8,87	6,28	0,41 ns	2,16	8,57	0,22 ns	9,33	7,88	0,59 ns	15,61	154,34	0,24 ns	488,08	384,90	0,36 ns
1	7,4	6,32	0,69 ns	1,66	2,26	0,79v	6,75	12,73	0,31 ns	10,14	165,35	0,23 ns	452,19	220,45	0,13 ns
2	15,26	11,69	0,57 ns	12,34	16,97	0,53 ns	15,93	16,17	0,93 ns	21,30	18,89	0,53 ns	587,82	603,77	0,83 ns
3	18,67	11,89	0,22 ns	4,79	11,36	0,21 ns	17,29	19,32	0,65 ns	129,04	21,61	0,49 ns	513,22	558,15	0,76 ns
4	22,00	14,65	0,63 ns	7,79	13,08	0,46 ns	25,74	21,18	0,38 ns	36,80	22,52	0,04*	731,98	660,40	0,59 ns
5	11,00	8,92	0,61 ns	11,62	13,66	0,78 ns	22,65	20,60	0,80 ns	171,72	23,20	0,48 ns	559,92	481,17	0,74 ns
6	16,73	24,74	0,42 ns	13,00	13,99	0,91 ns	22,27	21,78	0,91 ns	30,27	18,58	0,28 ns	748,86	491,88	0,28 ns
7	8,90	7,45	0,56 ns	2,98	9,83	0,29 ns	11,43	17,44	0,10 ns	15,37	12,43	0,53 ns	495,66	483,69	0,89 ns
14	10,64	8,50	0,52 ns	4,92	5,66	0,88 ns	15,65	14,40	0,77 ns	22,45	13,59	0,21 ns	526,13	485,12	0,72 ns
29	15,46	12,88	0,51 ns	9,15	11,08	0,74 ns	22,04	22,93	0,82 ns	31,01	25,68	0,40 ns	647,40	695,19	0,69 ns
57	14,88	15,36	0,92 ns	7,50	10,62	0,59 ns	19,86	25,89	0,29 ns	26,14	26,77	0,80 ns	601,64	575,24	0,83 ns
85	12,87	15,98	0,25 ns	6,26	6,63	0,93 ns	13,43	15,27	0,66 ns	28,78	22,79	0,25 ns	661,60	581,18	0,46 ns
120	17,68	11,35	0,31 ns	4,96	2,23	0,57 ns	13,41	12,61	0,86 ns	180,13	14,66	0,44 ns	476,69	510,37	0,81 ns
148	15,47	22,72	0,13 ns	14,03	5,15	0,17 ns	16,94	17,40	0,90 ns	82,09	26,63	0,45 ns	502,45	431,68	0,76 ns
176	14,88	21,84	0,19 ns	6,50	6,28	0,97 ns	13,54	20,74	0,17 ns	27,09	31,94	0,25 ns	549,02	540,25	0,92 ns
204	12,25	16,66	0,11 ns	8,29	10,1	0,77 ns	20,44	22,64	0,73 ns	32,98	32,03	0,87 ns	648,26	623,91	0,81 ns
232	12,45	16,64	0,12 ns	8,27	9,11	0,85 ns	28,56	20,61	0,29 ns	41,12	26,37	0,21 ns	545,02	520,84	0,90 ns
246	17,15	17,25	0,99 ns	8,03	6,54	0,80 ns	19,77	15,62	0,40 ns	37,98	34,52	0,64 ns	538,23	530,97	0,92 ns
260	19,95	8,67	0,32 ns	11,22	5,67	0,34 ns	16,60	14,98	0,76 ns	31,02	13,86	0,05 ns	621,71	492,96	0,19 ns
274	34,48	13,46	0,45 ns	4,84	11,53	0,22 ns	26,34	24,17	0,86 ns	40,28	27,30	0,38 ns	785,84	729,27	0,77 ns
288	10,00	15,32	0,33 ns	3,37	10,57	0,08 ns	16,10	25,76	0,16 ns	21,85	26,80	0,37 ns	651,93	575,08	0,28 ns
302	35,50	20,61	0,42 ns	11,14	6,80	0,41 ns	27,63	15,70	0,10 ns	34,44	23,60	0,52 ns	672,96	597,57	0,59 ns
316	16,22	10,26	0,46 ns	6,83	1,98	0,45 ns	17,37	11,43	0,25 ns	25,85	13,15	0,04*	725,05	458,32	0,17 ns
330	23,50	22,00	0,68 ns	22,69	5,00	0,23 ns	16,72	16,87	0,96 ns	26,68	25,76	0,89 ns	474,72	274,28	0,19 ns
358	23,93	14,15	0,24 ns	15,89	11,03	0,78v	26,47	21,59	0,66 ns	34,37	159,67	0,23 ns	479,60	470,69	0,93 ns
402	51,11	16,35	0,00**	22,36	8,35	0,33 ns	52,58	15,66	0,01**	55,61	28,28	0,01**	731,07	439,19	0,35 ns
432	29,72	17,98	0,37 ns	8,56	9,72	0,9 ns 2	38,61	22,11	0,01**	147,57	28,24	0,44 ns	417,83	556,12	0,42 ns
462	32,11	41,54	0,45 ns	0,00	0,00	-	42,27	36,87	0,38 ns	61,16	42,62	0,49 ns	541,56	516,26	0,77 ns
492	44,08	16,44	0,00**	12,29	8,42	0,73 ns	48,44	15,85	0,01**	41,83	28,41	0,42 ns	450,64	445,98	0,99 ns
522	49,16	37,64	0,45 ns	7,59	1,65	0,58 ns	37,12	28,69	0,54 ns	209,26	49,32	0,52 ns	413,18	613,68	0,25 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

Tabela 13. Médias e significâncias do teste t da concentração sérica de proteína total e das frações protéicas, presentes no traçado eletroforético em gel de acrilamida (SDS-PAGE), de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e no grupo testemunho (G2).

DAI	Proteína											
	IN 24			IN 22			IN 21			IN 20		
	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t	G1	G2	Teste t
0	180,85	118,16	0,32 ns	4,62	0,93	0,16 ns	7,61	5,63	0,41 ns	0,00	0,00	-
1	177,36	232,29	0,60 ns	4,17	42,97	0,22 ns	9,85	12,21	0,53 ns	0,00	0,00	-
2	214,10	223,47	0,79 ns	0,85	1,12	0,85 ns	0,65	0,00	0,27 ns	0,00	0,00	-
3	150,75	203,40	0,41 ns	8,25	0,00	0,19 ns	0,00	3,89	0,04*	0,00	0,00	-
4	146,90	150,25	0,96v	4,30	0,00	0,48 ns	16,23	5,15	0,63 ns	0,00	3,83	0,22 ns
5	77,35	92,45	0,74 ns	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-
6	143,89	117,17	0,66 ns	0,38	0,00	0,48v	0,00	0,00	-	0,00	0,00	-
7	175,26	177,55	0,95 ns	4,00	1,65	0,09 ns	8,49	9,97	0,64 ns	0,00	0,00	-
14	188,45	170,33	0,67 ns	4,18	1,36	0,19 ns	3,64	9,43	0,06 ns	0,00	0,00	-
29	237,08	240,37	0,94 ns	3,10	1,55	0,42v	0,00	0,79	0,22 ns	0,00	0,00	-
57	211,28	208,61	0,96 ns	1,01	0,00	0,48 ns	0,22	0,66	0,47 ns	0,00	0,00	-
85	287,50	277,74	0,85 ns	7,81	1,44	0,10 ns	7,96	16,30	0,16 ns	0,00	0,00	-
120	190,86	184,79	0,93 ns	8,59	10,62	0,70 ns	4,44	0,00	0,41 ns	0,00	0,00	-
148	134,37	154,30	0,70 ns	1,54	0,00	0,48 ns	1,62	5,51	0,26 ns	0,00	2,51	0,22 ns
176	316,07	329,47	0,73 ns	7,01	1,06	0,12 ns	8,84	11,74	0,60 ns	0,00	2,72	0,22 ns
204	355,87	337,05	0,71	7,87	1,09	0,11 ns	7,61	15,30	0,20 ns	0,00	2,40	0,22 ns
232	280,38	271,43	0,93	10,90	1,07	0,16 ns	4,77	12,34	0,11 ns	0,00	0,00	-
246	223,05	215,11	0,89	2,76	0,83	0,52 ns	7,86	12,37	0,22 ns	0,00	1,10	0,22 ns
260	211,85	175,77	0,51	7,21	1,32	0,18 ns	6,16	6,18	1,00 ns	0,00	3,48	0,22 ns
274	328,05	256,24	0,23	15,79	1,64	0,37 ns	19,01	0,80	0,18 ns	47,07	0,00	0,48 ns
288	273,04	209,79	0,27	5,84	0,00	0,09 ns	6,06	0,67	0,16 ns	0,33	0,00	0,48 ns
302	386,22	287,16	0,21	12,71	0,00	0,03*	16,54	10,36	0,32 ns	11,74	7,85	0,82 ns
316	296,43	165,77	0,07	14,28	5,96	0,27 ns	6,96	0,00	0,14 ns	0,98	3,60	0,41 ns
330	320,35	234,68	0,32	28,42	0,00	0,04*	15,74	3,52	0,10 ns	3,87	4,23	0,95 ns
358	298,23	202,52	0,34	13,89	0,00	0,04*	20,17	6,65	0,16 ns	9,95	7,87	0,88 ns
402	474,86	404,90	0,47	120,71	111,93	0,95 ns	45,56	13,22	0,00**	58,99	4,16	0,04*
432	278,94	290,81	0,9	110,77	0,00	0,24 ns	64,36	10,44	0,04*	61,58	3,99	0,30 n
462	416,41	322,35	0,02	18,46	18,63	0,98 ns	156,31	70,67	0,03*	27,32	53,62	0,30 ns
492	597,16	404,15	0,4	175,81	108,16	0,67 ns	37,94	13,23	0,00**	46,03	4,16	0,08 ns
522	340,13	310,12	0,35	18,97	4,57	0,02*	60,58	31,06	0,21 ns	63,58	26,51	0,26 ns

PT = Proteína total
NI= Não identificada nominalmente

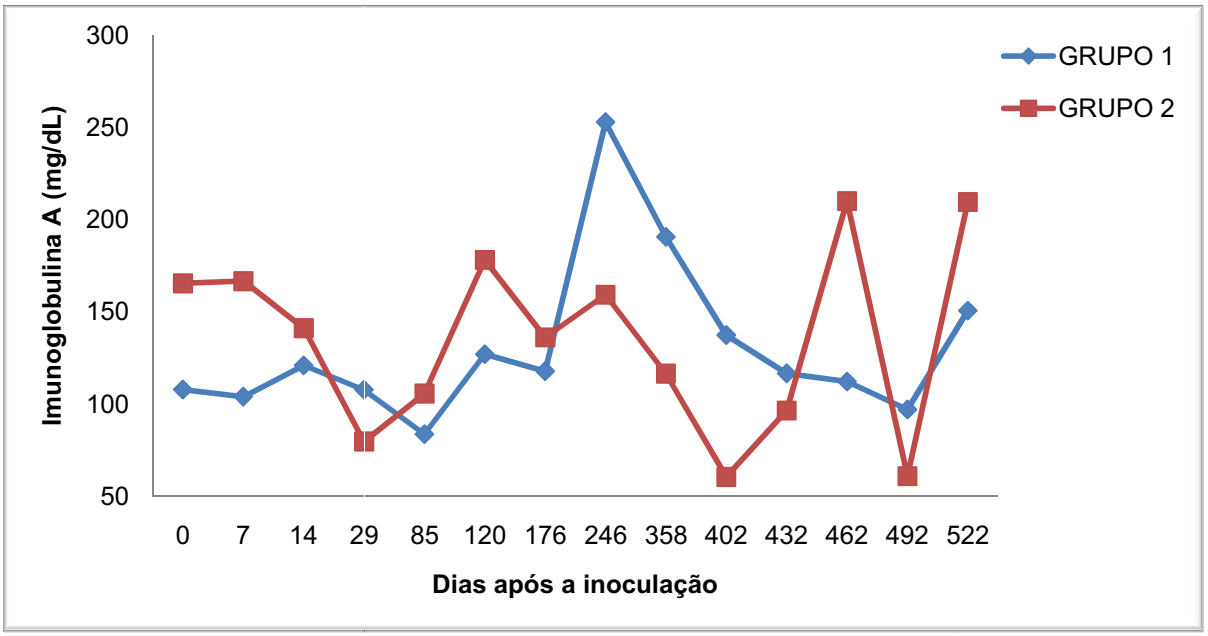

Figura 23. Médias das variação das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina A (IgA) em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

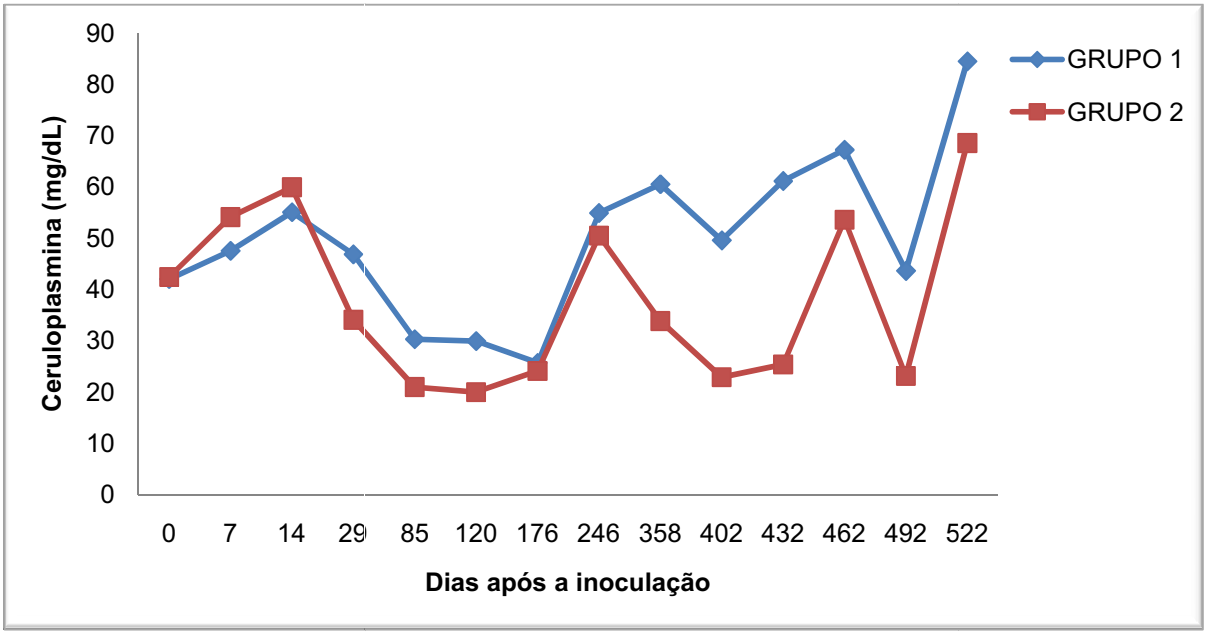

Figura 24. Médias da variação das concentrações séricas (mg / dL), da ceruloplasmina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

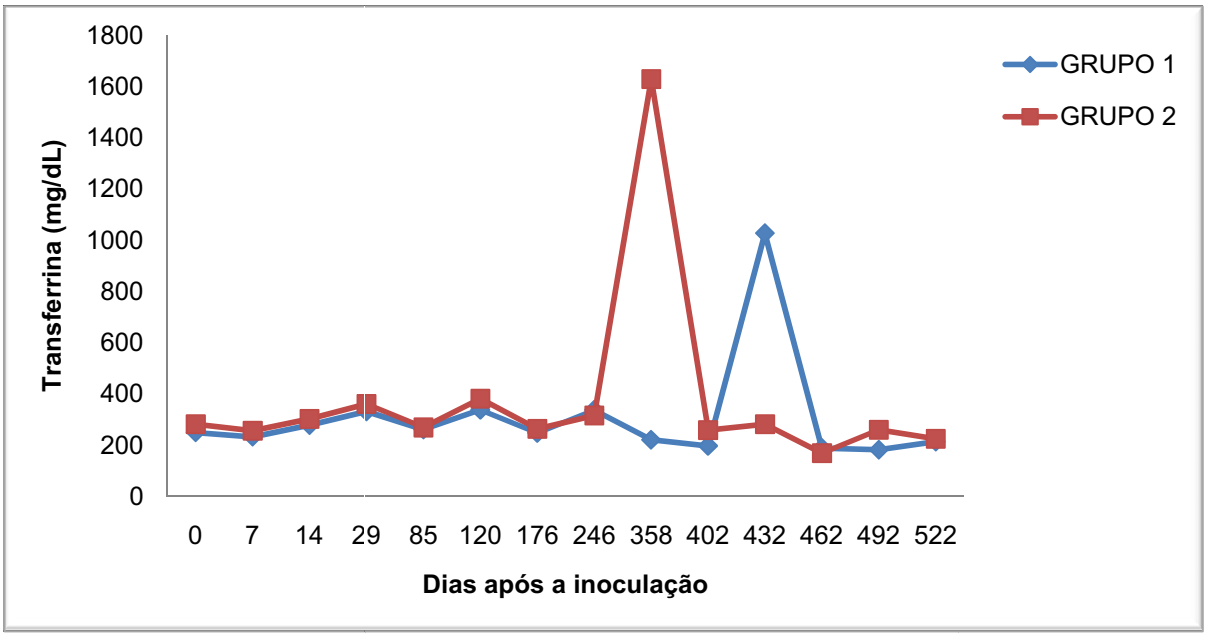

Figura 25. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da transferrina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

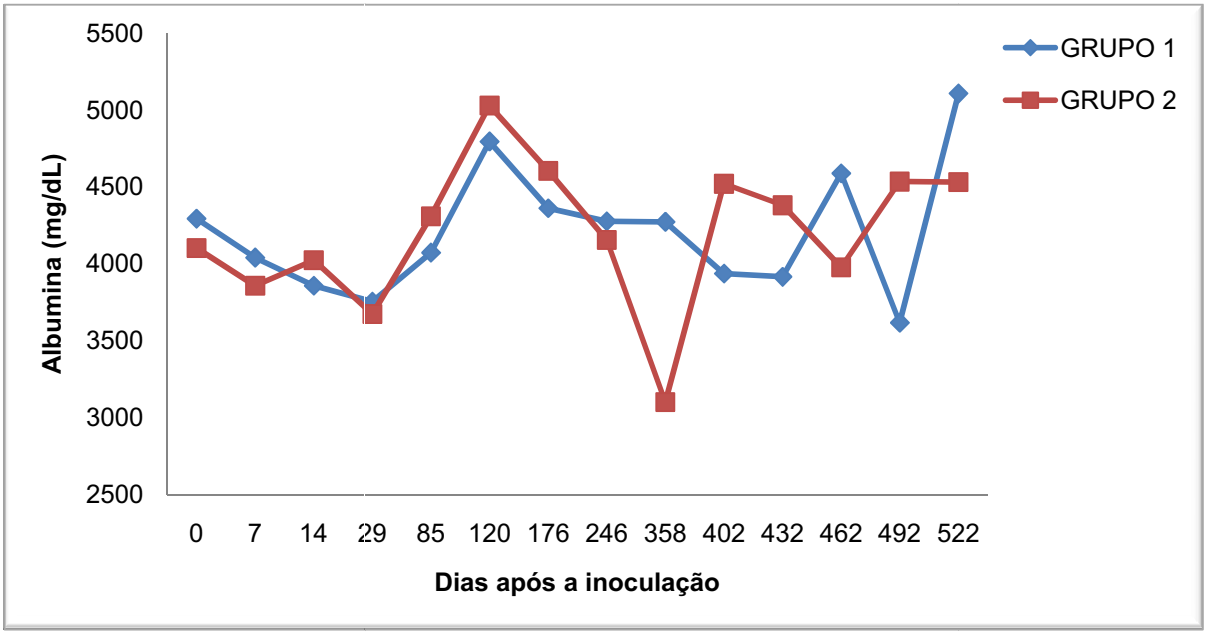

Figura 26. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da albumina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

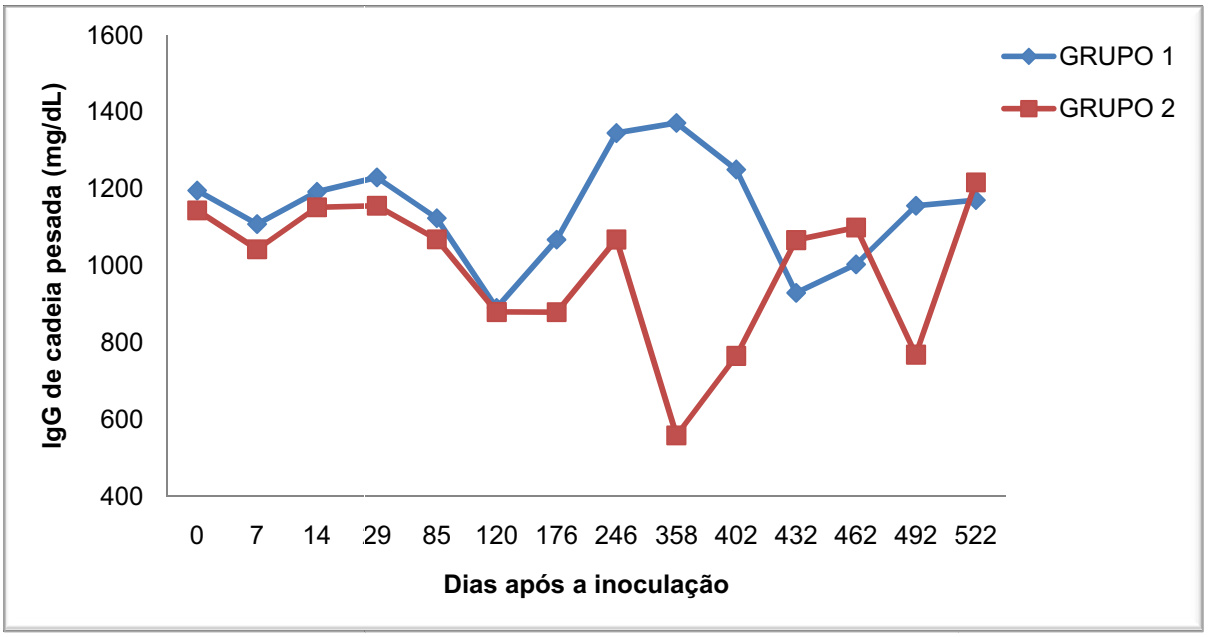

Figura 27. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

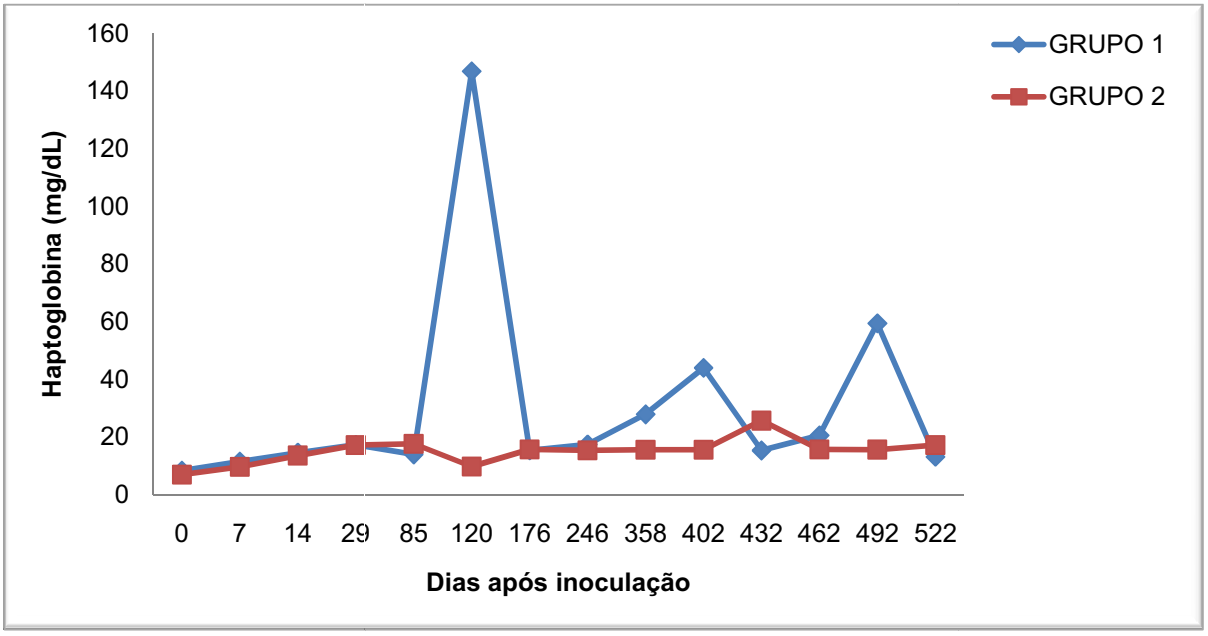

Figura 28. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da haptoglobina em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

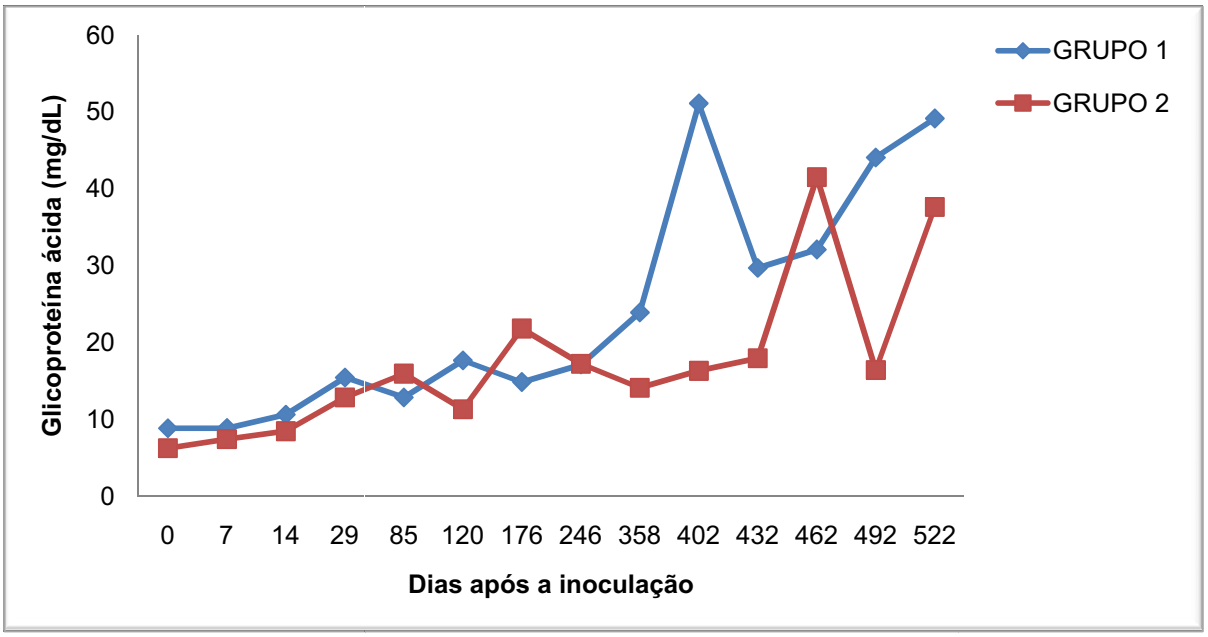

Figura 29. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da glicoproteína ácida em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

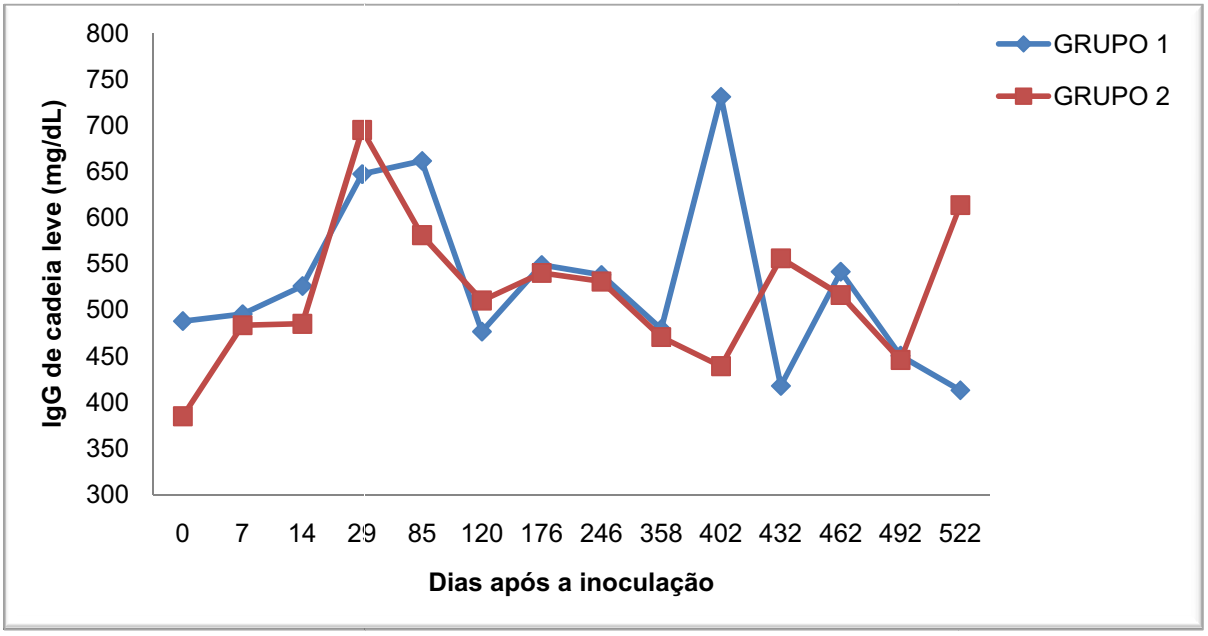

Figura 30. Médias das concentrações séricas (mg / dL), da imunoglobulina G (IgG) de cadeia leve em bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* (G1) e grupo testemunho (G2).

4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*T. evansi* permitiu verificar que as primeiras titulações positivas ≥ (1:80) ocorreram nos animais 01 e 08 no 14° DAI e nos animais 03, 07 e 06 no 29° DAI. Nos animais do grupo testemunho (02, 04, 05-G2) em nenhum momento foi detectada a presença de anticorpos anti-*T. evansi* (1:80).

As titulações dos anticorpos anti-*T. evansi* nos soros dos aninais estão apresentadas na Tabela 14 e Figura 31, mostra a reatividade de um soro positivo frente ao *T. evansi*.

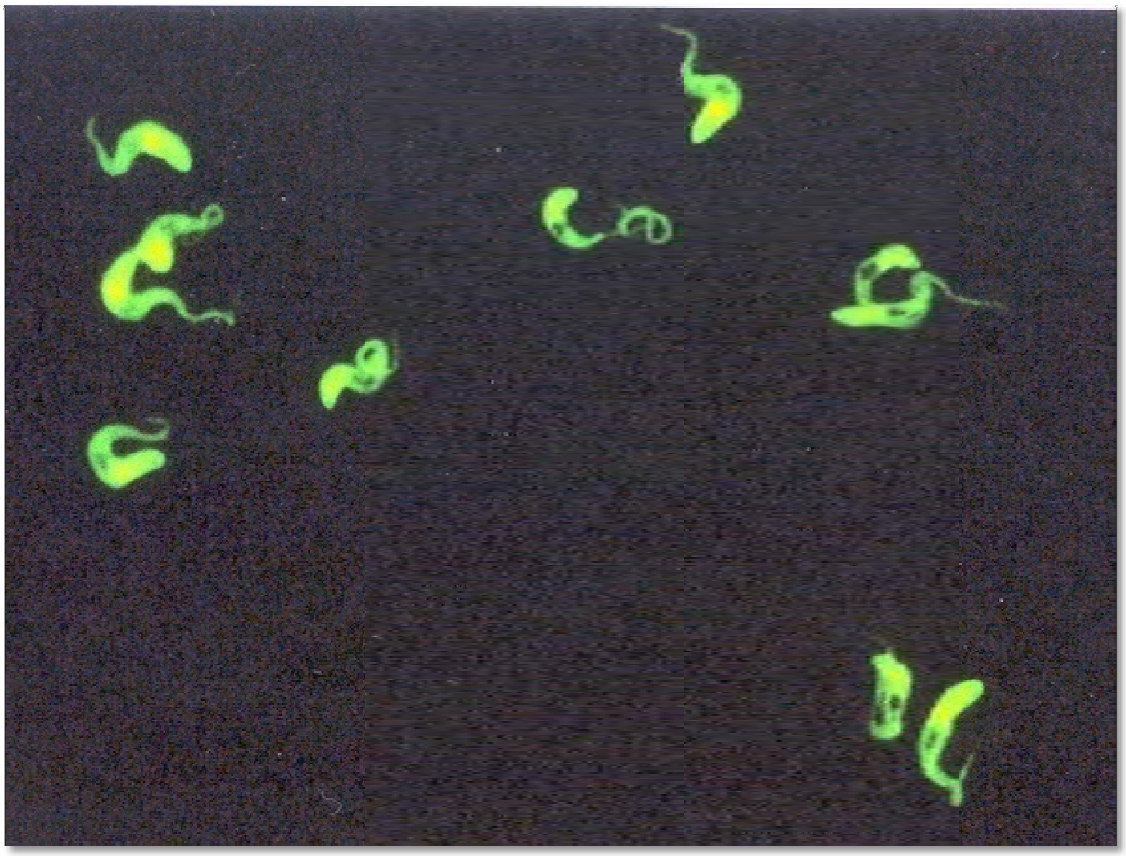

Figura 31. A Figura 31 mostra a reatividade de um soro positivo frente ao *T. evansi* (HE 40x).

Tabela 14. Recíproca dos títulos obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em bovinos inoculados com *T. evansi* (01, 03, 06, 07, 08 –G1) e no grupo testemunho (02, 04, 05 – G2).

DAI	Bovinos inoculados (G1)					Bovinos testemunhos (G2)		
	1	3	6	7	8	2	4	5
0 - 13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	80	0	0	0	80	0	0	0
15	80	0	0	0	80	0	0	0
22	80	0	0	0	80	0	0	0
29	80	80	80	80	80	0	0	0
36	80	160	80	80	80	0	0	0
43	160	160	160	160	160	0	0	0
50	160	1280	80	160	320	0	0	0
57	160	320	80	80	320	0	0	0
64	160	320	160	160	160	0	0	0
71	160	160	160	160	160	0	0	0
78	160	160	160	160	160	0	0	0
85	160	160	160	160	160	0	0	0
92	160	320	160	160	160	0	0	0
99	160	320	160	160	160	0	0	0
106	320	640	640	160	160	0	0	0
113	320	320	640	160	160	0	0	0
120	320	160	1280	320	320	0	0	0
127	320	640	640	320	160	0	0	0
134	160	320	320	320	160	0	0	0
141	160	160	640	160	320	0	0	0
148	320	320	160	160	320	0	0	0
155	320	640	320	160	160	0	0	0
162	160	320	640	320	160	0	0	0
169	160	160	320	320	160	0	0	0
176	160	320	320	160	80	0	0	0
183	80	160	160	80	80	0	0	0
190	160	320	160	160	80	0	0	0
197	160	160	320	80	160	0	0	0
204	160	320	160	160	160	0	0	0
218	80	160	160	160	160	0	0	0
232	160	160	320	80	160	0	0	0
246	80	160	160	160	320	0	0	0
260	80	160	160	80	160	0	0	0
274	80	80	80	80	160	0	0	0
288	160	80	80	80	160	0	0	0
302	80	160	160	80	160	0	0	0
316	160	160	160	160	80	0	0	0
330	80	80	80	160	80	0	0	0
344	80	80	80	80	80	0	0	0
358	80	80	80	80	80	0	0	0
372	80	80	80	80	80	0	0	0
402	80	80	80	80	80	0	0	0
432	80	80	80	80	80	0	0	0
462	80	80	80	80	160	0	0	0
492	80	80	80	80	80	0	0	0
522	80	80	80	80	80	0	0	0

DAI – dias após a inoculação;

4.6 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-teste)

4.6.1 Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado empregados nos soros bovinos

A concentração ótima do antígeno, determinada por titulação em bloco, foi de 5 µg/mL, utilizando a diluição única de 1:100 para os soros de referência positivos e negativos de bovinos e a diluição de 1:30.000 do conjugado. Nessas condições, obteve-se a maior DO média (n=10), de 0,935 ± 0,478 e a menor DO média dos soros negativos (n=10), de 0,149 ± 0,063. Os soros dos bovinos com DO 2,5 vezes maior ou igual à média apresentada pelos soros negativos, foram considerados positivo, ou seja, o ponto de corte foi de ≥ 0,374. Dessa forma, a escala de nível de ELISA (NE) ficou assim definida:

NE	Densidades óticas (DO)		
0	0,000	a	0,276
1	0,277	a	0,372
2	0,373	a	0,502
3	0,503	a	0,678
4	0,679	a	0,916
5	0,917	a	1,236
6	1,237	a	1,669
7	1,670	a	2,253
8	2,254	a	3,042
9	≥ 3,043		

As densidades óticas (DO) e respectivos níveis de ELISA (NE), estão ilustrados na Tabela 15. Em média, os inversos dos títulos de anticorpos começaram a se elevar no 22° DAÍ e reduziram a partir do 113° DAI (Figura 32).

Tabela 15. Densidades óticas (DO) e respectivos níveis de ELISA (NE), obtidos em soro de bovinos inoculados com *T. evansi* e em soro dos bovinos do grupo testemunho. O ponto de corte foi de: DO ≥ 0,374.

DAI	Bovinos inoculados (G1)										Bovinos testemunhos (G2)					
	1		3		6		7		8		2		4		5	
	DO	NE	DO	NE	DO	NE	DO	NE	DO	NE	DO	NE	DO	NE	DO	NE
0	0,182	0	0,181	0	0,167	0	0,134	0	0,136	0	0,177	0	0,100	0	0,198	0
1	0,140	0	0,259	0	0,155	0	0,157	0	0,279	1	0,221	0	0,146	0	0,276	0
2	0,223	0	0,113	0	0,181	0	0,120	0	0,112	0	0,099	0	0,135	0	0,169	0
3	0,232	0	0,240	0	0,339	1	0,203	0	0,102	0	0,248	0	0,193	0	0,258	0
4	0,146	0	0,119	0	0,168	0	0,132	0	0,340	1	0,250	0	0,212	0	0,348	1
5	**0,451**	**2**	**0,397**	**2**	0,303	1	**0,395**	**2**	**0,821**	**4**	0,291	1	0,313	0	0,119	0
6	**0,392**	**2**	**0,555**	**3**	**1,154**	**5**	0,358	1	0,323	2	0,256	0	0,161	0	0,323	1
7	**0,554**	**3**	0,279	1	0,181	0	**0,841**	**4**	**1,589**	**6**	0,211	0	0,325	1	0,183	0
8	**0,401**	**2**	**0,424**	**2**	**0,517**	**3**	0,291	1	**0,733**	**4**	0,244	0	0,165	0	0,235	0
9	0,372	1	0,307	1	0,372	1	**0,885**	**4**	**0,598**	**3**	0,230	0	0,221	0	0,211	0
10	**0,886**	**4**	**0,770**	**4**	**0,437**	**2**	**0,854**	**4**	**1,454**	**6**	0,124	0	0,158	0	0,183	0
11	**0,448**	**2**	**0,556**	**3**	0,292	1	**0,896**	**4**	**1,459**	**6**	0,190	0	0,225	0	0,241	0
12	**0,406**	**2**	**0,404**	**2**	**0,415**	**2**	**0,729**	**4**	**1,043**	**5**	0,167	0	0,354	1	0,270	0
13	**0,468**	**2**	**0,394**	**2**	**0,482**	**2**	**0,425**	**2**	**0,551**	**3**	0,241	0	0,259	0	0,346	1
14	**0,661**	**3**	**0,461**	**2**	**0,627**	**3**	**0,642**	**3**	**1,013**	**5**	0,301	1	0,189	0	0,144	0
15	**0,405**	**2**	**0,657**	**3**	**0,398**	**2**	**0,665**	**3**	**0,587**	**3**	0,366	1	0,241	0	0,237	0
22	**0,816**	**4**	**1,115**	**5**	**0,554**	**3**	**0,735**	**4**	**0,845**	**4**	0,282	1	0,174	0	0,172	0
29	**0,694**	**4**	**0,926**	**5**	**1,137**	**5**	**0,473**	**2**	**1,048**	**5**	0,233	0	0,176	0	0,332	1
36	**0,488**	**2**	**0,490**	**2**	0,241	0	**0,487**	**2**	**0,694**	**5**	0,234	0	0,318	1	0,134	0
43	**0,630**	**3**	**0,461**	**2**	**0,802**	**4**	**0,656**	**3**	**0,518**	**3**	0,281	1	**0,561**	**3**	0,237	0
50	**1,032**	**5**	**0,866**	**4**	**0,441**	**2**	**0,437**	**2**	**1,400**	**6**	0,235	0	0,238	0	0,211	0
57	**0,544**	**3**	**0,499**	**2**	**0,561**	**3**	**0,940**	**5**	**0,888**	**4**	0,367	1	0,292	1	0,256	0
64	**0,392**	**2**	**0,875**	**4**	**0,744**	**4**	**0,604**	**3**	**1,844**	**7**	0,146	0	0,244	0	0,299	1
71	**1,100**	**5**	**0,931**	**5**	**1,102**	**5**	**0,665**	**3**	**1,311**	**6**	0,220	0	**0,475**	**2**	0,117	0
78	**0,792**	**4**	**1,013**	**5**	**0,919**	**5**	**0,730**	**4**	**1,710**	**7**	0,263	0	0,299	1	0,172	0
85	**0,446**	**2**	**0,907**	**4**	**0,686**	**4**	**0,586**	**3**	**1,363**	**6**	**0,573**	**3**	0,321	1	0,253	0
92	**0,455**	**2**	**0,949**	**5**	**1,040**	**5**	**0,816**	**4**	**1,442**	**6**	0,213	0	0,262	0	0,177	0
99	**1,400**	**6**	**1,271**	**6**	**0,954**	**5**	**0,853**	**4**	**1,484**	**6**	0,244	0	0,290	1	**0,421**	**2**
106	**0,701**	**4**	**0,878**	**4**	**0,729**	**4**	**0,495**	**2**	0,344	1	0,180	0	0,315	1	0,233	1
113	**0,923**	**5**	**0,872**	**4**	**0,844**	**4**	**0,594**	**3**	**1,499**	**6**	0,289	1	0,369	1	**0,396**	**2**
120	**0,816**	**4**	**0,892**	**4**	**0,741**	**4**	**0,619**	**3**	**0,701**	**4**	0,169	0	0,231	0	0,196	0
127	**0,566**	**3**	**0,571**	**3**	**0,724**	**4**	**0,596**	**3**	**0,844**	**4**	0,238	0	0,209	0	0,289	1
134	**0,680**	**4**	**1,102**	**5**	**0,861**	**4**	**1,065**	**5**	**2,170**	**7**	0,372	1	0,340	1	0,230	0
141	**1,084**	**5**	**1,239**	**6**	**1,255**	**6**	**1,064**	**5**	**1,562**	**6**	0,279	1	0,114	0	0,149	0
148	**0,493**	**2**	**0,880**	**4**	**1,400**	**6**	**1,068**	**5**	**0,852**	**4**	0,259	0	**0,389**	**2**	0,248	0
155	**0,994**	**5**	**0,975**	**5**	**1,018**	**5**	**0,995**	**5**	**1,872**	**7**	0,268	0	0,273	0	**0,402**	**2**
162	0,366	**1**	**1,116**	**5**	**1,072**	**5**	**0,915**	**4**	**1,498**	**6**	0,242	0	0,318	1	0,195	0
169	**0,718**	**4**	**0,685**	**4**	**0,483**	**2**	0,290	1	**0,651**	**3**	0,194	0	0,306	1	0,201	0
176	**0,497**	**2**	**1,045**	**5**	**0,618**	**3**	0,361	1	**1,323**	**6**	0,094	0	0,219	0	0,133	0
183	**0,578**	**3**	**1,145**	**5**	**0,634**	**3**	**0,551**	**2**	**1,101**	**5**	0,103	0	0,227	0	0,347	1
190	**0,686**	**4**	**1,358**	**6**	0,333	1	**0,717**	**4**	0,332	1	0,199	0	0,258	0	0,167	0
197	**0,918**	**5**	**0,674**	**3**	**0,672**	**3**	**0,460**	**2**	**1,107**	**5**	0,327	1	0,147	0	0,231	0
204	**0,686**	**4**	**0,786**	**4**	**0,428**	**2**	**0,472**	**2**	**0,962**	**5**	0,241	0	0,181	0	0,223	0
218	**1,107**	**5**	**1,162**	**5**	**0,776**	**4**	**1,267**	**5**	**1,233**	**5**	0,237	0	0,193	0	0,329	1
232	**0,816**	**4**	**0,292**	**1**	**0,505**	**3**	**0,912**	**4**	**0,892**	**4**	0,250	0	**0,394**	**2**	0,206	0
246	**0,399**	**2**	**0,493**	**2**	**1,029**	**5**	**0,717**	**4**	**0,689**	**4**	0,238	0	0,290	1	0,202	0
260	**1,096**	**5**	**1,174**	**5**	**0,872**	**4**	**0,384**	**2**	**1,164**	**5**	0,120	0	0,091	0	0,133	0
274	**1,407**	**6**	**0,913**	**4**	**1,196**	**5**	**0,849**	**4**	**1,714**	**7**	0,207	0	0,150	0	0,225	0
288	**1,367**	**6**	**1,203**	**5**	**0,991**	**5**	**0,695**	**3**	**0,779**	**4**	0,107	0	0,237	0	0,213	0
302	**0,537**	**3**	**0,660**	**3**	**0,838**	**3**	**0,622**	**3**	**1,461**	**6**	0,245	0	0,350	1	0,281	1
316	**0,376**	**2**	0,366	1	**1,151**	**5**	**0,493**	**2**	**0,870**	**4**	0,252	0	0,103	0	0,086	0
330	**0,779**	**4**	**0,657**	**3**	0,208	0	**0,554**	**3**	**0,490**	**2**	0,216	0	0,140	0	0,118	0
344	**0,826**	**4**	**0,708**	**4**	**0,404**	**2**	0,367	1	**0,661**	**3**	0,202	0	0,267	0	0,223	0
358	**0,782**	**4**	**0,529**	**3**	**0,768**	**4**	**0,466**	**2**	**0,597**	**3**	0,115	0	0,104	0	0,164	0
372	**0,364**	**1**	**0,612**	**3**	**0,992**	**5**	**0,786**	**4**	**0,724**	**4**	0,093	0	0,263	0	0,111	0
402	**0,461**	**2**	**0,494**	**2**	0,306	1	0,344	1	0,372	1	0,158	0	0,252	0	0,094	0
432	**0,684**	**4**	0,246	1	**0,454**	**2**	**0,534**	**3**	**0,418**	**2**	0,283	0	0,100	0	0,126	0
462	0,370	1	**0,442**	**2**	**0,509**	**3**	**0,514**	**3**	**0,442**	**2**	0,178	0	0,336	0	0,277	1
492	**1,400**	**6**	**0,599**	**3**	**0,572**	**3**	**0,658**	**3**	**0,779**	**4**	0,094	0	0,259	0	0,134	0
522	0,297	1	**0,666**	**3**	**0,469**	**2**	**0,663**	**3**	**0,527**	**3**	0,234	0	0,163	0	0,182	0

DAI – dias após a inoculação; DO- Densidades óticas; NE – Níveis de ELISA

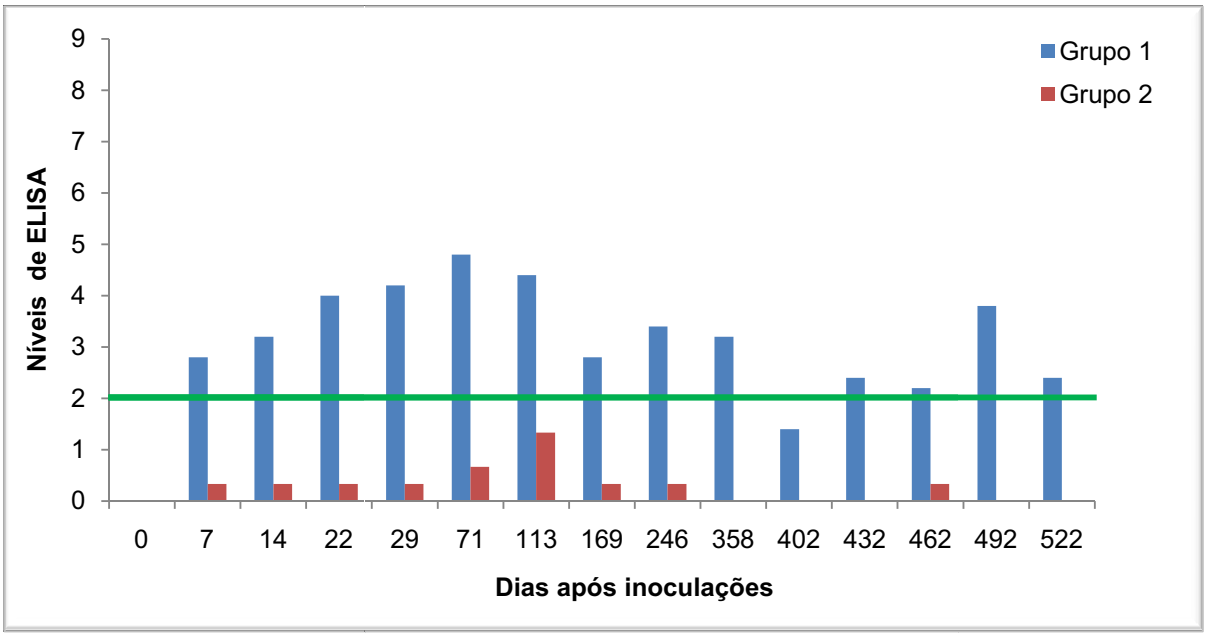

Figura 32. Niveis de Elisa obtidos no estudo da Resposta imune humoral (ELISA-teste) de bovinos inoculados com *T. evansi* (G1) e comparado com os resultados do grupo testemunho (G2), durante 522 dias de observação.
— Ponto de corte (NE = 2 ou DO ≥ 0,374)

4.6.2 Comparação entre detecção da resposta imune humoral através da RIFI e do ELISA-teste

Observou-se concordância entre o teste de ELISA-indireto e RIFI na detecção de anticorpos anti- *T. evansi*. Na analisa dos resultados de co-positividade e co-negatividade pelas duas técnicas obteve-se o índice Kappa de 0,71%. Na análise comparativa, em relação a sensibilidade e especificidade obtivemos 91,9% e 80,3%, respectivamente, para os dois testes.

Dentre as amostras de soros (480), testadas pela RIFI, foi obtido 46,0% (221) de positividade, sendo 53,96% (n=259) de soros negativos ao teste. Em relação a titulação dos soros foi observado 17,085% (n=82) com títulos 1:80, 19,79% (n=95) com título de 1:160, 7,08% (n=34) com títulos de 1;320, 1,67% (n=8) com títulos

1:640 e 0,42% (n=2) com título 1:1280. Pelo ELISA, valores de DO dos soros ≥ 0,374 foram considerados positivos, destes 52,92% (n=254) dos soros foram positivos e 47,08% (n=226) dos soros negativos.

Observou-se que 42,29% (n=203) soros apresentaram-se positivos pelas duas técnicas, enquanto que, 43,33% (n=208) dos soros foram negativos pelas duas técnicas sob-estudo. Foram detectados 3,75% (n=18) soros positivos a RIFI e negativos pelo ELISA, no entanto, 10,63%9 (n=51) soros negativo pela RIFI mostraram-se positivos pelo ELISA (Tabela 16 e 17). Nos bovinos infectados, os níveis de anticorpos de valor diagnosticos foram obtidos entre 14° e 29° DAI pela RIFI e entre 6° e 7° DAI pelo ELISA-teste. Baixos títulos de anticorpos foram obtidos e mantidos durante todo o período experimental pelas duas tecnicas (Figura 33 e 34).

Tabela 16. Correlação entre os resultados sorológicos pela RIFI e pelo ELISA-teste na detecção de co-positividade e co-negatividade em 480 soros de bovinos inoculados com *T. evansi*.

RIFI / ELISA	Positivo	Negativo	Total
	Numero (%)	Numero (%)	
Positivo	203 (42,29)	51 (10,63)	254
Negativo	18 (3,75)	208 (43,33)	226
Total	221	259	480

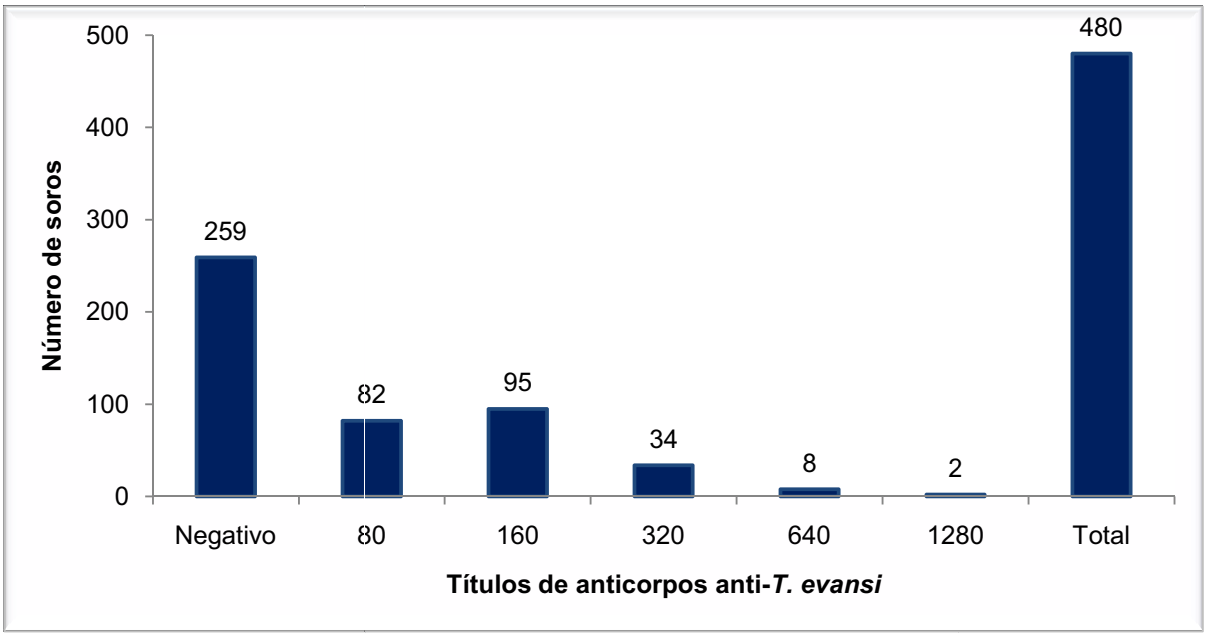

Figura 33. Número e titulação de soros (n=480) de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* pela RIFI.

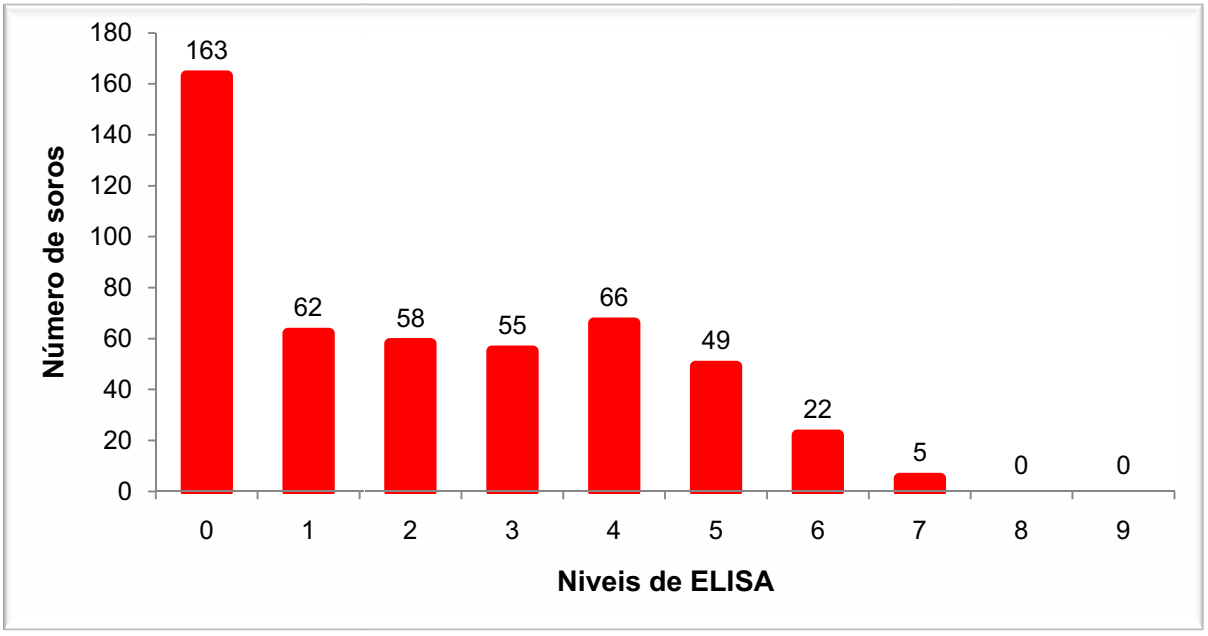

Figura 34. Número de soros positivos distribuídos por Níveis de ELISA, de bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi.*

Tabela 17. Densidades óticas (DO), níveis de ELISA (NE) e títulos de anticorpos anti- T. evansi pela RIFI, de soro de bovinos inoculados com *T. evansi*. O ponto de corte ≥ 0,374 para o ELISA-teste e títulos ≥ 1:80 foram considerados positivos para RIFI.

Grupo	Bovinos inoculados (G1)															Bovinos testemunhos (G2)								
Animais	1			3			6			7			8			2			4			5		
Testes	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI	ELISA		RIFI
DAI	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo	DO	NE	Titulo
0	0,182	0	0	0,181	0	0	0,167	0	0	0,134	0	0	0,136	0	0	0,177	0	0	0,100	0	0	0,198	0	0
1	0,140	0	0	0,259	0	0	0,155	0	0	0,157	0	0	0,279	1	0	0,221	0	0	0,146	0	0	0,276	0	0
2	0,223	0	0	0,113	0	0	0,181	0	0	0,120	0	0	0,112	0	0	0,099	0	0	0,135	0	0	0,169	0	0
3	0,232	0	0	0,240	0	0	0,339	1	0	0,203	0	0	0,102	0	0	0,248	0	0	0,193	0	0	0,258	0	0
4	0,146	0	0	0,119	0	0	0,168	0	0	0,132	0	0	0,340	1	0	0,250	0	0	0,212	0	0	0,348	1	0
5	**0,451**	2	0	**0,397**	2	0	0,303	1	0	**0,395**	2	0	**0,821**	4	0	0,291	1	0	0,313	0	0	0,119	0	0
6	**0,392**	2	0	**0,555**	3	0	**1,154**	5	0	0,358	1	0	0,323	2	0	0,256	0	0	0,161	0	0	0,323	1	0
7	**0,554**	3	0	0,279	1	0	0,181	0	0	**0,841**	4	0	**1,589**	6	0	0,211	0	0	0,325	1	0	0,183	0	0
8	**0,401**	2	0	**0,424**	2	0	**0,517**	3	0	0,291	1	0	**0,733**	4	0	0,244	0	0	0,165	0	0	0,235	0	0
9	0,372	1	0	0,307	1	0	0,372	1	0	**0,885**	4	0	**0,598**	3	0	0,230	0	0	0,221	0	0	0,211	0	0
10	**0,886**	4	0	**0,770**	4	0	**0,437**	2	0	**0,854**	4	0	**1,454**	6	0	0,124	0	0	0,158	0	0	0,183	0	0
11	**0,448**	2	0	**0,556**	3	0	0,292	1	0	**0,896**	4	0	**1,459**	6	0	0,190	0	0	0,225	0	0	0,241	0	0
12	**0,406**	2	0	**0,404**	2	0	**0,415**	2	0	**0,729**	4	0	**1,043**	5	0	0,167	0	0	0,354	1	0	0,270	0	0
13	**0,468**	2	0	**0,394**	2	0	**0,482**	2	0	**0,425**	2	0	**0,551**	3	0	0,241	0	0	0,259	0	0	0,346	1	0
14	**0,661**	3	**80**	**0,461**	2	0	**0,627**	3	0	**0,642**	3	0	**1,013**	5	**80**	0,301	1	0	0,189	0	0	0,144	0	0
15	**0,405**	2	**80**	**0,657**	3	0	**0,398**	2	0	**0,665**	3	0	**0,587**	3	**80**	0,366	1	0	0,241	0	0	0,237	0	0
22	**0,816**	4	**80**	**1,115**	5	0	**0,554**	3	0	**0,735**	4	0	**0,845**	4	**80**	0,282	1	0	0,174	0	0	0,172	0	0
29	**0,694**	4	**80**	**0,926**	5	**80**	**1,137**	5	**80**	**0,473**	2	**80**	**1,048**	5	**80**	0,233	0	0	0,176	0	0	0,332	1	0
36	**0,488**	2	**80**	**0,490**	2	**160**	0,241	0	**80**	**0,487**	2	**80**	**0,694**	5	**80**	0,234	0	0	0,318	1	0	0,134	0	0
43	**0,630**	3	**160**	**0,461**	2	**160**	**0,802**	4	**160**	**0,656**	3	**160**	**0,518**	3	**160**	0,281	1	0	**0,561**	3	0	0,237	0	0
50	**1,032**	5	**160**	**0,866**	4	**1280**	**0,441**	2	**80**	**0,437**	2	**160**	**1,400**	6	**320**	0,235	0	0	0,238	0	0	0,211	0	0
57	**0,544**	3	**160**	**0,499**	2	**320**	**0,561**	3	**80**	**0,940**	5	**80**	**0,888**	4	**320**	0,367	1	0	0,292	1	0	0,256	0	0
64	**0,392**	2	**160**	**0,875**	4	**320**	**0,744**	4	**160**	**0,604**	3	**160**	**1,844**	7	**160**	0,146	0	0	0,244	0	0	0,299	1	0
71	**1,100**	5	**160**	**0,931**	5	**160**	**1,102**	5	**160**	**0,665**	3	**160**	**1,311**	6	**160**	0,220	0	0	**0,475**	2	0	0,117	0	0
78	**0,792**	4	**160**	**1,013**	5	**160**	**0,919**	5	**160**	**0,730**	4	**160**	**1,710**	7	**160**	0,263	0	0	0,299	1	0	0,172	0	0
85	**0,446**	2	**160**	**0,907**	4	**160**	**0,686**	4	**160**	**0,586**	3	**160**	**1,363**	6	**160**	**0,573**	3	0	0,321	1	0	0,253	0	0
92	**0,455**	2	**160**	**0,949**	5	**320**	**1,040**	5	**160**	**0,816**	4	**160**	**1,442**	6	**160**	0,213	0	0	0,262	0	0	0,177	0	0

Continua ...

Continuação

99	**1,400**	6	**160**	**1,271**	6	**320**	**0,954**	5	**160**	**0,853**	4	**160**	**1,484**	6	**160**	0,244	0	0	0,290	1	0	**0,421**	2	0
106	**0,701**	4	**320**	**0,878**	4	**640**	**0,729**	4	**640**	**0,495**	2	**160**	0,344	1	**160**	0,180	0	0	0,315	1	0	0,233	1	0
113	**0,923**	5	**320**	**0,872**	4	**320**	**0,844**	4	**640**	**0,594**	3	**160**	**1,499**	6	**160**	0,289	1	0	0,369	1	0	**0,396**	2	0
120	**0,816**	4	**320**	**0,892**	4	**160**	**0,741**	4	**1280**	**0,619**	3	**320**	**0,701**	4	**320**	0,169	0	0	0,231	0	0	0,196	0	0
127	**0,566**	3	**320**	**0,571**	3	**640**	**0,724**	4	**640**	**0,596**	3	**320**	**0,844**	4	**160**	0,238	0	0	0,209	0	0	0,289	1	0
134	**0,680**	4	**160**	**1,102**	5	**320**	**0,861**	4	**320**	**1,065**	5	**320**	**2,170**	7	**160**	0,372	0	0	0,340	1	0	0,230	0	0
141	**1,084**	5	**160**	**1,239**	6	**160**	**1,255**	6	**640**	**1,064**	5	**160**	**1,562**	6	**320**	0,279	1	0	0,114	0	0	0,149	0	0
148	**0,493**	2	**320**	**0,880**	4	**320**	**1,400**	6	**160**	**1,068**	5	**160**	**0,852**	4	**320**	0,259	0	0	**0,389**	2	0	0,248	0	0
155	**0,994**	5	**320**	**0,975**	5	**640**	**1,018**	5	**320**	**0,995**	5	**160**	**1,872**	7	**160**	0,268	0	0	0,273	0	0	0,402	2	0
162	0,366	1	**160**	**1,116**	5	**320**	**1,072**	5	**640**	**0,915**	4	**320**	**1,498**	6	**160**	0,242	0	0	0,318	1	0	0,195	0	0
169	**0,718**	4	**160**	**0,685**	4	**160**	**0,483**	2	**320**	0,290	1	**320**	**0,651**	3	**160**	0,194	0	0	0,306	1	0	0,201	0	0
176	**0,497**	2	**160**	**1,045**	5	**320**	**0,618**	3	**320**	0,361	1	**160**	**1,323**	6	**80**	0,094	0	0	0,219	0	0	0,133	0	0
183	**0,578**	3	**80**	**1,145**	5	**160**	**0,634**	3	**160**	**0,551**	2	**80**	**1,101**	5	**80**	0,103	0	0	0,227	0	0	0,347	1	0
190	**0,686**	4	**160**	**1,358**	6	**320**	0,333	1	**160**	**0,717**	4	**160**	0,332	1	**80**	0,199	0	0	0,258	0	0	0,167	0	0
197	**0,918**	5	**160**	**0,674**	3	**160**	**0,672**	3	**320**	**0,460**	2	**80**	**1,107**	5	**160**	0,327	1	0	0,147	0	0	0,231	0	0
204	**0,686**	4	**160**	**0,786**	4	**320**	**0,428**	2	**160**	**0,472**	2	**160**	**0,962**	5	**160**	0,241	0	0	0,181	0	0	0,223	0	0
218	**1,107**	5	**80**	**1,162**	5	**160**	**0,776**	4	**160**	**1,267**	5	**160**	**1,233**	5	**160**	0,237	0	0	0,193	0	0	0,329	1	0
232	**0,816**	4	**160**	0,292	1	**160**	**0,505**	3	**320**	**0,912**	4	**80**	**0,892**	4	**160**	0,250	0	0	**0,394**	1	0	0,206	0	0
246	**0,399**	2	**80**	**0,493**	2	**160**	**1,029**	5	**160**	**0,717**	4	**160**	**0,689**	4	**320**	0,238	0	0	0,290	1	0	0,202	0	0
260	**1,096**	5	**80**	**1,174**	5	**160**	**0,872**	4	**160**	**0,384**	2	**80**	**1,164**	5	**160**	0,120	0	0	0,091	0	0	0,133	0	0
274	**1,407**	6	**80**	**0,913**	4	**80**	**1,196**	5	**80**	**0,849**	4	**80**	**1,714**	7	**160**	0,207	0	0	0,150	0	0	0,225	0	0
288	**1,367**	6	**160**	**1,203**	5	**80**	**0,991**	5	**80**	**0,695**	3	**80**	**0,779**	4	**160**	0,107	0	0	0,237	0	0	0,213	0	0
302	**0,537**	3	**80**	**0,660**	3	**160**	**0,838**	3	**160**	**0,622**	3	**80**	**1,461**	6	**160**	0,245	0	0	0,350	1	0	0,281	1	0
316	**0,376**	2	**160**	0,366	1	**160**	**1,151**	5	**160**	**0,493**	2	**160**	**0,870**	4	**80**	0,252	0	0	0,103	0	0	0,086	0	0
330	**0,779**	4	**80**	**0,657**	3	**80**	0,208	0	**80**	**0,554**	3	**160**	**0,490**	2	**80**	0,216	0	0	0,140	0	0	0,118	0	0
344	**0,826**	4	**80**	**0,708**	4	**80**	**0,404**	2	**80**	0,367	1	**80**	**0,661**	3	**80**	0,202	0	0	0,267	0	0	0,223	0	0
358	**0,782**	4	**80**	**0,529**	3	**80**	**0,768**	4	**80**	**0,466**	2	**80**	**0,597**	3	**80**	0,115	0	0	0,104	0	0	0,164	0	0
372	0,364	1	**80**	**0,612**	3	**80**	**0,992**	5	**80**	**0,786**	4	**80**	**0,724**	4	**80**	0,093	0	0	0,263	0	0	0,111	0	0
402	**0,461**	2	**80**	**0,494**	2	**80**	0,306	1	**80**	0,344	1	**80**	0,372	1	**80**	0,158	0	0	0,252	0	0	0,094	0	0
432	**0,684**	4	**80**	0,246	1	**80**	**0,454**	2	**80**	**0,534**	3	**80**	**0,418**	2	**80**	0,283	0	0	0,100	0	0	0,126	0	0
462	0,370	1	**80**	**0,442**	2	**80**	**0,509**	3	**80**	**0,514**	3	**80**	**0,442**	2	**160**	0,178	0	0	0,336	0	0	0,277	1	0
492	**1,400**	6	**80**	**0,599**	3	**80**	**0,572**	3	**80**	**0,658**	3	**80**	**0,779**	4	**80**	0,094	0	0	0,259	0	0	0,134	0	0
522	0,297	1	**80**	**0,666**	3	**80**	**0,469**	2	**80**	**0,663**	3	**80**	**0,527**	3	**80**	0,234	0	0	0,163	0	0	0,182	0	0

DAI – dias após a inoculação; DO- Densidades óticas; NE – Níveis de ELISA; N° em negrito- são resultados positivo.

4.7 Achados anatomopatológicos

4.7.1 Lesões macroscópicas

Não se observaram alterações macroscópicas nos bovinos inoculados e testemunhos.

4.7.2 Lesões microscópicas

O exame histopatológico permitiu evidenciar que o animal 01 apresentou hiperplasia linfóide de linfonodo e o animal 03 apresentou hiperplasia linfóide de nódulo hemolinfático (Figura 35 e 36).

Não foi observada nemhuma alteração histopatológica nos bovinos do grupo testemunho.

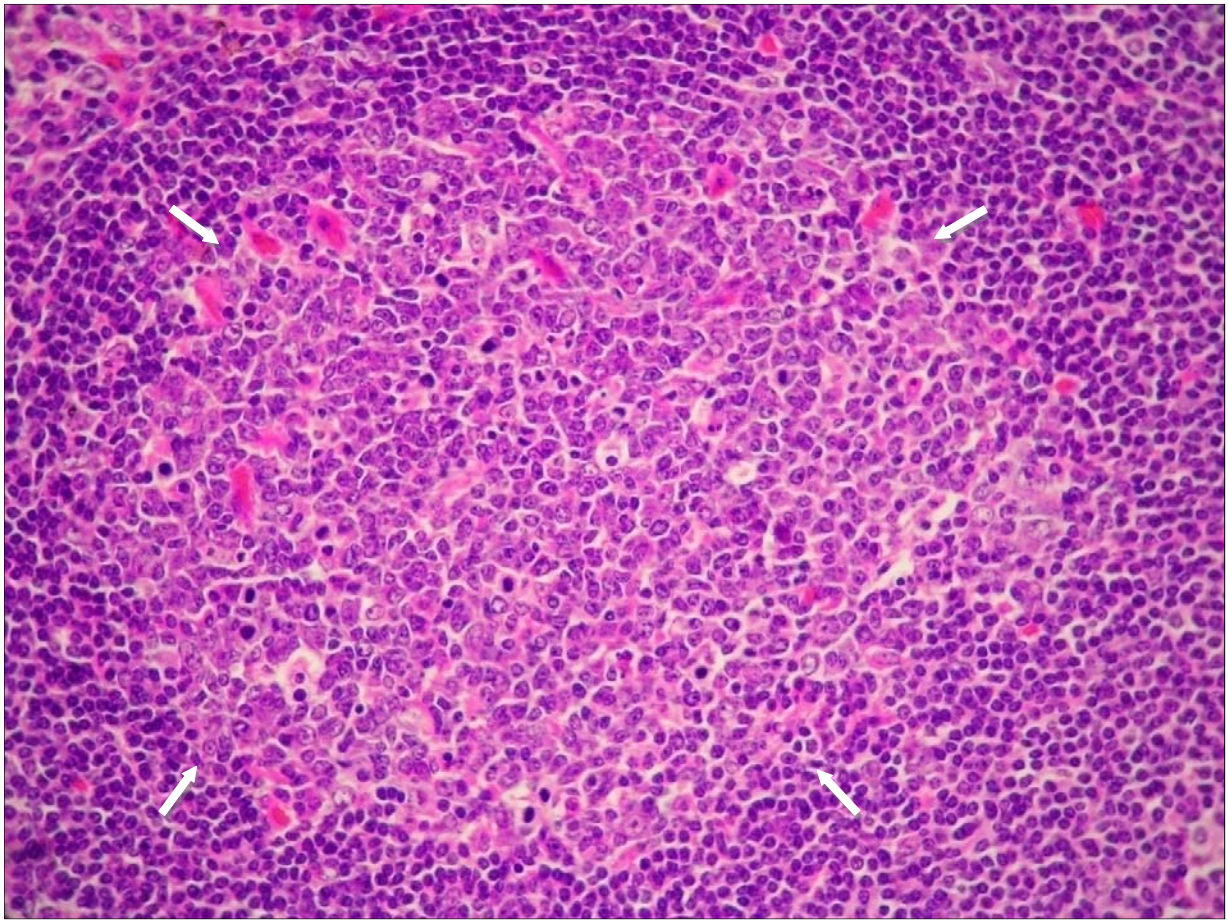

Figura 35. Fotomicrografia de linfonodo de bovino experimentalmente inoculado com *T. evansi*. Notar hiperplasia linfóide, folículo delineado e grande número de células em mitose (Flechas) (HE, 40X). Animal 01 (525 DAI).

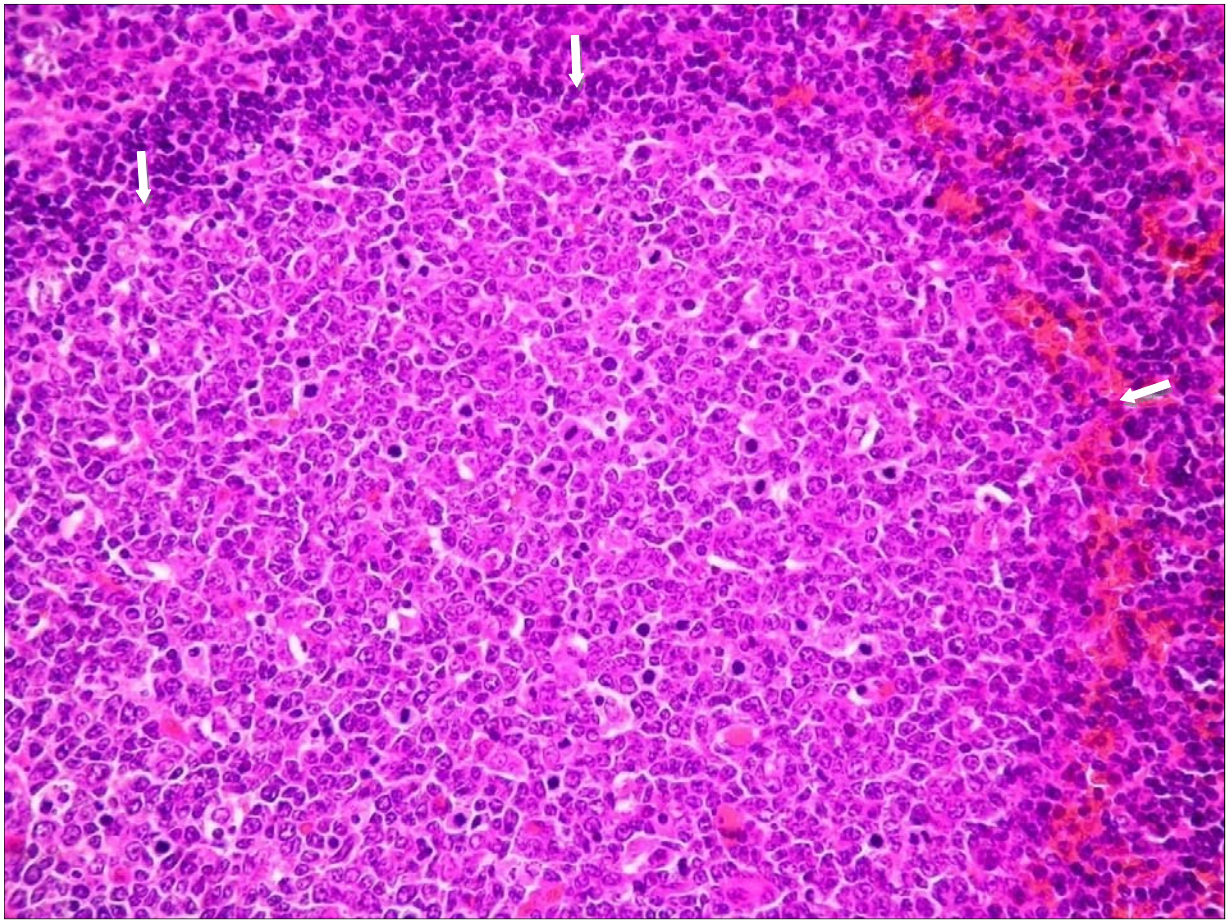

Figura 36. Fotomicrografia de nódulo hemolinfático de bovino experimentalmente inoculado com *T. evansi*. Notar folículo delineado e grande número de células em mitose (Flechas) (HE, 40X). Animal 03 (525 DAI).

5. DISCUSSÃO

Tripanossomiase é uma das doenças dos animais e do homem de alta relevância em todo mundo. Ela pode conduzir a uma considerável subexploração dos recursos naturais e a um baixo nível de produção animal (SILVA et al., 1997). No Brasil, *T. evansi* afeta principalmente eqüinos e a prevalência da infecção varia entre regiões (HERRERA et al., 2004). Este parasito, também, pode causar doença clínica em cães, camelos, cabras, capivaras, bovinos e búfalos. Entretanto, relatos sobre o efeito patogênico de *T. evansi* em bovinos, ovelhas e cabras são contraditórios, pois, alguns autores consideram que este protozoário causa nestas espécies apenas infecção subclínica (NGERANWA et al., 1993), e outros defendem que *T. evansi* afeta ruminantes domésticos, causando abortamentos, infertilidade, baixa produtividade e morte (PAYNE et al., 1992; DESQUESNES et al., 2001; SILVA et al., 2007). Também, FRANKE et al. (1994) ao estudarem a ocorrência de *T. evansi* em eqüinos, bovinos, cães e capivaras na sub-região do Pantanal de Poconé, encontraram prevalências de 9,6%, 4,2%, 18,6% e 14,0% respectivamente, utilizando ELISA- teste para detecção de anticorpos anti-*T. evansi*. Recentemente na região norte do Pantanal de Mato Grosso, SANTOS et al. (2009) relataram óbito e a constatação de tripanossomíase em bovino e cães infectados naturalmente por *T. evansi*. Assim, para a maioria das espécies doméstica e de vida livre que vivem nas regiões endêmicas, faltam estudos comprobatórios sobre a relação parasita hospedeiro e o real impacto econômico e ambiental desta enfermidade.

A inoculação experimental de bovinos com *T. evansi* possibilitou verificar que a infecção por este protozoário segue curso subclínico ou crônico. A presença de tripomastigotas no sangue perférico não foi observada através dos métodos parasitológicos diretos, demonstramdo que os bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* apresentaram baixas parasitemias ao longo do período de observação, indicando baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos diretos. Segundo MONZON et al. (1984) o diagnóstico por meios parasitológicos diretos são mais efetivos quando os parasitas estão presentes em grande número no sangue periférico. Baixas

parasitemias, também, em condições experimentais, ocorreram em bovinos (POCHINI, 2000), ovinos (PASSOS, 2004) e cabras (PATELLI, 2006). Por outro lado, altas parasitemias foram observadas em eqüinos (MARQUES, 1996), cães (AQUINO, 1997), quatis (HERRERA, 1998) e muares (CADIOLI, 2001). Entretanto, longos períodos com baixa parasitemia e grandes intervalos aparasitêmicos, tem sido relatado em infecções crônicas por este protozoário (LOSOS, 1980).

Pela prova biológica, detectou-se *T. evansi* nos bovinos 01, 06 e 08 no 15° DAI, 06 e 07 no 30° DAI, 01 e 06 no 45° DAI, 06 no 60° DAI e 01 no 75° DAI. Portanto, é possível afirmar que a despeito da baixa parasitemia, os bovinos inoculados albergaram *T. evansi* por pelo menos 75 dias. Entretanto, tais resultados diferem dos encontrados em bovinos (POCHINI, 2000), ovinos (PASSOS, 2004) e caprinos (PATELLI, 2006), os quais detectaram a presença do tripomastigota pela prova biológica até 163°, 300° e 365° DAI, respectivamente.

O período pré-patente, ou seja, o tempo entre a infecção natural ou experimental e o aparecimento da parasitemia tem duração de aproximadamente duas semanas (BOERO, 1974, PATELLI, 2006). Nos bovinos inoculados verificou-se período pré-patente de 15 a 30 dias. Em bovinos experimentalmente infectados VERMA & GAUTAM (1982) observaram período pré-patente de oito dias e JOHN et al. (1995) de seis a 14 dias. MARQUES (1996), CADIOLI (2001) e PASSOS (2004) verificaram período pré-patente de quatro dias em cavalos e de seis dias em jumentos e ovinos, respectivamente. Possivelmente, tais variações decorram das diferenças entre a patogenicidade das cepas de outra origem e da susceptibilidade às diferentes espécies animais estudadas.

O grupo inoculado com *T. evansi* (G1) apresentou temperatura retal ligeiramente mais elevada no 29°, 30°, 33°, 35°, 36°, 42°, 44°, 54°, 67°, 74°, 81°, 109° e 200° DAI. Entretanto, os valores aferidos, apesar de serem maiores do que os verificados no grupo testemunho, estavam dentro dos limites de normalidade para a espécie bovina (ROSEMBERGER, et al., 1993) e não houve indícios de que os animais inoculados com *T. evansi* apresentaram febre, embora, a hipertermia seja um achado comum em animais infectados naturalmente ou experimentalmente com *T. evansi* (SINGH &

GAUR, 1983; MARQUES, 1996; AUDU et al., 1999). No entanto, POCHINI (2000) e HERRERA (2002) não observaram hipertermia em bovinos e quatis experimentalmente infectados com este hematozoário.

A frequência cardíaca, frequência respiratória e movimentos ruminais, em média, mantiveram mais elevados nos animais infectados com *T. evansi*. Entretanto estes dados, também, permaneceram dentro dos valores normais considerados para a espécie bovina. A ausência de sinais clínicos patognomônicos, permite inferir que os bovinos infectados com a cepa de *T. evansi* empregada neste estudo, comportaram-se como hospedeiros reservatório assintomático da doença. Embora, esta designação seja relativa, pois sob certas circunstâncias, estes podem manifestar sinais de doença (LOSOS, 1980). Ausência de sinais clínicos também foram descritos em bovinos (POCHINI, 2000), ovinos (PASSOS, 2004) e caprinos (PATELLI, 2006), todos experimentalmente infectados com a mesma cepa de *T. evansi*.

Aumento de volume de linfonodos foi evidenciado por POCHINI (2000) em bovinos. Neste estudo, o bovino 08 (G1) apresentou discreto aumento dos linfonodos cervicais que se iniciou no 7º DAI, permanecendo, assim, até o final do período de observação, ou seja 525° DAI. Ainda neste mesmo animal, evidenciou-se edema de pálpebras do 134° ao 136° DAI. De acordo com HOARE (1972), na fase aguda a “surra” pode ser caracterizada por hipertrofia de linfonodos com aumento da sensibilidade e na fase crônica por linfonodos aumentados de volume. Linfoadenopatia generalizada é um achado freqüente em animais infectados pelo *T. evansi,* sendo relatado em bovinos (SINGLA et al., 1996), bubalinos (SINGH & GAUR, 1983), eqüinos (MARQUES, 1996) e cães (AQUINO et al. 2002). Outros sinais clínicos, tais como congestão de membranas mucosas, epífora, conjuntivites, descargas nasais e oculares mucoides, salivação, fraqueza, desidratação, hipertermia, perda de peso e orquites são frequentemente relatados em animais infectados por este hemoparasita (NGERANWA et al., 1991; SINGLA et al. 1996). Ainda, SANTOS et al. (2009) na região norte do Pantanal de Mato Grosso em fevereiro de 2007, relataram emagrecimento progressivo, moderada diarréia, edemas submandibulares, seguidos de quedas frequentes, inanição, decúbito e morte em bovinos naturalmente infectados com *T. evansi*. Ressalta, ainda, que dois

meses precedendo os óbitos dos bovinos, síndrome clínica similar foi constatada em cães na mesma propriedade e próximas a esta. Entretanto, infecções assintomáticas, também, já foram demonstradas experimentalmente em bovinos, caprinos, suínos e ovinos (WELLS, 1984).

Nos bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* não se verificou alterações físicas e celulares no líquido cefalorraquidiano e nem observação do parasita no mesmo. BOERO (1974) afirma que durante as fases de defesa do organismo, o tripomastigota localiza-se no líquido cefalorraquidiano, retornando à circulação sangüínea com alterações antigênicas que possibilitam novas fases de multiplicação. Sabe-se que a resposta do hospedeiro aos antígenos de superfície são altamente imunogênicos e induzem uma potente resposta lítica de anticorpos no hospedeiro infectado e que a eficiência dessa resposta na eliminação do parasito é comprometida pela sua capacidade em alterar a matriz de glicoproteína de sua superfície (VSG) durante o curso da infecção (VICKERMAN, 1978). Segundo SINGLA et al., (1996) e TUNTASUVAN et al. (1997) *T. evansi* oculta-se no líquido cefalorraquidiano tornando-se inatingível pelo sistema imunológico. O que possibilita ao tripanossomo esquivar-se da resposta imune do hospedeiro, assim, a cada resposta de anticorpos os parasitas modificam seus antígenos de superfície, contra os quais o hospedeiro produz nova resposta de anticorpos, induzindo sucessivas ondas de parasitemia e populações antigenicamente diferente. Entretanto, a natureza exata das alterações em determinados órgãos durante a infecção pelo tripanossoma e os eventos que levam as conseqüências fatais em animais, ainda não estão bem esclarecidos (SEED, 1969; TIZARD, 1998). Infere-se que os bovinos deste experimento eliminaram o parasita provavelmente após o 75° DAI.

As contagens de hemácias, as dosagens de hemoglobina e os volumes globulares, dos bovinos inoculados apresentaram variações dentro dos limites fisiológicos considerados normais para a espécie bovina. O volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular não revelaram alterações significativas no decorrer dos 522º dias de observação. Achados semelhantes foram descritos por POCHINI (2000) em bovinos, PASSOS (2004) em

ovinos e PATELLI (2006) em caprinos, experimentalmente infectados com este hemoprotozoário. Apesar de anemia ser um achado freqüente na maioria das espécies animais acometidas por esta tripanossomíase (BOERO 1974; MARQUES, 1996; CADIOLI, 2001; AQUINO, et al., 2002; HERRERA, et al., 2004), nos bovinos do presente estudo não se verificou alterações hematológicas compatíveis com este distúrbio. Anemia microcítica hipocrômica foi descrita em bovinos experimentalmente infectados com *T. evansi* na Índia (SINGH & MISRA, 1988).

O número de leucócitos, contagens de linfócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos segmentados e bastonetes apresentaram valores dentro da normalidade para espécie bovina. Pode-se notar apenas, discreta monocitopenia em ambos grupos, inoculados (G1) e testemunho (G2). Assim, não foi possível verificar nos bovinos inoculados com *T. evansi* um padrão de resposta leucocitária. Entretanto, JAIN (1989) relata a presença de leucopenia, atribuída a mielopoiese deficiente nos casos de tripanossomíases. Segundo HOLMES (1987) a leucocitose com desvio a esquerda é um achado característico das tripanossomíases africanas. No entanto, SINGH & GAUR (1983) não observaram alterações na contagem de leucócitos em bubalinos infectados com *T. evansi*. Já MARQUES (1996) e HERRERA et al. (2002) relataram leucocitose neutrofílica e linfocitopenia relativa em eqüinos e quatis, respectivamente. AQUINO et al., (2002) constataram leucopenia com neutropenia em cães e POCHINI (2000) observou neutropenia com linfocitose em bovinos infectados com a mesma cepa de *T. evansi*. HILALI et al. (2006) observaram significativo aumento na contagem de leucócitos em bubalinos infectados com *T. evansi*.

Pelo exposto, as evidências demonstram que o padrão de resposta leucocitária em animais infectados com *T. evansi* é bastante variável, portanto, o leucograma demostrou ser um método de valor limitado no diagnóstico e na avaliação da patogenicidade dessa tripanossomíase.

Os teores sérico de proteína total dos animais infectados demonstraram alterações significantivas apenas pontuais quando comparados com bovinos testemunhos. Observações semelhantes foram feitas por MARQUES (1996) e HERRERA (1998), mas diferiram das observações feita por KATHIRA & AVSATTHI

(1985) os quais verificaram reduções nos teores sérico de proteína total de bezerros bubalinos infectados com *T. evansi.*

Os níveis sérico de albumina mantiveram-se inalterados durante o período experimental, valores semelhantes foram verificados por POCHINI (2000) em bovinos. Segundo BOID et al. (1980) aumentos nos teores de globulinas são decorrentes da produção constante de gamaglobulinas como resposta imunológica contra o parasita e parecem estar relacionados com o fenômeno da variação antigênica (TEVERNE & BRADLEY, 1999).

Os teores plasmáticos de glicose sofreram alterações pontuais. Ainda assim, permaneceram dentro dos limites considerados normais para a espécie bovina. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por POCHINI (2000) em bovinos. Hipoglicemia é um distúrbio frequentemente observado em animais infectados por este tripanossoma, podendo estar correlacionado com a severidade da doença (JAIN, 1993; MENEZES et al., 2004), uma vez que *T. evansi* é considerado o maior consumidor de glicose dentre os membros deste gênero (WOO, 1977). A redução dos teores de glicose estão associados ao seu rápido consumo pelo parasita e à hipertermia, a qual estimula as funções glandulares, aumentando as reservas de glicogênio hepático (SINGH & JOSHI, 1991; PRUDHVI REDDY & HAFEZ, 1996).

Nos bovinos inoculadas com *T. evansi* não se verificou hipoglicemia, possivelmente, devido à baixa parasitemia e as condições de manejo nutricional adequado. De acordo com BOERO (1974) o teor de glicose plasmática possui correlação negativa com a parasitemia.

Neste experimento, observou-se que os bovinos inoculados apresentaram alterações dos índices ictéricos apenas em um momento no 372° DAI, valores estes que corroboram com os encontrados por POCHINI (2000) em bovinos, PASSOS (2004) em ovinos e PATELLI (2006) em cabras. Embora icterícia tenha sido verificada por MARQUES (1996) em eqüinos e por CADIOLI (2001) em muares. Segundo BOERO (1974), a icterícia é um achado característico na fase inicial desta tripanossomíase.

Identificou-se nos animais experimentais 26 proteínas com pesos moleculares que variaram entre 20 e 245 KD, sendo que oito foram identificadas nominalmente

(imunoglobulina A (IgA), ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G (IgG) de cadeia pesada, haptoglobina, glicoproteína ácida e imunoglobulina G (IgG) de cadeia leve). Também, PASSOS (2004) relatou em ovinos a preseça de 45 frações protéicas com pesos moleculares que variaram de 12 a 205 KD, TEIXEIRA et al. (2008) trabalhando com ratos Wistar identificaram 31 proteinas distintas com pesos que variaram de 12 a 165 KD e PATELLI (2006) trabalhando com caprinos identificou 22 proteinas cujos pesos variaram de 16 a 165 KD. PASSOS (2004) sugere que as proteínas não identificadas sejam produtos oriundos da degradação dos parasitas.

Dentre as proteínas encontradas, cinco são consideradas como proteínas de fase aguda: ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida. Porém TEIXEIRA (2006) em ratos Wistar identificaram sete proteínas de fase aguda. A maioria destas proteínas de fase aguda são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos como consequência de injúrias, traumatismos ou infecções teciduais (BAUMANN & GAULDIE, 1994).

A ceruloplasmina apresentou aumentos significativos no 288°, 302°, 316°, 330° e 492° DAI. Em pôneis após quatro horas da indução de laminite, houve aumento significativo da concentração plasmática de ceruloplasmina (FAGLIARI et al. 1997). Aumento significativo de ceruloplasmina foi observado duas horas após inoculação de bezerros com *Mannheimia haemolytica* (FAGLIARI et al., 2003). A ceruloplasmina foi mais sensível para detecção de doenças inflamatórias em cães (SOLTER et al., 1991). Porém, tais reultados diferem daqueles encontrados por TEIXEIRA et al. (2008) em ratos, pois verificaram-se reduções significativas desta proteína nos estágios iniciais e intermediários da evolução da doença.

Transferrina apresentou elevações significatiavas no 57°, 316°, 330° DAI e redução no 288° DAI. A transferrina é considerada proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de inflamação KANEKO (1997). Elevação nas concentrações desta proteína também foram verificadas por PATELLI (2006) e TEIXEIRA et al. (2008) em caprinos e ratos, respectivamente. PASSOS (2004), trabalhando com a mesma cepa de *T. evansi*, não observou alterações nas concentrações da transferrina em ovinos infectados experimentalmente.

Albumina apresentou elevação significativa no 522° DAI e reduções no 462° e 492° DAI. Esta é considerada uma proteína de fase aguda negativa, cujos valores séricos tendem a decrescer em uma condição inflamatória (KANEKO, 1997). Teores séricos de albumina nos ovinos inoculados com *T. evansi* foram relativamente menores durante o período experimental, devido ao aumento das globulinas (PASSOS, 2004). Reduções significativas desta proteína em ratos infectados experimentamente com *T. evansi* foram observados por TEIXEIRA et al. (2008).

Haptoglobina apresentou aumento no 432° DAI. Elevações e diminuições desta proteína em vários períodos, foram observados nos ovinos infectados com *T. evansi* (PASSOS, 2004). Em camundongos infectados com *T. brucei*, a haptoglobina somente foi detectada dois dias após a inoculação e sua concentração máxima foi verificada aos dez dias de evolução (NGURE et al., 1997).

A glicoproteína ácida apresentou aumentos no 402° e 492° DAI. PATELLI (2006) trabalhando com caprinos infectados com a mesma cepa de *T.evansi*, não verificou alteração significativa desta proteína, entretanto PASSOS (2004) em ovinos detectou aumentos significativos do 5º ao 7º DAI e nova elevação desta proteína em torno do 42º DAI. Bezerros infectados pela *M. haemolytica* demosntraram aumento significativo da glicoproteína ácida duas horas após a inoculação (FAGLIARI et al. 2003).

A IgA apresentou reduções significativas em dias variáveis ao longo do período de observação, semelhante ao ocorrido em ratos infectados com a mesma cepa (TEIXEIRA et al., 2008), porém, o significado destas alterações ainda são desconhecidos.

A IgG de cadeia pesada apresentou aumentos significativos no 274°, 316°, 358°, 402° e 492° DAI e IgG de cadeia leve não apresentou alterações significativos. Animais tolerantes ao *T. congolense*, produzem altos níveis de imunoglobulinas G (IgG) contra a cisteína protease, tal enzima, contribui para a patologia da infecção, e a IgG, parece ser parcialmente responsável pela tolerância ao parasita (TIZARD, 2008). UCHE et al. (1992) observaram que as imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) conferem em coelhos resistência ao *T. evansi* e que os anticorpos têm propriedades que podem destruir o protozoário. Entretanto, há evidências de que reação a imunidade humoral

desempenha importante função na patogênese dessas tripanossomíases. Os tripanossomas utilizam de variações antigênicas repetidamente de forma eficaz e estes antígenos de superfície são altamente imunogênicos e induzem potente resposta de anticorpos no hospedeiro infectado. Tais variações antigênicas, permitem ao tripanossoma evadir-se da resposta imune do hospedeiro e a cada resposta de anticorpo, alteram seus antígenos de superfície, contra os quais o hospedeiro promove nova resposta de anticorpos, levando a sucessivas ondas de parasitemia e populações de tripanossomas antigenicamente diferentes. Dessa maneira, a infecção pode levar à uma ativação policlonal de células B, o que explicaria os altos níveis de anticorpos encontrados nas infecçãos por *T. evansi* (AQUINO, 2007 e TIZARD, 2008).

A pesquisa de anticorpos anti-*T. evansi* revelou que os bovinos inoculados apresentaram resposta imune humoral pela RIFI a partir do 14° DAI. Títulos de anticorpos anti-*T. evansi* nos animais inoculados oscilaram entre 1:80 a 1:1280. Estes achados são semelhantes aos verificados por PASSOS et al. (2006) e PATELLI et al. (2007), os quais observaram resposta imune a partir do 14° DAI em ovinos e caprinos inoculados com a mesma cepa de *T. evansi.* MARQUES et al. (2001) em infecção experimental em eqüinos observaram anticorpos anti-*T. evansi* (títulos ≥ 1:80) a partir do 8°, 9° e 11° DAI, AQUINO et al. (1999) em cães detectaram anticorpos anti-*T. evansi* a partir do 12° DAI e CADIOLI (2001) em jumentos observaram anticorpos a partir do 4° DAI e os títulos de anticorpo. Pelo expostos, nota-se que a resposta imune humoral à *T. evansi*, variou de 4 a 15 dias pela RIFI utilizando-se a mesma cepa.

Todos os bovinos infectados neste experimento, apresentaram respostas imunes humorais à RIFI (títulos ≥ 1:80) á partir do 14° e 29° DAI e pelo ELISA-teste a partir do 5° e 6° DAI. Em média no ELISA, os inversos dos títulos de anticorpos sofreram maiores elevações após a 3° semana de evolução e estes títulos começaram a reduzir a partir da 16° semana. Em eqüinos (MARQUES, 1996), cães (AQUINO et al., 1999) e jumentos CADIOLI et al. (2006) infectados com a mesma cepa de *T. evansi*, utilizada neste estudo, observaram anticorpos anti-*T. evansi* à RIFI e ao ELISA-teste a partir do 8°, 9° e 11° DAI, 15° e 15° DAI e 12° e 19°, respectivamente. Dos 480 soros avaliados durante o período experimental observou-se que para RIFI, títulos maiores de 1:80,

considerados positivos, foram detectados em 221 (46,04%) soros, enquanto que 259 (53,96%) soros foram negativos ao teste. Para o ELISA- teste, DO acima de 0,374 foram considerados positivos, destes 254 (53,13%) soros foram positivos e 226 (47,08%) soros negativos. Pode-se observar que as amostras positivas pelo ELISA-teste e negativas pela RIFI, apresentaram valores de DO muito próximos do valor do ponto de corte. Assim, podemos observar que a maior sensibilidade do ELISA, foi capaz de detectar níveis de anticopos no grupo inoculado mais precocemente (a partir do 5° DAI) que a RIFI. O ELISA-teste diagnosticou sete resutados positivos no grupo testemunho, sendo estes considerados falso positivos, sendo assim, podemos inferir que a RIFI mostrou-se mais específica e o ELISA mais sensível na detecção de anticorpos anti-*T.evansi*. Entretanto, vale ressaltar que a comparação entre RIFI e ELISA demosntrou 91,9% de sensibilidade e 80,3% de especificidade e índice Kappa de 0,71% na detecção de anticorpos anti-*T. evansi* o que permite inferir, que os testes apresentaram boa correlação. Os dois testes também apresentaram boa correlação em soros de eqüinos (MARQUES 1996) e cães (AQUINO, 1999) experimentalmente infectados com *T. evansi*.

Os títulos de anticorpos anti-*T. evansi* observados durante os períodos de baixa parasitemia em espécies pouco susceptíveis, como a bovina, indicaram que a RIFI e o ELISA-teste apresentam boa sensibilidade na detecção de infecções latentes ou crônicas, sendo portanto, técnicas indicadas no diagnóstico de *T. evansi*. Ainda, a RIFI e o ELISA-teste tem se mostrado mais sensíveis e de maior valor diagnóstico quando comparadas a outras técnicas sorológicas como a hemaglutinação (VERMA & GAUTMAN, 1978), aglutinação direta (MONZON et al.,1994) e fixação de complemento (BAJYANA et al., 1987). A RIFI apresentou sensibilidade variando de 92,3% a 100% quando empregada em eqüinos (MONZON, 1987; BAKOS & BUSTAMANTE, 1982; MARQUES et al., 2001 e AQUINO, 2007), enquanto no ELISA-teste a sensibilidade variou de 95 a 100% (PAYNE et al., 1991). Em cães experimentalmente infectados com a mesma cepa, ambos os testes apresentaram 100% de sensibilidade (AQUINO et al., 2002). AQUINO (2007) relata que os testes sorológicos para detecção de anticorpos ani-*T. evansi* podem ser utilizados como ferramentas epidemiológicas podendo revelar

tanto infecção ativa, como anticorpos persistentes, indicando, assim, o contato do animal com o protozoário e mais, que o diagnostico das tripanossomíases pelo ensaios sorológiocos, como o ELISA e a RIFI constituem o primeiro passo para um completo estudo sobre a distribuição da doença em bovinos, eqüinos, cães, quatis, etc. Pode-se observar ainda, que os bovinos deste experimento, apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. evansi* e densidades óticas baixas quando comparado com eqüinos, cães e jumentos (MARQUES 1996; AQUINO, 1999; CADIOLI, 2001) que apresentam altos títulos e densidades óticas, além de alterções clínicas e antomopatológicas evidentes da doença.

Nos bovinos experimentalmente inoculados com *T. evansi* verificou-se apenas discretas lesões anatomopatológicas. Tais resultados diferem dos relatados por POCHINI (2000), em bovinos experimentalmente infectados e necropsiados com cerca de cinco meses de evolução, onde verificou-se aumento de volume, a palidez de linfonodos com intensa hiperplasia linfóide, figuras de mitose e diversas áreas hemorrágicas, hiperplasia linfoide em baço, congestão e esteatose hepática, enterite, hepatite centrolobular, pneumonia, meningoencefalite e meningomielite. A não evidenciação de lesões semelhantes nos bovinos do presente estudo possivelmente se deve ao longo período de observação (525 dias), com possibilidades de eliminação do parasita e recuperação do hospedeiro. Hiperplasia linfóide foi um achado comum, também, verificado em caprinos (NGERANWA et al., 1993 e PATELLI, 2006), eqüinos (MARQUES, 1996), quatis (HERRERA, 1998) e ovinos (PASSOS, 2004) infectados com *T. evansi*.

Nos bovinos deste experimento não foram observadas lesões no sistema nervoso central (SNC), tais resultados, corroboram com PASSOS (2004) em ovinos e PATELLI (2006) em caprinos. Embora, DAMAYANTI et al. (1994) em búfalos encontraram, no cérebro nódulos gliais e manguitos perivasculáres com infiltrados linfocíticos e POCHINI (2000) em bovinos verificaram no tronco encefálico discreto processo inflamatório perivascular, lesões com aspectos de nódulos gliais e no córtex cerebral observou manguitos perivasculares e glioses. Alterações envolvendo o SNC em animais infectados por este hematozoário, também, foram relatadas por MARQUES

(1996) em equinos, AQUINO (1997) em cães, SASEENDRANATH et al., (1995) em ovinos, HERRERA (1998) em quatis, SINGH & JOSHI (1991) em bubalinos, NGERANWA (1993) em caprinos. As evidencias demonstraram que a patogenia das lesões causadas pelo *T. evansi* em diferentes espécies animais é multifatorial e depende da associação de diversos fatores, tais como os imunológicos, a virulência da cepa, a susceptibilidade do hospedeiro, o tempo de evolução da doença, a intensidade da parasitemia, aspectos sanitários e alimentares.

Os mecanismos diretamente envolvidos na fisiopatogenia da surra em bovinos ainda não estão bem elucidados. Alguns trabalhos sugerem que esta espécie animal se comporta apenas como reservatório, entretanto, outros relatam que a doença se manifesta claramente. Na presente pesquisa, verificou-se que as condições adequadas de instalações e alimentação a que os animais foram submetidos podem ter contribuído na resistência dos mesmos à infecção, fato reforçado pelo bom desempenho dos animais inoculados ao longo do período experimental. Pelo exposto, certifica-se que os bovinos deste experimento se comportaram apenas como hospedeiro reservatório, não desenvolvendo sinais clinicos evidentes da tripanossomíase.

6 CONCLUSÕES

6.1. A cepa de *T. evansi* isolada por MOREIRA &MACHADO (1985) apresentou baixa patogenicidade para a espécie bovina e a infecção seguiu curso subclínico ou crônico.

6.2. A prova biológica permitiu verificar que os bovinos inoculados albergaram o parasita por pelo menos 75 dias, e, somente um bovino apresentou aumento de linfonodos cervicais.

6.3. Não se verificou nenhuma alteração no líquido cefalorraquidiano dos bovinos inoculados com *T. evansi*, e, também, não se isolou o parasita neste fluido.

6.4. A RIFI mostrou-se mais específica e o ELISA-teste mais sensível para detecção de anticorpos anti-*T. evansi* em bovinos

6.5. A cepa empregada não foi capaz de provocar anemia e lesões teciduais tais como as observadas em outras espécies animais.

6.6. Aduz que a espécie bovina comportou-se como portador assintomático de *T. evansi* por pelo menos 75 dias, o que a caracteriza reservatório, podendo ter implicações na cadeia epidemiológico da doença.

7 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, A. S., BAGGOT, J. D. Influence of induced disease states on the disposition kinetics of imidocarb in goats. **J. Vet. Pharmacol. Ther**., Oxford, v. 9, p. 193-7, 1986.

ATARHOUCH T. et al. Camel trypanosomosis in Marocco 1: results ofirst epidemiological survey. **Vet. Parasit.** Amsterdam, v.111, n.4, p.277–286, 2003.

AQUINO, L. P. C. T. **Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da infecção experimental em cães por *Trypanosoma evansi***. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – área de Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

AQUINO L.P.C.T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v.94, p. 255-260, 1999.

AQUINO, L. P. C. T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,** Belo Horizonte, v. 54, n. 1, p. 8-18, 2002.

AQUINO, L. P. C. T . Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. **Rer. Ciênc. Vet.**, Equador, p. 61-68, 2007.

AUDU, P. A et al. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. **Vet. Parasitol**., Amsterdam,v.86, p.185-90, 1999.

BAKOS, E.; BUSTAMANTE, A. Detection de títulos serológicos anti-*Trypanosoma equinum* em sueros de eqüinos (segunda parte - comparando los títulos serológicos com la parasitemia). **Gac. Vet.,** Buenos Aires v.44, n. 3, p. 65- 69, 1982.

BAJYANA SONGA, E.; KAGERUKA, P.; HAMERS, R. The use of the card agglutination test (Testryp Catt) for the serodiagnosis os *Tripanosoma evansi* infection. **Ann. Soc. Belge Med. Trop**., Brussels, v.67, p.51-7, 1987.

BARRETO, M. P. Importância médica e econômica dos tabanídeos. **Rev. Clin**, São Paulo, v.25, n 5-6, p.11-20, 1949.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol.Today**, Cambridge, v. 15, n. 2, p.74-80, 1994.

BAZOLLI, R. S. et al. Oral transmission of *Trypanosome evansi* in dogs. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 26., 1999, Lyon. **Abstracts**…p.8.

BIDYANTA, J. et al. A sudden outbreak of trypanosomiasis in cattle at Fulia, west Bengal. **Indian J. Anim. Health,** Calcutá, v. 12, p. 185, 1990.

BOERO, J. J. **Parasitosis animales**. 3 rd. ed. Buenos Aires: Eudeba, 1974. 264p.

BOID, R. et al. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Tripanosoma evansi*. **Vet. Parasitol**., Amsterdam, v.6, p.33-345. 1980.

BREM, J. J., MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A. Cambios hematológicos en la Tripanosomiasis equina experimental (*T. equinum*, Vogés 1901). **Rev**. **Mil. Vet**., Buenos Aires, v.32, p. 413-420,1984.

BRUN, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship. Review. **Vet. Parasitol.,** Amsterdam, v. 79, p.95-107, 1998.

CADIOLI, F. A. **Infecção experimental em jumentos (Equus asinus) com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcomastigophora: Trypanomatidae).**2001 135f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. . Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

CADIOLI, F.A. **Estudos metabólicos, hematológicos e anatomopatológicos em ratos wistar infectados com *Trypanosoma evansi*.**2005. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

CADIOLI, F.A. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in donkeys: hematological, biochemical and histopathological changes. **Arq. bras. med. vet. zootec**. V 58, n 5, p.749- 756, 2006.

DAMAYANTI, R. et al. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo. **J. Comp. Pathol**., London, v. 110, p. 237-52, 1994.

DARLING, S. T. Equine tripanosomiasis in the canal zone. **Bull. Soc. Pathol. Exot**., Paris, v.3, p.381-5, 1910.

DÁVILA, A. M. R. et al. The seroprevalence of equine trypanosomosis in the Pantanal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v.94, n.2, p.199-202, 1999.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal trypanosomiasis in Sout America: current status, partnership and information technology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, n. 916, p.199-212, 2000.

DESQUESNES M. *et al***.** The analysis of the cross reactions occurring in antibody-Elisa for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Ann. Trop. Med. Parasitol**., London, v. 95, p.141-153, 2001.

EMBRAPA. **Plano Diretor do Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal-CPAP**. Brasília,1993.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase protein. **Vet. Res. Commun.**, Amesterdam, v.12, p.169-178, 1993.

ECKERSALL, P. D. Acute phase protein as markers of inflammatory lesion. **Comp. Haematol. Int**., London, v.5, p. 93-97, 1995.

FAGLIARI, J.J., SILVA, S.L. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **Am. J. Vet. Res**., Schaumburg, v. 59, n. 10, p. 1234-1237, 1997.

FAGLIARI, et al., Serum protein concentration in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arq. Bras.Méd. Vet. Zootec**., Belo Horizonte, v. 55, n. 4, p. 383- 387, 2003.

FAO/WHO/OIE. **Animal helth**: yearbook. Roma: Kouba, 1982. p.18-25

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, l981. 279p.

FRANKE, C.R. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras *(Hydrochaeris hydrochzeris)* in Pantanal de Pocone (Mato Grosso Brazil). **Acta Trop**., Amesterdam, v. 58, p.159-169. 1994.

GODSON, D. L. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the phase response in bovine respiratory disease. **Vet. Immunol. and Immunopathl.**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p.277-292, 1996.

GONZÁLES, F.H.D. et al. Haptoglobina en Ruminantes: Generalidades Y Posibles aplicationes clínicas**. An. Vet.**, Murcia, v. 23, p.5-17.2007.

GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary chemistry: a review. **Vet. Bull**., Stuttgart, v.64, p.1009-18, 1994.

HEBERT, W. J.; LUMSDEN, W. H. R. A rapid method for estimating the host's parasitaemia. **Exp. Parasitol**., Duluth, v.40, p 427-31, 1976.

HERRERA, H. M*,* **Infecção experimental em quatis (*Nasua nasua*) com Trypanosoma evansi (Steel, 1885) Balbiani 1888.** 1998. 91 f. Dissertação de Mestrado (Medicina Veterinária - área Patología Animal)- Faculdade de ciencias Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

HERRERA, H. M. et al. Experimental Trypanosoma evansi infection in South American coati (Nasua nasua): hematological, biochemical and histopathological changes . **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 203-210, 2002.

HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Vet. Parasitol**., Amsterdam, v.125, p.263–275 2004.

HILALI, M. et al. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p.237-243, 2006.

HOARE, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. VIII Revision of *Tripanosoma evansi*. **Parasitology**, Cambridge, v. 46, p.130-72, 1956.

HOARE, C.A. Vampire bats as vectores and hosts of equine and bovine trypanosomes. **Acta Trop**., Amsterdam, v.22, p.204-16, 1965.

HOARE, H.E. **The trypanosomiases of mammals**: a zoological monograph. Oxford: Blackwell, 1972. p.55-593.

HOLMES, P. H. Pathophysiology of parasitic infections. **Parasitology**, Cambridge, v.94, p.29-51, 1987.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Vet. Rec**., London, v. 35 p. 437-442, 1999.

JAIN, N.C. Acute phase proteins. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy X**: **small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. p.468-471.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JAKTAR, P.R., SINGH, M. Diagnosis of Surra in camels by the passive haemagglutination test. ***Br. Vet. J***., London, v.127, p.283-88, 1971.

JOHN, M.C. et al. Biometrical observations on different strain of *Trypanosoma evansi*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.43, p.143-5, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 6 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

KASHIWAZAKI, Y. et al. Haemoparasite infections in newly introduced dairy cattle in Loei Province, Thailand: *Trypanosoma evansi* antigen levels by ELISA referring to abortion **Vet. Parasitol.,** Amsterdam, v.80 p.99 -109 1998.

KATHIRA, L. G.; AVSATTHI, B. L Some biochemical changes in blood and serum of buffalo calves experimentally inoculated with *Tripanossoma evansi*. **Indian. Vet. J.**, Madras, v.62, p.289-93, 1985.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **Br. Vet. J.**, Madras, v. 48, n. 1, p. 279-282, 1992.

KRANEVELD, F.C., DJAENOEDIN, R. Enige gegevens over het moment van binnendrigen van *Trypanosoma evnsi* in cerebrospinaalvloeistof bij paarden. **Hemera Zoa**, Borgor, v.56, p.39-45, 1949.

KRINSKY.W. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **J. Méd. Entomol.**, Lanham, v.13, n.3, p.225-75, 1976.

LACERDA, J. B. **Peste de caderas ou epizootia de Marajó**: suas analogias com o beriberi. Rio de Janeiro:Lombaerts, 1885.

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

LANGHAN, S. M., GODFREY, D. G. Isolation of salivarian tripanosomes from man and other mammals using D E A E cellulose. **Exp. Parasitol**., Orlando, v. 28, p. 521-31, 1970.

LAVERAN, A. Identification et assai de classification des trypanosomes des mammifères. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.25, p.497, 1911.

LEE W.C., et al. Serum C-reative protein in dairy herds. **J. Vet. Res**., Ottawa, v. 67, p. 102-107, 2003.

LEMOS, R.K. **Resposta imone celular e alterações histopatológicas no sistema nervoso central de equinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi* Stell, 1885 (Sarcomastigophora:Trypanosomatidae)**.2003. 85f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and man**. 2nd. ed. Mineapolis: Burgers, 1973. p. 48-49.

LOSOS, G. J. Diseases caused by Trypanosoma evansi, a review. **Vet. Res. Commun.,** Dordrecht, v. 4, p.165–181 1980.

LOSOS, G.I. **Infections tropical diseases of domestic animals**. Essex: Longaman Scientific & Technical, 1986. p.183-254.

LUN, Z.R., DESSER, S.S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of Trypanosoma evansi attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA. **Parasitol. Today,** Kidlingoton, v. 11, p.131–133. 1995.

MACHADO R.Z., et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Vet. Parasitol.** Maracay, v. 71, n.1 p.7-26. 1997

MARQUES, L. C. **Infecção experimental em equinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcomastigophora: Trypanomatidae)**. 136 f. Tese (Livre Docência Medicina Veterinária-área clinica médica veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

MARQUES, L.C. et al. Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**., São Paulo v.9, n.1, p.11- 15, 2000.

MARQUES, L.C. et al. Humoral immune response of horses experimentally infected with Trypanosoma evansi. **Semina Ciênc. Agrar.**, Londrina, v. 22, n. 2, p.131-133, 2001.

MARTÍNEZ-SUBIELA S., et al. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **An. Vet.,** Murcia, v. 17, p. 97-114. 2001.

MASAKE, R.A. et al. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol**., San Diego v.85, p.193-205, 1997.

MATOS, M.S.; MATOS, P.F. **Laboratório clínico médico veterinário**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. 238p.

MENEZES, D. J. et al. *Trypanosoma evansi* in inbreeded and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. **Parasitol. Res**., Heidelberg, v.26, p. 67-72, 2004.

MENSIL, F. Sur l'identification de quelques trypanosomes pathogènes. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v.3, p. 376, 1910.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980. 79p.

MONZON, C. M.; VILLAVICENCIO, V. I. Serum proteins in guinea-pigs and horse infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Vet. Parasitol**., Amsterdam, v.36, p.295-301, 1990.

MONZON, C.M; MANCEBO, O. A.; D'AGOSTINO, B.I. Concideraciones clinicas de la tripanosomiasis equina experimental (*Trypanosoma evansi*, Voges 1901). **Rev. Med. Vet.,** Buenos Aires, v.65, n.1, p.13-8, 1984.

MONZON, C. M. et al. Imunodiagnostico de la tripansomiasis eqüina o mal de caderas, mediante la prueba de imunofluorescencia in direta. Ver. Med. Vet., Buenos Aires, v.68. 79p, 1987.

MONZON, C.M, JARA, G. A., HOYOS C. B. Evalution de La prueba de aglutination direta em el diagnostico Del mal caderas en eqüinos. **Rev. Inst. Med. Trop.,** São paulo, v.36, n.3, p.211-5, 1994.

MOREIRA, R. D.; MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento de *Trypanosoma evansi* em cão do município de Camapuã, MS In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 10., 1985 Jaboticabal. **Resumos...**, p.66.

MURALEEDHARAN, K., SRINIVAS, P. M. A report on the observation of *Trypanosoma evansi* in the aborted foetus of a cow. **Indian Vet. J**., Madras, v. 62, p. 16-8, 1985.

MURRAY, M. DEXTER, A. R. Anemia in bovine Africam Trypanosomiasis. **Acta trop.**, Amsterdam, v. 45, p. 389-432, 1988.

MURRAY, M.; GRAY, A.R. The current situation on animal trypanosomiases in Africa. In: RIEMANN, H.P.; BURRIDGE, M.J. **Impact of diseases on livestock production in the tropics.** Amsterdam:Elsevier, 1984. p.23-30.

NATTAN-LARRIER, L.; NOYER, B. Trypanosome du Débab Egyptien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v.25, p. 563, 1932.

NGERANWA, J. J. N. et al. The effects of experimental *Trypanosoma (Trypanozoon brucei) evansi* infection on the fertility of male goats. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v. 15, p. 301-8, 1991.

NGERANWA, J. J. N. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma* (*brucei*) *evansi* in small east African goats. **Res. Vet. Sci.,** v. 54, p. 283-289, 1993.

NGERANWA, J. J.; KILALO, D. C. The ability of Stomoxis calcitrans and mecanical means to transmit *Trypanosoma (brucei) evansi* from goats to camels in Kenia. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v.18, n .4, p. 307-12, 1994.

NGURE, R. M., et al. Major acute phase response of haptoglobin and serum amyloid-P following experimental infection of mice with *Trypanosoma brucei brucei* . **Parasitol. Int**., Elsevier, v.46, p.247-54, 1997.

ONAH D. N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A. G. Hematological changes in sheep experimentally infected with *T. evansi*. **Parasitol. Res.**, Berlim, v. 82, n. 1, p. 659-663, 1996.

OKECH, G. et al. The effect of experimental infection of Boran cattle in early and mid-pregnancy with *Trypanosoma vivax*. **Br. Vet. J**., London, v.152, p. 441-451, 1996.

PASSOS, P. B. **Infecção experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcomastigophora: Trypanomatidae)**. 2004. 236 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - área clinica médica veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PASSOS, P. B. et al. Resposta imunitária humoral de ovinos experimentalmente infectados com *trypanosoma evansi.* **Ars veterinaria**, Jaboticabal, Vol. 22, nº2, 159-164, 2006.

PATELLI, T.H.C. Infecção experimental em caprinos ***Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcomastigophora: Trypanomatidae)**. 2006. 146 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária-área clinica médica veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PATELLI, T. H. C. et al. Resposta imunológica humoral de caprinosexperimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae). **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, Vol. 23, nº3, 146-150, 2007.

PATELLI, T. H. C. et al. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**., São Paulo, v. 45, p. 481-487, 2008 suplemento.

PAYNE, R. C. et al .*Trypanosoma evansi* infection in cattle, buffaloes and horses in Indonesia. **Vet. Parasitol**., Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 109-119, 1991.

PAYNE, R. C. *et al*. Experimental infection of Friesian isolate of *Trypanosoma evansi*. **Trop. Med. Parasitol.** Severpool, v. 43: p.115-117, 1992.

PAYNE, R. C. *et al*. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on the oestrous cycle of friesian holstein herfers. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 51, p. 1-11, 1993.

PEREGRINE, A.S. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. **Vet. Parasitol**., Amsterdam, v.54, p.223–248 1994.

PIÑEIRO et al. ITIH4 (Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4) is a new acute-phase protein isolated from catle during experimental infection. **Infec. Immun**. Washington, v. 72, p. 3777- 3782, 2004.

PLATA, R. Nota preliminar sobre una tripanosomisis del ganado vacuno en Bolivar. **Rev. Méd. Vet.,** Bogotá, v.3, p. 77-79, 1931.

POCHINI, I. R. **Infecção experimental em bovinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcomastigophora: Trypanomatidae)**. 2000. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - área de Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PRUDHVI REDDY, K.; HAFEEZ, M. D. Incidence of Trypanosomiasis in bovines in Anapur district of Andhra Pradesh. **Cheiron**, Madras, v. 25, n. 1, p. 53-57, 1996.

PRICOLO, A.; FERRARO, G. La trypanosmiasis del camello. **Clin. Vet.**, Milan, v.37 p. 941, 1914.

QUEIROZ, A. O. et al. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inocualtes with distinct isolates of *Trypanosoma evansi***. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 965-972, 2001.

RAINA, A. K. et al. Oral transmisión of *Trypanosoma ev*ansi infection in dogs and mice**. Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.181, p.67-69, 1985.

RAMIREZ, L. E.; WELLS, E.; BETANCOURT, A**.** La tripanosomiasis en los animales domésticos en Colombia: *Trypanosoma evansi.* **Centro Intern. Agric. Trop.,** Cali, p.71, 1979.

RAZA, M. A. et al. Serum protein change in horse infected with Surra. **Vet. Bull.,** Fainham Royal., v. 51, n.10, p. 802, 1981. Abstract 6178.

ROSEMBERGER, G. *et a*l. **Exame clínico dos bovinos**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993 p. 413-4.

ROSENBUCH, F. Diagnostic untersuchungen über mal de caderas in Argentinin. **Arch. Schiffs Tropenhyg**., Leipzig, v.29, p.128-35, 1925.

ROSENFELD, G. Etilenodiamina tetracética dissódica (EDTA) como anticoagulante para técnica hematológica. **Rev. Clin.**, London, v.1, p.65-71, 1955.

SANDOVAL G.L. et al. Alterações bioquímicas e histopatológicas de um cão e ratos infectados com *Trypanosoma evansi*. **A Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 14, n. 81, p. 53-55, 1994.

SANTOS C. E. P., et al. Isolamento de *Trypanosoma evansi* em *Bos Taurus Indicus* no pantanal norte, Brasil. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA** 8., 2009, Belo Horizonte. Anais... p.625-630.

SASEENDRANATH, M. R.; RAMKRISHINA, J.; DHINAKARAN, M. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in sheep. **Indian vet. J. Res.**, Madras, v. 29, n. 1, p. 65-66, 1995.

SEED, J. R. Trypanosoma ganbiense and T. lewisi: Increased vascular permeability and skin lesions in rabbits. **Exp. Parasitol**., Duluth, v.26, p.214-23, 1969.

SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the brazilian Pantanal. **Prev. Vet. Med**. Amsterdam, v.33, n.1-4. p.219-34, 1998.

SERGENT, E. D.; LHÈRITIER, A.; BELLEVAL, G. *Trypanosoma marocanum*. Agent d'une épizootie équine à Casablanca em 1911. **Bull. Soc. Pathol. Exot.,** Paris, v.8, p.433, 1915.

SHAPIRO, S. Z.; BLACK, S. J. Identification of an acute phase reactant in murine infections with *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun**., Washington, v.6, p.147-9, 1992.

SHARMA, D.K. et al. Haematological changes in experimental trypanosomiasis in Barbari goats. **Small Ruminant Res.**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 145-149, 2000.

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

SILVA, R. A. M. S. et al. Trypanosomisis outbreak due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. A preliminary approach on risk factors. **Rev. Élev. Méd. Pays Trop**., Paris, v.48, n.4, p.315-9, 1995a.

SILVA, R. A. M. S. et al. Trypanosomisis due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. **Inter. Am. Inst. Coop. Agric**., Amsterdam, v.2, n.2, p.1-2, 41995b.

SILVA, et al. **Tripanossomiase bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia**: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. Corumbá. EMBRAPA-CPAP, 1997. 17p.

SILVA, R.A.M.S et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*:** (biologia, diagnóstico e controle). Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 137p.

SILVA et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in bovines from a dairy farm in the municipality of Videira - SC, Brazil **Act. Sci. Vet.,** Santa Catarina, v. 35, n.3, p. 373-376, 2007.

SINGH, A; CHAUDHRI, S. S. Comparison of efficiency of parasitological methods with Ag-ELISA in *Trypanosoma evansi* infected crossbred calves. **Indian. J. Anim. Sci.**, New Delhi, v. 72, n. 2, p.117-119, 2002.

SINGH, B.; JOSHI, S. J. Epidemiology, clinic-pathology and treatment of clinical *Trypanosoma evansi* in buffalo. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 68, n. 1, p .975-979, 1991.

SINGH, B., MISRA, S.K. Haematological changes in *Trypanosoma evansi* infection in calves. **Indian J. Vet. Med**., Madras, v.6, n.2, p.108-9, 1988.

SINGH, D.; GAUR, S.N.S. Clinical and blood cellular changes associated with *Trypanosoma evansi* infections in buffalo calves. **Indian. Vet. Med. J**., New Delhi, v.53, n.5, p.498-502, 1983.

SINGLA, V.; JUYAL, P. D.; KALRA, I. S. Effects of levamisole on the clinical response of *Trypanosoma evansi* infection in cow – calves. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 73, n .1, p. 11-15, 1996.

SOLTER, P. F., et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **Am. J. Vet. Res.,** Schaumburg, v. 52, p. 1738-1742, 1991.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today**., Amsterdam, v. 15, p. 81–88, 1994.

STEPHEN, L.E. **Trypanosomiasis**: a veterinary perspective. Oxford: Pergamon Press, 1986. 511p.

SUMBA, A. L. et al. Machanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in laboratory mouse model. **Med. Vet. Entomol**., Lanham, v. 12, n. 4, p. 417-22, 1998.

TAKIGUCHI et al. Isolation, characteization, and quantitative analysis of C-reative protein from horses. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.51, p. 1215- 20, 1990.

TRAIL, J. C. M. et al. Relationships between trypanosome infection measured by antigen detection enzyme immunoassays, anemia and growth in trypanotolerant N'Dama cattle. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 213-223, 1992.

TRUMEL, C.; SCHELLCHER, F.; BRAUN, J. P. L' eletrophorese des proteins sériques; príncipes d'intrepretation chez Le chein, et Le cheval. **Ver. Med. Vet**., Buenos Aires, v. 147, p. 123-30, 1996.

TEIXEIRA, M.C.A. **Proteinogramas séricos de ratos wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae)** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – área de Clínica Médica)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

TEIXEIRA, et al. Proteinogramas séricos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec***.,*Belo Horizonte, v.60, n.6, p.1447-1453, 2008.

TEVERNE, J., BRADLEY, J. E. Imunidade aos protozoários e helmintos. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Ed.) **Imunologia**. 5 ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 18, p. 243-262.

TIZARD, I. R., **Imunologia veterinaria**, 5. ed São Paulo: Roca, 1998. 545p.

TIZARD, I.R., **Imunologia veterinária uma introdução**, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 587p.

TOURATIER, L. Dixième reunion internationale sur *Trypanosoma evansi*: rapport du groupe de travail. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, Paris, v.9, p.1197-1207, 1990.

TUNTASUVAN, D., SARATAPHAN, N.; NISHIKAWA, H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 357-363, 1997.

UCHE, U.E.; JONES, T.W.; BOID, R. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 52, n. 2-3, p. 139-147, 1992.

VERMA, B. B.; GAUTAM, O. P. Studies on experimental “surra” (*Trypanosoma evansi*) infection in buffalo and cow calves. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 55, n. 1, p. 648-653, 1978.

VERMA, B. B.; GAUTAM, O. P. Eletrophoretic analysis of serum protein of calves experimentally infected with *T. evansi*. **Indian. J. Anim. Health**, Calcutá, v. 18, p. 33-7, 1979.

VERMA, B. B., GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of experimantal bovine surra (*Trypanosoma evansi* infection) – A comparisionof passive haemagglutination, gel diffusion and indirect fluorescent antibody test. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 54, n. 1, p. 809-813, 1982.

VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, London, v.273, p.613-7, 1978.

VOGES, O. Das mal de caderas der pferde in Sudamerika. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v.13, p. 297, 1901.

WELLS, E. A. Animal Trypanosomiases in South America. In: RIEMANN, H.P., BURRIDGE, M. J**. Impact of diasses on livestock production in the tropics**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p.31-41.

WIESENHUTTER, E. *Trypanosoma evansi* infections of dogs in Malaysia and considerations of their epidemiology. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public**. **Health**, Bangkok, v.6, p.445, 1975.

WINTROBE, M. M. The size and hemoglobin content of erythrocyte, methods of determination and clinical application. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v. 17, n. 1, p. 899-901, 1932.

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

WOO, P. T. K. Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-Saharan Africa. In: KREIER, J. P**. Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1977. v.1, p. 270-295.

WUYTS, N. et al. PCR amplification of crude blood on microscope slides in t he diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. Ann. Soc. Belge Med. Trop., Antwerpen v.75, p.229-237, 1995.

YAKIMOFF, W. L. À propos de l' identification du trypanosome des chameaux du Turkestan des chameaux du Turkestan Russe. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, Paris, v.14, p.638-642, 1921.