



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E DIAGNÓSTICO
POR PCR DE *Trypanosoma vivax* EM OVÁRIOS DE CAPRINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

CARLA MONADELI FILGUEIRA RODRIGUES

Médica Veterinária

Mossoró – RN
2011

CARLA MONADELI FILGUEIRA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E DIAGNÓSTICO
POR PCR DE *Trypanosoma vivax* EM OVÁRIOS DE CAPRINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-árido – UFERSA,
Campus de Mossoró, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista –
UFERSA

Mossoró – RN
2011

CARLA MONADELI FILGUEIRA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E DIAGNÓSTICO
POR PCR DE *Trypanosoma vivax* EM OVÁRIOS DE CAPRINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)

Presidente

Prof^o. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)

Primeiro Membro

Prof^o. Dr. Antonio Flávio Medeiros Dantas (UFCG)

Segundo Membro

MOSSORÓ – RN

2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLA MONADELI FILGUEIRA RODRIGUES – Nascida no Município de Natal-RN no dia 18.09.1986, filha de Antonio Carlos Rodrigues e Maria de Lourdes Filgueira Rodrigues. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2008.2, onde foi monitora em Semiologia Veterinária e aluna de PIVIC pelo período de um ano no laboratório de Patologia Veterinária. Durante a graduação desenvolveu trabalhos com patologia nas diferentes espécies domésticas e silvestres, bem como acompanhamento de surtos naturais e infecções experimentais com *Trypanosoma vivax*. Em janeiro 2009 foi selecionada pelo Programa em Pós- Graduação em Ciência Animal pela UFERSA. Durante o período do mestrado, foi colaboradora nas disciplinas de Medicina legal e bioética e patologia geral e veterinária no curso de Medicina Veterinária.

Aos meus pais que são a parte mais
importante de mim e que me deram
condições para chegar até aqui

Dedico

“Em paz com a vida
e o que ela me traz
na fé que me faz
otimista demais
se chorei ou se sorri
o importante
é que emoções eu vivi”

Roberto Carlos

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai celeste que é o responsável por todas as conquistas da minha vida. Ao Senhor dedico tudo o que tenho e tudo que sou. Ao que nunca me abandona, que me leva junto Dele me guiando, me amando e acima de tudo me permitindo avançar pela Sua graça.

A minha família, ao meu dedicado e amado pai Antonio Carlos e a minha maravilhosa e amável mãe Maria de Lourdes que se esforçam tanto para me proporcionar condições para seguir meus sonhos e lutar minhas batalhas mais árduas. É por vocês que sigo e tenho forças para vencer. Obrigada por me darem uma família perfeita e estruturada com duas irmãs lindas e queridas, Monalisa e Adeline, que são parte do que caminhei, me ajudando em tudo que podem e fazendo esse caminho mais fácil. Agradeço também aos meus cunhados Júlio César e Ramon por toda ajuda. Não posso deixar de agradecer as menores e melhores pessoas desse mundo, minhas sobrinhas Maria Isabel e Anna Júlia, que me enchem de alegria e que mesmo sem entenderem uma palavra do que está aqui escrito me alegram e inspiram a ser sempre uma pessoa melhor.

À todos meus familiares.

Ao meu orientador Jael Soares Batista que ao longo de todos esses anos de orientação se tornou um amigo e me fez admirá-lo por sua inteligência, esforço e competência. Obrigada por me ensinar tanto e fazer de mim parte da profissional que sou hoje. Onde quer que eu esteja terei orgulho de dizer que fui sua orientada e que tudo o que aprendi sobre patologia e pesquisa científica foi pelo amor e afinidade que demonstra e dedica a essas áreas.

Aos meus colegas Robério, Taciana e toda a equipe do laboratório de Patologia Veterinária – UFERSA. Obrigada por terem dado andamento ao meu experimento mesmo quando tive que me ausentar e por todo companheirismo nos momentos difíceis durante nossas pesquisas e inúmeras horas escrevendo artigos.

A professora Marta Teixeira por toda ajuda e atenção que teve com nossa equipe sempre disposta a nos orientar e passar um pouco do seu conhecimento e experiência. Obrigada, especialmente, por aceitar me orientar durante o doutorado e fazer possível o que parecia ser um sonho tão distante.

A equipe do laboratório da professora Marta (ICB – USP), principalmente a Herakles García que mesmo tão atarefado dedicou seu tempo a me ajudar no PCR do meu experimento, me ensinando tanto a parte prática quanto a teórica, sempre preocupado com o perfeito processamento das amostras e mesmo em pouco tempo de convivência se tornou um bom amigo.

A equipe do laboratório de Patologia Veterinária de Patos – PB por terem me recebido e ensinado tanto.

A todos os professores da UFERSA que contribuíram para que fosse possível me formar e agora está concluindo o mestrado.

Ao professor Sidnei Miyoshi Sakamoto por toda a ajuda e tempo dedicado às minhas dúvidas e conselhos me possibilitando alcançar meu objetivo de doutorado na USP, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do Hospital Veterinário – UFERSA, especialmente André Menezes do Vale, Erinaldo Freire de Amorim e ao Dr. Paulo Fernando Cisneiros da Costa Reis por contribuírem no que foi possível com meu experimento e pela amizade.

A Alcides Soares da Silva (*in memoriam*) um dos funcionários mais dedicados que já conheci e que mesmo sem um diploma respeitava os animais e amava a veterinária. Ao Seu Alcides por está comigo por todos esses anos de faculdade e mestrado nunca deixando faltar comida para os meus animais e me ajudando no manejo sempre que preciso. Meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do departamento de ciências animais, especialmente a Dona Neide, pela amizade e fazer nossos dias mais alegres.

A equipe do laboratório de Histologia Veterinária – UFERSA por toda a ajuda.

Ao Msc. Bruno Rodrigo Simão pela ajuda na estatística do trabalho.

Às minhas colegas de profissão e grandes amigas Fabrícia Geovânea Fernandes Filgueira, Gabriela Liberalino Lima, Geyanna Lopes Nunes, Isabella de Oliveira Barros, Leise Gomes Fernandes, Máira Conceição J. de Souza Lima e Maria Alice Pires Moreira por terem caminhado comigo por todo esse tempo sempre dando força, compartilhando experiências e me ajudando seja nos experimentos ou nas aulas. Obrigada meninas por serem excepcionais e me orgulho em dizer que faço parte de uma turma de profissionais tão competentes.

À minha família Igreja Batista Regular da fé – Mossoró, principalmente Bruna Lima, Laynara Karollyne, Lílian Kremer, Nayara Freire e Stefany Fernanda por me entenderem em todos os momentos que precisei estar ausente, mas que nunca deixaram de me incentivar a continuar minha jornada. Agradeço a Deus por presentes tão maravilhosos.

Às minhas amigas queridas Denise Helén, Júlia Serafim e Vanessa Limeira que mesmo longe sei que atravessam comigo todos os momentos torcendo e vibrando em cada conquista. Vocês são amigas valiosas que estarão sempre em meu coração.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse momento chegasse.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

À todos os componentes da banca por terem aceitado o convite de participarem da minha defesa.

À cada animal usado nesse experimento.

Meus sinceros agradecimentos.

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMO-HISTOPATOLÓGICA E DIAGNÓSTICO
POR PCR DE *Trypanosoma vivax* EM OVÁRIOS DE CAPRINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

RODRIGUES, C.M.F. **Caracterização anatomo-histopatológica e diagnóstica por PCR de *Trypanosoma vivax* em ovários de caprinos experimentalmente infectados.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2011.

RESUMO – Este estudo teve como objetivo a determinação da taxa de degeneração de folículos ovarianos e pesquisar por PCR a presença do DNA do parasita em tecido ovariano de cabras infectadas experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. Seis cabras, fêmeas, adultas, foram infectadas com $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. vivax* e outras quatro formaram o grupo controle. Após 60 dias de infecção, foi feita a coleta dos ovários e realizado o exame anatomopatológico. Amostras de ovários foram tomadas para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). A parasitemia foi observada a partir do 3º dia pós-infecção (dpi) com picos nos 7-14^{os} dpi. A análise histológica mostrou que no grupo de cabras infectadas, o valor médio de folículos, foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Quanto ao estágio de desenvolvimento, no grupo controle, o número de folículos primordiais e primários foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o secundário e terciário. Quanto à integridade, não houve diferença significativa no valor médio dos folículos degenerados tipo I entre o controle e infectados. O número de folículos degenerados do tipo II foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo infectado que no grupo controle, e a maioria dos folículos degenerados tipo II eram primordiais e primários. A análise de *T. vivax* nos tecidos ovariano pelo PCR específico para *T. vivax* (TviCatL-PCR) mostrou a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 177 pb que foi observado nos ovários direito e esquerdo de todas as cabras do grupo infectado. O resultado do PCR, entretanto, foi negativo para todas as amostras do grupo controle. A degeneração folicular associada à presença do parasita nos ovários, detectada por PCR, sugerem a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos.

Palavras-Chave: Caprinos, *Trypanosoma vivax*, degeneração folicular e PCR.

**ANATOMIC AND HISTOPATHOLOGIC DESCRIPTION AND DIAGNOSIS
BY PCR OF *Trypanosoma vivax* IN OVARIES OF GOATS EXPERIMENTALLY
INFECTED**

RODRIGUES, C.M.F. **Anatomic and histopathologic description and diagnosis by PCR of *Trypanosoma vivax* in ovaries of goats experimentally infected.** 2011. 91f. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal sanity) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2011.

ABSTRACT - This study aimed to determine the rate of ovarian follicles degeneration and search for the presence of parasite DNA by PCR in ovarian tissue from goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Six goats, females, adults were infected with 1.25×10^5 trypomastigotes of *T. vivax* and four others formed the control group. After 60 days of infection, was collected from the ovaries and performed the pathological examination. Samples of ovaries were taken to perform the polymerase chain reaction (PCR). The parasitemia was observed from the third day post-infection (dpi) with peaks in the 7-14th dpi. Histological analysis showed that the group of infected goats, the average value of follicles was significantly lower ($P < 0.05$) compared to the control group. As the stage of development in the control group, the number of primordial and primary follicles was significantly higher ($p < 0.05$) than the secondary and tertiary. As for integrity, no significant difference in the average value of the follicles degenerate type I between control and infected. The number of follicles degenerate type II was significantly higher ($p < 0.05$) in the infected group than in the control group, and most degenerate type II follicles were primordial and primary. The analysis of *T. vivax* in ovarian tissues by PCR specific for *T. vivax* (TviCatL-PCR) showed amplification of a DNA fragment of approximately 177 bp was observed in right and left ovaries of all the goats of the infected group. The result of PCR, however, was negative for all samples in the control group. The follicular degeneration associated with the presence of the parasite in the ovaries, as detected by PCR, suggesting the involvement of the parasite in the etiopathogenic mechanism of reproductive harm.

Key words: Goats, *Trypanosoma vivax*, follicular degeneration and PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
dpi	Dias pós infecção
PCR	Reação em Cadeira Polimerase
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Folículos Ovarianos Pré Antrais
Kg	Quilograma
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
gGAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
SSU rRNA	Small subunit ribosomal RNA
®	Marca registrada
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ITS1	Espaçador interno transcrito do rDNA
SL	Gene spliced-leader
FFLB	Fluorescent Fragment Length Barcoding
ANOVA	Análise de variância
P	Probabilidade
<	Menor que
cm ³	Centímetro cúbico
µm	Micrômetros
µL	Micro litro
nm	Nanômetro
mm	Milímetros
CatL-like	Cathepsin L-like
TviCatL - PCR	PCR específico para <i>T. vivax</i> visando sequências CatL-like
Obj	Objetiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio padrão quanto a integridade e classificação dos folículos ovarianos de cabras do grupo controle e infectadas experimentalmente com *Trypanosoma vivax* 64

Tabela 2: : Intensidade da banda no gel de agarose X parasitemia observada no 60o dpi em cabras infectadas experimentalmente com *T. vivax* 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de máxima verossimilhança do gênero <i>Trypanosoma</i> baseada na SSU do gene ribossômico (1816 characters). Os valores correspondem ao suporte em análises de máxima verossimilhança, parcimônia e Bayesiana em 500 replicatas. Espécies de tripanossomas que infectam ruminantes estão indicadas nos boxes dos clados <i>T. brucei</i> e <i>T. theileri</i>	19
Figura 2: <i>Trypanosoma vivax</i>	20
Figura 3: Microscopia eletrônica da região da membrana plasmática de formas tripomastigotas de <i>T. brucei</i> , mostrando a capa de VSGs marcada com ouro (partículas ouro a 5nm conjugadas a um anticorpo monoclonal anti-VSG).....	27
Figura 4: Esquema evidenciando flutuação dos níveis parasitêmicos pela resposta imune e surgimento de uma nova população de tripanossomas com glicoproteínas de superfície modificada.....	28
Figura 5: A – Folículo primordial (caprino); B – Folículo primário (caprino); C – Folículo secundário (caprino); D – Folículo terciário (caprino). G – células da granulosa, a – antro.....	40
Figura 6: Folículos em atresia. A – Degeneração do tipo I; B – Degeneração do tipo II. NP – núcleo picnótico, RO – retração oocitária.....	41
Figura 7: Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em caprinos do grupo experimentalmente infectado por <i>Trypanosoma vivax</i> e do grupo controle durante o período experimental.....	62
Figura 8: Valores médios das parasitemias (x10 ⁵ tripanossomas/ml de sangue) de caprinos do grupo experimentalmente infectados por <i>T. vivax</i> durante o período experimental.....	62
Figura 9: Aspectos histológicos de fragmentos do ovário de cabras experimentalmente infectadas com <i>T. vivax</i> . A - Folículos ovarianos morfologicamente normais. B - Núcleo picnótico (Folículo degeneração tipo I). C - Folículo ovariano degenerado com retração oocitária e desorganização das camadas de células da granulosa (Folículo degeneração tipo II). Barra de escala representa 10 mm, hematoxilina-eosina, Obj. 40x.....	64
Figura 10: PCR para detecção de <i>T. vivax</i> nos tecidos ovarianos utilizando-se 5 µL de DNA. Fragmento de 177pb do gene Catepsina L (gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio), específico para <i>T. vivax</i> está evidenciado pela seta. M = marcador molecular; C1 – OE = cabra 1 - ovário esquerdo; C2- OE = cabra 2 - ovário esquerdo; C3 – OD = cabra 3 - ovário direito; C3 – OE = cabra 3 - ovário esquerdo; C5 – OD = cabra 5 - ovário direito; C5 – OE = cabra 5 - ovário esquerdo; C6 – OD = cabra 6 - ovário direito; C6 – OE = cabra 6 - ovário esquerdo; C- = Controle negativo; C+ = Controle positivo.....	65

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1.1 Gênero <i>Trypanosoma</i>	18
1.1.2 Epidemiologia de <i>T. vivax</i> na África e América do Sul	20
1.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos	25
1.1.4 Variação antigênica - aspectos imunopatológicos da infecção por <i>T. vivax</i>	27
1.1.5 Alterações hematológicas e bioquímicas	28
1.1.6 Alterações anatomopatológicas	29
1.1.7 <i>T. vivax</i> e Patologias Reprodutivas em Fêmeas	30
1.1.8 <i>T. vivax</i> e Patologias Reprodutivas em Machos	31
1.1.9 Diversidade genética, taxonomia e relações filogenéticas	32
1.1.10 Diagnóstico	35
1.1.11 Tratamento	36
1.2 OVÁRIO MAMÍFERO	38
1.2.1 Aspectos morfológicos e estruturais	38
1.2.2 Folículos Ovarianos	39
1.2.3 Atresia	40
1.3 OBJETIVOS	42
1.3.1 Gerais	42
1.3.2 Específicos	42
1.4 REFERÊNCIAS.....	43
2. CAPÍTULO 2 – DEGENERAÇÃO FOLICULAR E DIAGNÓSTICO POR PCR EM OVÁRIOS DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE POR <i>Trypanosoma vivax</i>	56
2.1 RESUMO.....	56
2.2 INTRODUÇÃO	56
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.3.1 Composição dos Grupos Experimentais	58
2.3.2 Preparo do inóculo e infecção experimental com <i>Trypanosoma vivax</i>	59

2.3.3 Exames Clínicos, determinação do hematócrito e avaliação da Parasitemia	59
2.3.4 Coleta e análise histológica dos ovários	59
2.3.5 Diagnóstico por PCR no Ovário	60
2.3.6 Parasitemia x intensidade do fragmento no gel de agarose	61
2.3.7 Análise Estatística	61
2.4 RESULTADO	61
2.4.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia	61
2.4.2 Avaliação do hematócrito	63
2.4.3 Avaliação macroscópica e histológica dos ovários	63
2.4.4 Diagnóstico por PCR no Ovário	65
2.4.5 Parasitemia x intensidade do fragmento no gel de agarose	65
2.5 DISCUSSÃO	66
2.6 CONCLUSÃO	70
2.7 REFERÊNCIAS.....	71
 ANEXOS	 75
ANEXO I - CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “FOLLICULAR DEGENERATION AND DIAGNOSTIC PCR IN OVARIES OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH <i>Trypanosoma vivax</i> ”	75
ANEXO II - FOLLICULAR DEGENERATION AND DIAGNOSTIC PCR IN OVARIES OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH <i>Trypanosoma vivax</i>	76

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A tripanossomíase por *T. vivax* é uma enfermidade debilitante e comumente fatal dos animais domésticos, especialmente em bovinos e pequenos ruminantes. Na maioria dos países da África, especialmente no sul do deserto do Saara, onde a transmissão do parasita ocorre pelo vetor biológico, a mosca tsé-tsé, a tripanossomíase provoca grande restrição à criação de ruminantes e entrave a produção animal (GUTIERREZ et al., 2006). As perdas econômicas da pecuária, decorrentes da tripanossomíase, resultam do crescimento retardado, aborto, perdas na produtividade, custo do tratamento e morte dos animais afetados (SEIDL et al., 1999).

Por um longo período, o registro da presença do *Trypanosoma vivax* esteve restrita à Colômbia, Venezuela e Guiana, mas tem se expandido para outras áreas da América Central, América do Sul e algumas ilhas do Caribe (CARVALHO, 2008). Na América do Sul, onde não existe a presença do vetor biológico, o parasita adaptou-se à transmissão mecânica por dípteros hematófagos como *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp. (DÁVILA; SILVA, 2000).

No Brasil, a tripanossomíase por *T. vivax* já foi registrada em vários estados. O Pará, onde se detectou o parasita em esfregaço sanguíneo de um búfalo, com o histórico de febre e perda de peso, foi o primeiro deles (SHAW; LAINSON, 1972). Desde então, esse parasita estava restrito ao Norte do país, quando em 1995 foi observado em bovinos na região de Poconé, Pantanal do Mato Grosso (SILVA et al., 1996). Hoje, o *T. vivax* já foi encontrado em ruminantes de norte a sul do país (LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2007; 2009; GUERRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; DA SILVA et al., 2009). Recentemente, *T. vivax* foi descrito pela primeira vez em equinos no Brasil (RS) (SILVA et al., 2010).

Dos hospedeiros vertebrados susceptíveis, a tripanossomíase por *T. vivax* tem importância relevante em ruminantes domésticos. A introdução do parasita em bovinos, ovinos e caprinos é seguida de manifestações de sinais clínicos e aparecimento de lesões da doença. Em infecções experimentais, *T. vivax* tem maior patogenicidade em cabras e ovelhas que em bovinos (ANOSA, 1983). Devido à sua susceptibilidade à tripanossomíase por *T. vivax*, ovinos e caprinos são frequentemente utilizados como modelo experimental na avaliação da virulência e patogenicidade das cepas. O curso da infecção experimental por *T. vivax* nos ovinos pode ser dividido em duas fases: (1) a

fase aguda, que persiste por aproximadamente duas semanas, caracterizada por parasitemia e febre alta e (2) a fase crônica, caracterizada por temperatura normal e parasitemia baixa ou ausente (BATISTA et al., 2006).

Desordens reprodutivas causadas por *T. vivax* em bovinos infectados naturalmente tais como aborto, repetição de cio, nascimento de natimortos e de crias fracas e anestro temporário ou permanente foram identificados no Sertão da Paraíba (BATISTA et al., 2007,2008).

Apesar de alguns microrganismos terem capacidade de infectar células da granulosa *in vitro* a influência de agentes infecciosos na degeneração de folículos ainda não está bem esclarecida, portanto, faz-se necessária uma avaliação dos efeitos do *T. vivax* sobre a anatomo-histopatologia dos ovários de cabras a fim de determinar a taxa de degeneração dos folículos para se verificar a viabilidade destes. São importantes ainda estudos adicionais que elucidem a associação entre a presença do *T. vivax*, através da utilização do PCR, e estas lesões nos tecidos ovarianos, o que permitirá confirmar se o parasita pode estar envolvido no mecanismo etiopatogênico dos danos reprodutivos.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Gênero *Trypanosoma*

Os tripanossomas encontram-se entre os parasitas mais abrangentes e com maior número de hospedeiros, de todas as classes de vertebrados, distribuídos em todo o mundo (STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007). Numerosas espécies presentes em mamíferos de todas as ordens foram classificadas empregando-se critérios taxonômicos tradicionais: morfologia, aspectos biológicos, hospedeiro e origem geográfica. Hoare (1972) propôs a separação dos tripanossomas de mamíferos nas seções Salivaria e Stercoraria segundo o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, na via de transmissão.

Mamíferos de grande interesse econômico, especialmente ungulados, podem ser infectados por diversas espécies de tripanossomas. *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. congolense*, *T. b. brucei* e *T. simiae* são agentes de doenças importantes para esses animais na África, Ásia e Américas Central e do Sul. Essas espécies são patogênicas para bovinos, bufalinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos, sendo todas de origem

Africana, onde circulam entre ungulados selvagens que agem como reservatórios e raramente apresentam sinais clínicos. Esses tripanossomas são ciclicamente transmitidos por moscas tsé-tsé ou mecanicamente por diversas moscas hematófagas. Os tripanossomas patogênicos para ungulados pertencem à secção Salivaria, subgêneros *Duttonella* (*T. vivax*), *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum*) e *Nanomonas* (*T. congolense* e *T. simiae*). Todas essas espécies foram agrupadas em um só clado (clado *T. brucei*) em estudos filogenéticos moleculares, formando um grupo monofilético exclusivo de espécies africanas e transmitidas por tsé-tsé (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004; 2007) (Figura 1).

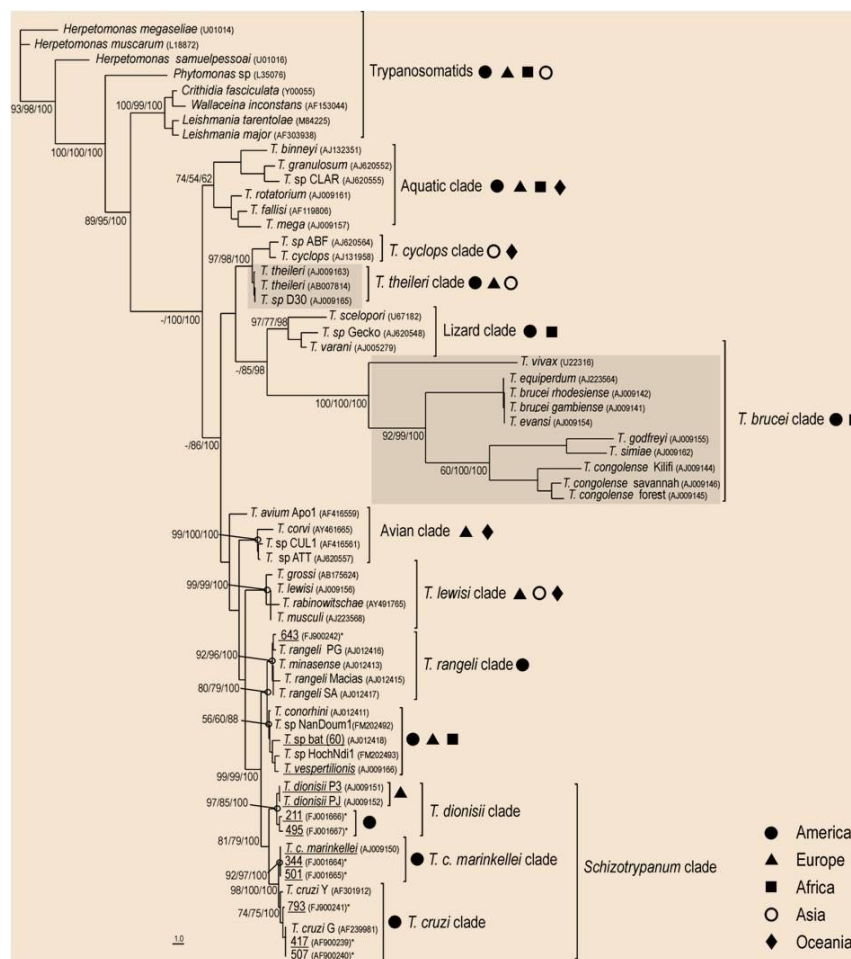


Figura 1: Árvore de máxima verossimilhança do gênero *Trypanosoma* baseada na SSU do gene ribossômico (1816 characters). Os valores correspondem ao suporte em análises de máxima verossimilhança, parcimônia e Bayesiana em 500 replicatas. Espécies de tripanossomas que infectam ruminantes estão indicadas nos boxes dos clados *T. brucei* e *T. theileri*. Fonte: Modificado de Cavazzana et al., 2009.

Dentre os tripanossomas da secção Stercoraria, que são aqueles transmitidos por contaminação com as fezes do vetor, *T. cruzi* é a única espécie patogênica para o homem na América Latina. Nenhum tripanossoma de origem Americana é considerado patogênico para ungulados. Nessa secção estão classificados tripanossomas com distribuição mundial, *T. theileri* e espécies relacionadas, que infectam bovinos e outros ruminantes em todo o mundo.

T. vivax, *T. congolense* e *T. brucei* são responsáveis por uma alta mortalidade de bovinos na África, onde são abundantes tanto nas áreas de influência da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), o único vetor biológico de *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* e *T. simiae*, como nas regiões livres desta mosca, onde a transmissão de *T. vivax* se dá por outros hematófagos como tabanídeos e mosca dos estábulos. Esses dípteros estão também envolvidos na transmissão mecânica de *T. vivax* e *T. evansi* fora da África. *T. evansi* e *T. equiperdum* não se desenvolvem em insetos e são, mesmo na África, apenas transmitidos mecanicamente, respectivamente, por hematófagos e via sexual. Dessas espécies, apenas *T. vivax*, *T. evansi* e *T. equiperdum* são encontrados fora da África.

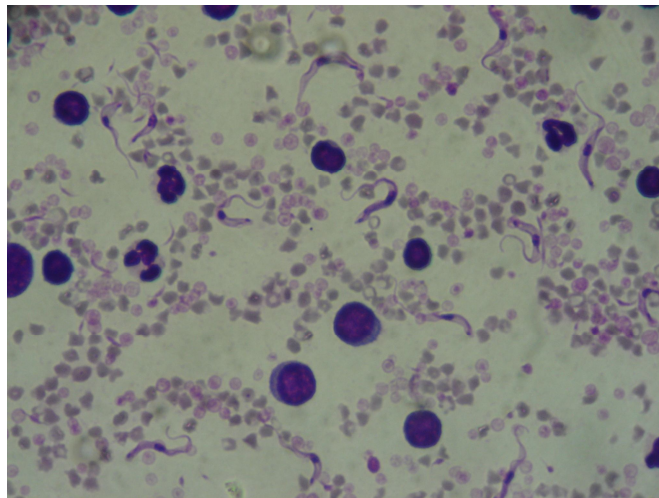


Figura 2: *Trypanosoma vivax*. Fonte: Arquivo pessoal.

1.1.2. Epidemiologia de *T. vivax* na África e América do Sul

T. vivax possui uma ampla diversidade de hospedeiros ungulados, especialmente ruminantes (Artiodactyla) e equinos (Perissodactyla) domésticos e silvestres. Ungulados silvestres, especialmente búfalos, antílopes e outros bovídeos são assintomáticos, apesar de apresentar altas taxas de infecção por *T. vivax* (MOLOO et al., 1993, 1999;

NJIOKOU et al., 2004). No entanto, a presença do parasita no sangue de equídeos é frequentemente relatada na África (HOARE, 1972, DHOLLANDER et al., 2006; PINCHBECK et al., 2008; DUFFY et al., 2009).

Este parasita completa todo o seu ciclo de desenvolvimento na probóscide e bomba cibarial adjacente da mosca tsé-tsé onde tripomastigotas diferenciam para formas epimastigotas, e ocorre o desenvolvimento de formas tripomastigotas metacíclicas, que são infectivas para o hospedeiro vertebrado quando inoculadas junto com a saliva através da picada da mosca. Na África, diversas espécies de tsé-tsé, por exemplo *Glossina pallidipes*, *G. longipennis* e *G. swynnertoni*, participam do ciclo de desenvolvimento deste parasita. Diversos estudos constataram a presença de *T. vivax* nas probóscides de tsé-tsé com a utilização de métodos moleculares (NJIRU et al., 2004; ADAMS et al., 2010).

As infecções por *T. vivax* causam grande impacto negativo na saúde e produtividade de animais de interesse econômico na África. Nesse continente, a infecção ocorre tanto em áreas infestadas quanto áreas livres de tsé-tsé, sendo esse parasita ciclicamente e mecanicamente transmitido. A tripanossomíase por *T. vivax* tem sido relatada com elevadas prevalências em bovinos, búfalos, camelos, cavalos e caprinos, em geral, com doença crônica que resulta em crescimento retardado, aborto e morte dos animais (GUTIERREZ et al., 2006; SEIDL et al., 1999).

O interesse no estudo de *T. vivax* é bastante amplo porque junto com *T. evansi* são os únicos tripanossomas patogênicos para ungulados que conseguiram se estabelecer fora da África, se adaptando a novos hospedeiros e mecanismos de transmissão na ausência do vetor natural e, assim, se disseminando nas Américas Central e do Sul. *T. vivax* foi introduzido nas Américas, provavelmente, com as importações de bovinos trazidos das colônias europeias na África (JONES; DÁVILA, 2001, OSÓRIO et al., 2008). Nesse novo continente, o parasita se adaptou a transmissão mecânica por diversos insetos hematófagos, circulando entre os bovídeos domésticos introduzidos recentemente e, talvez, tenha se disseminado entre animais silvestres, como cervídeos, nunca antes expostos a esse parasita. O primeiro relato de tripanossomíase por *T. vivax* no continente americano foi em bovinos da Guiana Francesa em 1919 (LEGER; VIENNE, 1919) e, posteriormente, foi relatada na Venezuela (1920), Ilha de Guadalupe e Martinica (1926 e 1929), Colômbia (1931), Suriname (1938), Panamá (1941), Guiana (1952), Pantanal da Bolívia (GONZALEZ et

al., 2007) e, recentemente, na Costa Rica (OLIVEIRA et al., 2009). No restante do continente existem relatos de evidência sorológica da presença de *T. vivax* em El Salvador, Equador, Peru e Paraguai (JONES; DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008).

No Brasil, o primeiro relato do parasita foi em um búfalo nas regiões alagadiças perto de Belém, estado do Pará (SHAW; LAINSON, 1972). Posteriormente, ao final da década de 1970, este parasita foi relatado em ovinos e bovinos nos Estados de Amapá e Pará (SERRA-FREIRE, 1981) e só uma década depois foi relatado fora da região norte do país, em bovinos de Poconé no Pantanal de Mato Grosso (SILVA et al., 1995, 1996). Possivelmente, os primeiros surtos no Pantanal foram devidos ao aumento do deslocamento de animais da região norte para o centro-oeste do Brasil. Nos últimos anos, o número de relatos de *T. vivax* tem aumentado, assim como a distribuição geográfica do parasita, com relatos no Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2007; 2009), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008) e Rio Grande do Sul (DA SILVA et al., 2009). Recentemente, *T. vivax* foi descrito pela primeira vez em equinos no Brasil (RS) (SILVA et al., 2010).

Uma característica epidemiológica importante da tripanossomíase por *T. vivax* refere-se ao fato de que animais domésticos das regiões endêmicas possuem um alto nível de proteção contra infecção aguda. Essa proteção determina a ausência de sinais clínicos ou uma doença muito branda, que não representa risco importante na saúde animal, embora possa ter repercussões na produtividade do rebanho. A exposição prévia e constante ao parasita parece ser responsável por conferir esse nível de proteção, já que animais de regiões não endêmicas são altamente susceptíveis e manifestam doença clínica severa durante uma infecção primária. No entanto, fatores inerentes ao hospedeiro (raça, idade, sexo, prenhez, estado nutricional, estresse de produção, infecções intercorrentes), fatores ambientais (sazonais), e de manejo animal (deslocamento, vacinação, introdução de animais de regiões endêmicas em regiões livres da doença), são todos de grande importância na prevalência e severidade das manifestações clínicas da doença.

A tripanossomíase por *T. vivax* apresenta diferentes situações epidemiológicas nas diversas regiões do continente americano. A doença exibe um caráter enzoótico nas principais regiões de criação de gado bovino e bubalino na Venezuela (GARCÍA et al., 2005; 2006), assim como nas terras baixas da Colômbia (OTTE et al., 1994), onde o

parasita alterna seu ciclo de transmissão entre hospedeiros ungulados domésticos (ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos) (GARCÍA et al., 2009) e animais silvestres (FERNANDEZ, 1931; FIASSEN et al., 1948). Uma situação epidemiológica similar parece ocorrer atualmente no Pantanal e na Amazônia brasileira, regiões nas quais existe um equilíbrio enzoótico entre hospedeiros e parasitas, provavelmente alcançado após a apresentação dos surtos com doença grave (SILVA et al., 1995, 1996; PAIVA et al., 1997; DESQUESNES, 2004). Possivelmente esse equilíbrio enzoótico tem sido mantido ao longo do tempo por reinfecções frequentes em ciclos de transmissão garantidos pela abundância de vetores mecânicos (DESQUESNES et al., 2009). Nessas regiões endêmicas, os animais infectados são assintomáticos e a mortalidade e morbidade são muito baixas.

Uma situação epidemiológica diferente tem sido descrita nos últimos anos em regiões não endêmicas para *T. vivax* no Brasil, com a ocorrência de surtos de infecções aguda, animais com sinais clínicos e elevadas mortalidade e morbidade. Esses surtos têm sido associados à introdução do parasita em rebanhos susceptíveis ou relacionados a condições sazonais específicas que determinam altas taxas de transmissão devido ao aumento no número de vetores hematófagos e/ou redução da resposta imune dos hospedeiros.

Na América do Sul, ovelhas infectadas por *T. vivax* são geralmente assintomáticas (APPLEWHAITE, 1990; VOKATY et al., 1993; DÁVILA et al., 2003; DESQUESNES, 2004; GUTIERREZ et al., 2006). Esse quadro se revelou completamente diferente em ovinos e caprinos infectados por *T. vivax* na região do semiárido do Brasil, principal local de criação de cabras e ovelhas no Brasil. Nos levantamentos realizados na Paraíba, muitos animais se apresentaram positivos para *T. vivax* e exibiram sintomatologia típica da infecção, inclusive com relato de aborto e perda progressiva de peso. Alguns animais conseguiram se recuperar da infecção após tratamento, e outros se recuperaram mesmo sem tratamento e desenvolveram doença crônica e assintomática (BATISTA et al., 2009). Estes estudos reforçam que cabras e ovelhas não somente podem ser afetadas pela doença, mas que desempenham importante papel como reservatório de *T. vivax* para ruminantes em geral (BATISTA et al., 2009).

Nas regiões endêmicas do Pantanal e Amazônia outros reservatórios devem ser importantes, já que os rebanhos de caprinos e ovinos não são expressivos. Bovinos e

bubalinos, existentes em grandes rebanhos nessas regiões, podem ser cronicamente infectados sendo, assim, reservatórios importantes de *T. vivax*. Ainda é muito limitado o conhecimento sobre os reservatórios de *T. vivax* no Brasil, o papel dos búfalos, equinos e animais silvestres (como cervídeos) que tem papel importante na África nunca foi estudado no Brasil. Também não conhecemos os vetores que são responsáveis por disseminar a doença na América do Sul. Embora o aumento da população de tabanídeos, comum em épocas de chuva, seja geralmente atribuído a ocorrência de surtos, não existem evidências da presença de *T. vivax* nesses vetores. Estudos baseados em diagnóstico molecular realizados no Pantanal revelaram búfalos, bovinos e ovelhas com infecções assintomáticas (VENTURA et al., 2001; DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

Até muito pouco tempo, cabras e ovelhas eram geralmente assintomáticas quando infectados por *T. vivax* na América do Sul (DESQUENES, 2004; GARCÍA et al., 2006). Porém, a descrição dos surtos com sintomatologia em ovinos da Paraíba alterou o quadro epidemiológico de *T. vivax*. Outro relato muito importante na epidemiologia do *T. vivax* foram os primeiros casos de infecção de equídeos por essa espécie no Brasil, em cavalos do Rio Grande do Sul (DA SILVA et al., 2010). Esses animais são conhecidos por serem altamente suscetíveis a infecções agudas e letais causadas por *T. evansi*. Na África, infecções causadas por *T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax* são comuns em equídeos, que desempenham papel importante como reservatórios já que apresentam infecções crônicas e assintomáticas (FAYE et al. 2001; DHOLLANDER et al., 2006; AUTY et al., 2008; ABEBE; WOLDE, 2010).

A hipótese mais provável da ocorrência dos surtos mencionados está baseada na introdução de animais portadores de *T. vivax* em áreas com animais susceptíveis e alta abundância sazonal de vetores mecânicos (MADRUGA, 2004; MADRUGA et al., 2009). No entanto, a severidade das manifestações clínicas, tem levantado importantes questões sobre a susceptibilidade dos animais infectados, presença de genótipos de parasitas mais ou menos virulentos e, assim, a um importante debate sobre a tripanossomíase por *T. vivax* como doença emergente em todo o território brasileiro (BATISTA et al., 2007; 2011a,b; GUERRA et al., 2008; DA SILVA et al., 2010; CUGLOVICI et al., 2010).

Em geral, nas regiões de estabilidade enzoótica a tripanossomíase por *T. vivax* é considerada uma doença crônica, com animais assintomáticos ou com sinais clínicos

inespecíficos. Porém, nas regiões não endêmicas a introdução de animais com infecções assintomáticas constitui um sério risco para a saúde e produtividade dos animais nunca expostos a esse parasita. Similarmente, animais domésticos de regiões não endêmicas podem ser severamente afetados quando introduzidos em áreas endêmicas à doença, como tem sido observado no Brasil (SILVA et al., 1998; BATISTA et al., 2007, 2009; OSÓRIO et al., 2008).

1.1.3. Patogenia e Sinais Clínicos

Em geral, nas áreas endêmicas, a tripanossomíase por *T. vivax* é uma doença que apresenta curso clínico crônico, com animais assintomáticos ou com sinais clínicos inespecíficos. Porém, fatores associados ao parasita, espécie e raça do animal infectado podem determinar infecções graves com alterações hematológicas e nervosas. A suscetibilidade de cabras e ovelhas a infecção por *T. vivax* na África varia de animais altamente susceptíveis a tripanotolerantes (DWINGER et al., 1986; AKINWALE et al., 2006).

A primeira manifestação patológica da tripanossomíase africana, denominada “cancro de inoculação”, ocorre no ponto da pele em que as formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas pela tsé-tsé durante a hematofagia. Esta lesão primária é de natureza inflamatória e transitória e caracteriza-se, em cortes histológicos, por grande número de tripanossomas. Do local de inoculação, os tripanossomas passam rapidamente para os nódulos linfáticos que drenam o local da picada e alcançam o sangue (GARDINER, 1989). A rápida multiplicação por divisão binária das formas tripomastigotas promove um aumento gradual de tripanossomas no sangue (JONES et al., 2000).

O período entre a infecção e o aparecimento da parasitemia (período pré-patente) varia em função da resistência inata do hospedeiro, nível de anticorpos, estado nutricional, infecções intercorrentes e exposição a drogas terapêuticas, bem como fatores relacionados ao parasita como transmissão cíclica ou mecânica e quantidade de parasitas inoculada. O período pré-patente, em geral, varia de quatro a sete dias (via intramuscular), em bovinos, ovinos e caprinos (STEPHEN, 1986).

Quando a parasitemia alcança seus valores mais altos, seguem-se as manifestações clínicas da fase aguda caracterizada por anemia aguda grave e

trombocitopenia devido a fagocitose generalizada de hemácias e plaquetas por macrófagos (MURRAY; DEXTER, 1988; GARDINER, 1989). Durante a infecção, *T. vivax* pode provocar diferentes graus de alterações no quadro hematológico, que são principalmente caracterizados pela anemia por diminuição de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, que é o parâmetro hematológico mais comumente associado à tripanossomíase por *T. vivax* (FACER et al., 1982; ANOSA, 1983; OLUBAYO; MUGERA, 1985). A anemia é o principal sinal da tripanossomíase bovina, e sua persistência é responsável por insuficiência cardíaca congestiva (GARDINER, 1989), além de promover a deposição de imunocomplexos na superfície do eritrócito, provocando eritrofagocitose (MURRAY; DEXTER, 1988, ANDRIANARIVO et al., 1995). Estudos em bovinos infectados experimentalmente revelaram anemia macrocítica hipocrômica, associado à trombocitopenia e leucopenia (MAXIE et al., 1979). Outros estudos demonstraram redução dos níveis de microhematócrito em bovinos infectados com cepas do Leste da África, que causaram síndrome hemorrágica em caprinos, mesmo após o desaparecimento da parasitemia (GARDINER, 1989; SAROR, 1980). Desordens hemostáticas ocorrem na síndrome hemorrágica aguda, com alta trombocitopenia em função do consumo de plaquetas para formar os microtrombos induzidos pelo parasita (OLUBAYO; MUGERA, 1985).

Infecções naturais e experimentais de bovinos com *T. vivax* no Pantanal não resultaram em sinais clínicos significativos e os animais se recuperam na ausência de tratamento específico (PAIVA et al., 2000). Por outro lado, o primeiro surto de *T. vivax* em bovinos diagnosticado no município de Catolé do Rocha (Paraíba), se caracterizou por alta severidade da doença nos animais que apresentaram, além dos sintomas típicos, sinais nervosos caracterizados por incoordenação, tremores musculares, cegueira transitória e/ou permanente e hipermetria, decorrente de meningoencefalite e malácia (BATISTA et al., 2007). Esta patogenicidade severa foi reproduzida em ovinos e caprinos infectados experimentalmente, que apresentaram febre, anemia, leucopenia, perda de peso e miocardite. Estes estudos sugerem que, de um modo geral, os isolados que circulam na região do Pantanal são pouco virulentos comparados aos do semiárido, caracterizados pela alta severidade da doença nos animais (BATISTA et al., 2006; 2007; 2008; 2009; 2011a,b).

À medida que a infecção crônica causada por *T. vivax* evolui, o que ocorre com muitos animais sem tratamento específico, o parasitismo da fase aguda tende a

decrecer como resultado da resposta imune do hospedeiro. A variação antigênica do parasita e a produção de resposta imune específica prolongam a infecção crônica (TURNER, 1997). Anemia, atraso no crescimento, perda de peso, aborto, redução da fertilidade e queda na produção de leite são os achados mais frequentes em animais na fase crônica da infecção por *T. vivax* (MAIKAJE et al., 1991; VARGAS; ARELLANO, 1997). Estudos experimentais com *T. vivax* em cabras e ovelhas induziram a diferentes níveis de patogenicidade e redução da produtividade, e revelaram raças mais resistentes (MASAKE, 1980; OSAER et al., 1999).

1.1.4 Variação antigênica - aspectos imunopatológicos da infecção por *T. vivax*

Ao invadir e interagir com o hospedeiro vertebrado, *T. vivax* estimula a resposta imune do hospedeiro, que responde à infecção com a produção de anticorpos específicos. Os antígenos que estimulam a resposta imunológica são de dois tipos: de formas procíclicas (inseto), possuem uma abundante proteína invariante de superfície denominada prociclina e os estágios infectivos apresentam antígenos variáveis, também denominados de antígenos variáveis de superfície (VATs), os quais são formados por glicoproteínas, situadas na superfície externa dos tripanossomas, denominadas de glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) (Figura 3) (GARDINER, 1989; MYLER, 1993; MICHAEL; TURNER, 1997; BARRY; McCULLOCH, 2001).

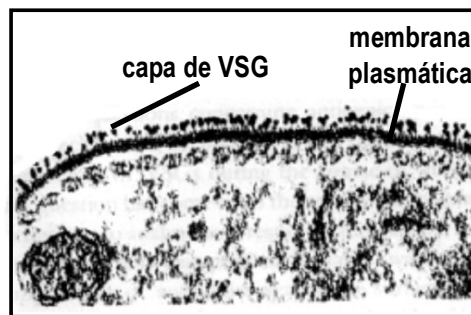


Figura 3: Microscopia eletrônica da região da membrana plasmática de formas tripomastigotas de *T. brucei*, mostrando a capa de VSGs marcada com ouro (partículas ouro a 5nm conjugadas a um anticorpo monoclonal anti-VSG) (Barry, 1979).

O enorme repertório de VSGs promove o escape do sistema imune, que é de extrema importância na relação parasita/hospedeiro dos tripanossomas africanos, *T. brucei*,

T. vivax e *T. congolense* (MYLER, 1993; BARRY; MCCULLOCH, 2001). Assim, os tripomastigotas sanguíneos que expressam uma determinada VSG se multiplicam enquanto o hospedeiro desenvolve uma resposta imune bastante efetiva. Esta resposta elimina a maioria dos tripanossomas, exceto uma pequena população que já substituiu a sua capa de VSG, constituída por novas glicoproteínas, que permitem a multiplicação desta nova população (Figura 4). Estas trocas ocorrem contínua e espontaneamente e o sistema imune do hospedeiro responde sucessivamente aos novos antígenos de superfície. Esse fenômeno contribui para a flutuação nos níveis parasitêmicos (MYLER, 1993; BARRY; MCCULLOCH, 2001), bem como é responsável por induzir a fase crônica e aumentar a probabilidade de transmissão a outros hospedeiros mamíferos através de insetos vetores (MICHAEL; TURNER, 1997).

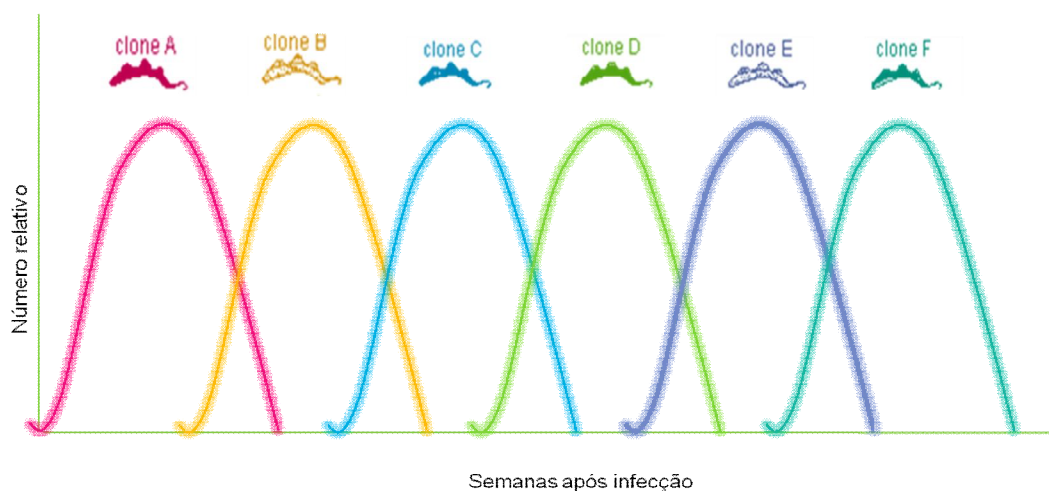


Figura 4: Esquema evidenciando flutuação dos níveis parasitêmicos pela resposta imune e surgimento de uma nova população de tripanossomas com glicoproteínas de superfície modificada.

1.1.5 Alterações hematológicas e bioquímicas

Embora evidenciada a presença do parasita nos tecidos do hospedeiro vertebrado, o *T. vivax* se multiplica no sangue, onde encontra todos os elementos necessários para sobreviver. Durante a infecção, *T. vivax* pode provocar diferentes graus de alterações no quadro hematológico, que são principalmente caracterizados pela diminuição de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito (ANOSA, 1983).

A anemia é o parâmetro hematológico mais comumente associado à tripanossomíase por *T. vivax* (FACER et al., 1982; ANOSA, 1983; OLUBAYO;

MUGERA, 1985). Estudos em bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* e *T. congolense* demonstraram o desenvolvimento de anemia macrocítica hipocrômica, associado à trombocitopenia e leucopenia (MAXIE et al., 1979). Outros estudos demonstraram redução dos níveis de microhematócrito em bovinos infectados com uma cepa do Leste da África que desenvolveram síndrome hemorrágica e em caprinos, que continuaram com anemia mesmo após o desaparecimento da parasitemia (GARDINER, 1989; SAROR, 1980).

Quanto aos valores bioquímicos, a diminuição nos níveis plasmáticos de glicose tem sido apontada como um importante achado clínico-laboratorial em animais infectados experimentalmente por *T. vivax* (KADIMA et al., 2000).

Estudos demonstram modificações importantes induzidas pela tripanossomíase no nível sérico protéico, onde é observado a necessidade do aumento de energia para manutenção após infecção, aumento sérico de ureia, excreção urinária de creatinina e perda de peso dos animais, além da elevação das proteínas plasmáticas totais (VERTEGEN et al., 1991; PAIVA et al., 2000).

1.1.6. Alterações anatomopatológicas

Nas infecções por *T. vivax* pode não ocorrer alterações anatomopatológicas, e quando ocorrem são geralmente inespecíficas. Entre as alterações mais comuns, destacam-se palidez na carcaça, atrofia gelatinosa dos depósitos de gordura corporal, aumento de volume do coração, esplenomegalia, acúmulo de líquido nas cavidades torácica e abdominal e saco pericárdio e aumento de volume dos gânglios linfáticos (STEPHEN, 1986).

De um modo geral, a tripanossomíase africana em bovinos pode causar inflamação com infiltração de células mononucleares em praticamente todos os tecidos (JONES et al., 2000). Em infecções naturais por *T. vivax* os animais são, em sua maioria, assintomáticos com raros sintomas hematológicos e no sistema nervoso central (JONES; DÁVILA, 2001; BATISTA et al., 2007). Em algumas ocasiões, a presença dos tripanossomas na corrente sanguínea é seguida da invasão do sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano, que resulta em lesões caracterizadas por meningoencefalite e malácia atingindo diversas estruturas que podem ser acompanhadas de sintomatologia

nervosa e ocasionalmente óbito (LOSOS; IKEDE, 1972; SEILER et al, 1981; WHITE LAW et al., 1988; CADIOLI, 2001; BATISTA et al, 2007; 2011b).

Embora o sítio de multiplicação de *T. vivax* seja preferencialmente no sangue, ocasionalmente, o período septicêmico é seguido pela migração extravascular do parasita (GARDINER, 1989). Este fato tem grande importância na fisiopatogenia das lesões inflamatórias e degenerativas descritas no coração (MASAKE, 1980), sistema nervoso (WHITE LAW et al, 1988; BATISTA et al, 2007; 2011b), testículos e epidídimo (BEZERRA et al, 2008). Em infecções com cepas de alta virulência, a fase aguda pode ser acompanhada de síndrome hemorrágica, coagulação intravascular disseminada e consequentes alterações isquêmicas, degenerativas e necróticas. Hemorragias generalizadas das vísceras e superfícies das mucosas são manifestações patológicas graves em ruminantes com síndrome hemorrágica na fase aguda (MWONGELA et al, 1981; ANOSA, 1983; ISOUN, 1975; WELLDE et al., 1983; OLUBAYO; MUGERA, 1987; GARDINER et al., 1989). Em conjunto, estas características são as principais causas de morte dos animais (MURRAY et al., 1979).

Estudos experimentais em caprinos infectados com isolados de *T. vivax* da Paraíba mostraram importantes alterações do SNC na fase crônica, os animais apresentaram sinais nervosos como meningoencefalite (BATISTA et al, 2011b).

A base histológica da lesão provocada pelo *T. vivax* em bovinos é a presença generalizada de trombos de fibrina e êmbolos formados por tripanossomas, localizados nos vasos do coração, pulmão, baço e cérebro (ISOUN, 1975). A presença de microtrombos nos pulmões, rins, fígado e nódulos linfáticos foi observada por Masake (1980) como importante característica da infecção em cabras que morreram durante a fase aguda da infecção.

1.1.7 *T. vivax* e Patologias Reprodutivas em Fêmeas

As tripanosomíases possuem grande influência na produtividade dos rebanhos. Graves distúrbios reprodutivos são relatados em consequência à infecção por estes parasitas, dentre elas a degeneração do hipotálamo, das glândulas pituitárias e das gônadas, com consequentes alterações nas concentrações plasmáticas e nas secreções dos hormônios necessários para a reprodução em ambos os sexos (SEKONI, 1994).

Batista et al (2007, 2008) descrevem que a infecção por *T. vivax* podem levar ao aborto, repetição de cio, nascimento de crias fracas e natimortos e anestro temporário ou permanente em animais infectados naturalmente. Ovinos e caprinos também podem apresentar aborto quando infectados por *T. vivax*.

Vários estudos comprovam os efeitos de *T. vivax* sobre a gestação de ruminantes experimentalmente infectados. Ogwu e Njoku (1987) afirmaram que animais infectados no terceiro trimestre da gestação desenvolvem a forma mais severa da doença que aqueles infectados no primeiro ou segundo trimestre de gestação.

Os efeitos da infecção por *T. vivax* na gestação avançada e no retorno à ciclicidade pós-parto de bovinos foram estudados por Okech et al. (1996) que relataram nascimentos prematuros, perdas perinatais, retenção placentária, baixo peso dos bezerros ao nascimento e, ainda, prolongado anestro pós-parto. Em ovinos, Elhassan et al. (1995) observaram que de cinco ovelhas infectadas no terço final da gestação, uma morreu antes de abortar, uma pariu prematuramente e as outras três tiveram parto eutócico. Entretanto, os cordeiros foram acometidos por uma infecção intrauterina e nenhum apresentou-se viável.

Na América Latina, a transmissão transplacentária de *T. vivax* parece ser de relevância epidemiológica. Abortos foram observados em ovinos infectados experimentalmente (DESQUESNES, 2004). Na África, o *T. vivax* é uma causa frequente de abortos, além disso, são responsáveis por aumentarem tanto a mortalidade como o intervalo entre partos em caprinos e ovinos (BAWA et al., 2000; MAIKAJE et al., 1991; AKINWALE et al., 2006).

1.1.8 *T. vivax* e Patologias Reprodutivas em Machos

O *T. vivax* é responsável por causar graves alterações no sistema reprodutor masculino. Nos testículos podem causar depleção das células espermatogênicas e destruição do tecido intersticial (túbulos seminíferos hipoplásicos além do desaparecimento das células de sertoli). No epidídimo pode levar ao aparecimento de áreas focais de necrose e ainda metaplasia escamosa do epitélio epididimário (ADAMU et al., 2007).

Com relação ao sêmen, a infecção por *T. vivax*, pode ocasionar uma queda na sua qualidade, manifestada por uma drástica redução da concentração espermática

(oligozoospermia ou mesmo azoospermia), diminuição do volume do sêmen, bem como o aumento do número de teratozoospermias (SEKONI et al., 2004). Essas alterações em casos crônicos leva à séria infertilidade podendo culminar com esterilidade (SEKONI et al., 1990; ADAMU et al., 2007).

A participação do *T. vivax* na patogênese na reprodução do macho foi confirmada por Bezerra et al (2008) que relataram a identificação de *T. vivax* no parênquima de órgãos reprodutivos pela primeira vez e comprovaram a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico das lesões. Estes autores estudaram a anatomopatologia de testículos e epidídimos de ovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. Após 30 dias de infecção os testículos dos animais foram avaliados e macroscopicamente apresentaram-se flácidos e pálidos. Na histologia, observou-se degeneração testicular moderada a acentuada com redução significativa da altura do epitélio seminífero e espessamento da membrana basal, epididimite perivascular intersticial e ainda hiperplasia do epitélio epididimário. Um dado relevante demonstrado neste trabalho foi a detecção do parasita nos tecidos testicular e epididimário pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.1.9 Diversidade genética, taxonomia e relações filogenéticas

Nos estudos filogenéticos iniciais, baseados em apenas uma sequência disponível da SSUrDNA do isolado Y486 (Oeste da África), a posição taxonômica de *T. vivax* foi muito discutida, levando a controvérsias sobre a polifilia do gênero *Trypanosoma* (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004; HUGHES; PIONTKVSKA, 2003; PIONTKVSKA; HUGHES, 2005). Porém, com a inclusão de novos isolados, as análises filogenéticas utilizando os genes ribossômicos posicionaram, com maior estabilidade, *T. vivax* como grupo irmão do clado que contém todos os tripanossomas africanos (CORTEZ et al., 2006).

Estudos moleculares recentes foram de grande importância nos avanços em diagnóstico, compreensão da epidemiologia e patologia, fatores de risco na transmissão, diversidade e relacionamento entre isolados da África e América do Sul (DICKIN; GIBSON, 1989; DIRIE et al., 1993; VENTURA et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; DUFFY et al., 2009; ADAMS et al., 2010). Estas investigações, que ainda compreendem um pequeno número de isolados de áreas geográficas muito restritas

diante da distribuição de *T. vivax*, têm sugerido uma grande complexidade genética de *T. vivax*, e do subgênero *Duttonella* em geral, particularmente na África.

O subgênero *Duttonella* apresenta *T. vivax* como espécie-tipo, com três subespécies originalmente descritas com base em dados morfológicos: *T. v. vivax* e *T. v. ellipsiprymni* na África, e *T. v. viennei* na América Central e do Sul (SHAW; LAINSON, 1972; HOARE, 1972). Dentre estas subespécies, *T. v. uniforme* foi caracterizado como o menor tripanossoma que ocorre, principalmente, na África central (HOARE, 1972). As demais subespécies têm sido reconhecidas por diferenças geográficas e aspectos biológicos, morfológicos e patológicos. *T. v. vivax* e *T. v. viennei* apesar de morfológicamente indistinguíveis, foram consideradas subespécies distintas devido a sua transmissão cíclica ou mecânica, respectivamente. A validade dessas subespécies sempre foi bastante discutida, já que *T. v. vivax* pode ser mecanicamente transmitido em áreas livres de tsé-tsé na África (SINSHAW et al, 2006). A falta de estudos conclusivos sobre a taxonomia de *T. vivax* levou a maioria dos pesquisadores a desconsiderarem essa classificação e a adotarem apenas *T. vivax* como única espécie do subgênero *Duttonella* (VENTURA et al., 2001; ADAMS et al., 2010).

Os primeiros dados moleculares mostrando que a complexidade em *T. vivax* poderia ser maior do que se conhecia foram observados em ensaios de PCR incapazes de detectar isolados de bovinos do leste da África e em moscas tsé-tsé (MASAKE et al, 1997; MALELE et al., 2003; NJIRU et al., 2004). O relacionamento genético inferido por sequências do gene SL demonstrou que isolados de *T. vivax* da América do Sul e um isolado do Oeste da África (Y486 da Nigéria) formavam um grupo altamente homogêneo e que, portanto, *T. v. vivax* e *T. v. viennei* correspondiam a uma só espécie (VENTURA et al., 2001). Entretanto, em estudos filogenéticos baseados no gene SSU rRNA, um isolado do Leste da África (IL3905 do Quênia) se apresentou pouco relacionado com os isolados da América do Sul e também com isolados do Oeste da África, corroborando a complexidade de *T. vivax* (CORTEZ et al., 2006).

Mais recentemente, um tripanossoma obtido em um antílope capturado em Moçambique (Leste da África) foi comparado filogeneticamente com os isolados de *T. vivax* previamente descritos. Este isolado foi posicionado com *T. vivax*, porém, apresentou distante de todos os outros isolados, mesmo os da África. As diferenças morfológicas e moleculares sugeriram que este isolado pode representar uma nova espécie relacionada à *T. vivax* e corroboraram a alta complexidade do subgênero

Duttonella (RODRIGUES et al., 2008). Esse novo isolado foi comparado com outros isolados Africanos e Sul Americanos com base em sequências do gene gGAPDH, reafirmando a homogeneidade dos isolados da América do Sul e a maior proximidade deles com isolados do Oeste da África quando comparados com isolados do Leste da África (ADAMS et al., 2010). Filogenias inferidas com sequências do gene gGAPDH amplificadas a partir de preparações e DNA de probóscides de *Glossina pallidipes* e *G. swynnertoni* coletadas na Tanzânia (Parque do Serengueti) revelaram dois novos genótipos de *T. vivax*: *T. vivax* A e B, que foram filogeneticamente distintos dos isolados da África (Oeste) e América do Sul denominados de *T. vivax* C (ADAMS et al., 2010). Atualmente, o reconhecimento de novas espécies e/ou genótipos deve ser baseado em filogenias moleculares inferidas com os genes SSU rRNA e gGAPDH. Embora a divergência de sequências destes 2 novos genótipos seja grande o suficiente para classificá-los como novas espécies do subgênero *Duttonella*, para tanto, é altamente recomendável que sejam obtidas mais informações, tais como aspectos morfológicos, biológicos, associação com hospedeiros vertebrados e patogenicidade.

A existência de genótipos de *T. vivax* com diferentes graus de virulência e patogenicidade foi previamente associada à morfologia dos parasitas. Isolados de menor tamanho encontrados em bovinos no oeste africano foram relacionados com doença aguda, entretanto isolados de maior tamanho foram associados com doença crônica em bovinos, ovinos e animais silvestres no leste da África (LOSOS; IKEDE, 1972; HOARE, 1972; GARDINER; MAHMOUD, 1992). A infecção natural por *T. vivax* varia de acordo com o isolado assim como com a espécie de animal infectado. Búfalos africanos são sempre assintomáticos enquanto bovinos, ovinos e caprinos das mesmas regiões variam de tripanotolerantes a altamente suscetíveis, podendo apresentar altos níveis de parasitemia e anemia (DWINGER et al., 1986).

Até o momento, estudos filogenéticos moleculares baseados nos genes SSU rDNA, ITS rDNA, SL e CATL demonstraram uma alta homogeneidade genética entre isolados de animais assintomáticos do Pantanal (BR) e Venezuela e isolados de animais com sintomatologia severa na Paraíba e Rio Grande do Sul. Portanto, demonstrando que bovinos infectados com o mesmo isolado ou isolados muito similares geneticamente apresentam diferentes sinais clínicos da doença, que pode variar de totalmente assintomática a muito grave (VENTURA et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; BATISTA et al., 2009; DA SILVA et al., 2009).

1.1.10. Diagnóstico

O diagnóstico de infecções por *T. vivax* é rotineiramente realizado por métodos parasitológicos, como esfregaços de sangue e microhematócrito, que são pouco sensíveis, particularmente em animais na fase crônica, que apresentam baixa parasitemia. Os primeiros ensaios sorológicos eram também pouco sensíveis e não diferenciavam infecções correntes das passadas (WELLS, 1984; GARDINER; MAHMOUD, 1992). Os ensaios imunoenzimáticos de ELISA (NANTULYA et al., 1992) já puderam identificar as infecções atuais, porém, ainda se mostravam de baixa especificidade e sensibilidade (REBESKI et al., 1999).

As baixas parasitemias nos animais cronicamente infectados dificultam o diagnóstico, que é comumente efetuado por métodos parasitológicos pouco sensíveis ou por métodos sorológicos pouco específicos. Essa situação, em conjunto com a dificuldade de se obter culturas *in vitro* que permitam dispor de quantidades abundantes de parasitas, tem limitado significativamente o estudo dessa espécie a fim de desenvolver métodos diagnósticos, assim como a análise da diversidade genética e estudos populacionais.

Com o advento dos métodos moleculares, testes PCR foram desenvolvidos com base em DNA satélite ou microsatélite (MASIGA et al., 1992; MORLAIS et al., 2001), espaçador interno transcrito do rDNA (ITS1) (DESQUESNES et al., 2001; ADAMS et al., 2008) e gene spliced-leader (SL) (VENTURA et al., 2001). Métodos baseados nesses marcadores têm limitações em termos de sua incapacidade em detectar populações de *T. vivax* do leste Africano (VENTURA et al., 2001; CORTEZ et al., 2006). A maioria dos métodos não detecta isolados de *T. vivax* do leste da África, com exceção de um ensaio baseado em um antígeno de *T. vivax* que detectou isolados do oeste e leste Africano (MASAKE et al., 1997). No entanto, quando aplicado em amostras de DNA de probóscides da moscas tsé-tsé, nem sempre os resultados eram positivos, indicando a existência de genótipos desconhecidos de *T. vivax* (MALELE et al., 2003; NJIRU et al., 2004).

Recentemente, foi desenvolvido um ensaio de PCR baseado no gene que codifica a enzima catepsina L-like capaz de detectar todos os genótipos de *T. vivax*. Esse método se mostrou específico e sensível na detecção do parasita em amostras de sangue de ruminantes do Brasil, oeste e leste da África (CORTEZ et al., 2006; 2009).

Para estudos epidemiológicos de fatores de risco das tripanossomíases de um modo geral é muito importante que se conheça os hospedeiros reservatórios, os vetores e a prevalência das diferentes espécies de tripanossomas em diferentes regiões geográficas. Grandes problemas têm sido encontrados na identificação dos tripanossomas diretamente em amostras de sangue, devido às baixas parasitemias e infecções mistas, e também em amostras de moscas tsé-tsé, devido as baixas taxas de infecção e presença de infecções mistas. Estudos recentes vêm tendo sucesso na identificação de *T. vivax* em amostras de tsé-tsé, e também de outras espécies de tripanossomas africanos, utilizando o método de FFLB (Fluorescent Fragment Length Barcoding). Este método consiste na amplificação de pequenas regiões variáveis que estão presentes nas sequências de 18S e 28Sα rDNA (100 a 400bp), gerando perfis espécie-específicos (HAMILTON et al., 2008; 2011a,b; ADAMS et al., 2010).

1.1.11 Tratamento

O tratamento satisfatório da tripanossomíase requer mais do que administração correta da droga tripanocida. Em vista dos efeitos secundários decorrentes da toxicidade e o aparecimento de resistência dos parasitas, estes compostos foram progressivamente substituídos (GARDINER, 1989). Atualmente, as principais drogas tripanocidas em uso são: cloreto de Isometamídio (Trypanidium), aceturato de dimenazene (Berenil®, Ganaseg®), brometo de piritidium (Protidium®), brometo de homidium (Etidium®), cloreto de homidium (Novidium®) e cloreto ou sulfato de quinapiramine (Triquin®) (VARGAS; ARELLANO, 1997, PEREGRINE et al., 1987; GEERTS et al., 1997; 2001).

Relatos de cepas resistentes a drogas tripanocidas têm surgido nos últimos anos, caracterizados por recidiva parasitológica, clínica e necessidades de aplicação de altas doses do medicamento. A rapidez com a qual os tripanossomas desenvolvem resistência a estes medicamentos tem dificultado o tratamento e controle da tripanossomíase na África (KUPPER; WOLTERS, 1983, SCHUNEFELD et al, 1987). Alguns autores acreditam que o reaparecimento dos parasitas após o tratamento está relacionado a sua localização extravascular, especialmente no sistema nervoso central, líquido cefalorraquidiano e humor aquoso (WHITELAW et al., 1988; GARDINER, 1989),

locais que segundo Gardiner (1989) garantem a proteção do parasita à ação das drogas tripanocidas.

Algumas drogas de efeito curativo apresentam ação profilática por manter a concentração do princípio ativo nos tecidos por um longo período e, dessa forma, não permitem recidivas parasitológicas ou novas contaminações do animal (PEREGRINE, 1994). Além do período prolongado da droga nos tecidos do animal, a eficiência das drogas na profilaxia da tripanossomíase depende da adaptação do parasita aos tripanocidas. Estudos analisando o poder profilático do isometamidium em cepas de *T. vivax* de diferentes origens demonstraram que a proteção dos animais que receberam dose profilática de 0,5mg/kg durou dois meses quando os animais foram inoculados com uma cepa do oeste da África (Nigéria) e um mês quando inoculados com uma cepa do leste da África (Quênia) (PEREGRINE et al., 1987). A tripanossomíase crônica muitas vezes não responde à terapia e distúrbios na taxa de circulação de ferro no organismo e ausência de hematopoiese parecem ser irreversíveis. Assim, os animais afetados permanecem magros e anêmicos, apesar do tratamento com tripanocida (KINABO, 1993, VAN DEN BOSSCHE et al., 2000).

Embora o uso destes medicamentos possa reduzir as taxas de mortalidade, geralmente tem baixo impacto na produção animal. Este é o caso, especialmente, em áreas onde os agricultores usam tripanocidas de forma terapêutica ao invés de profilaticamente. O desenvolvimento de resistência do tripanossoma ao tripanocida é uma ameaça permanente à sua utilização sustentável no controle da tripanossomíase. Mesmo em áreas onde a resistência ao tripanocida ainda não foi demonstrada, a probabilidade do seu desenvolvimento deve influenciar a seleção de uma estratégia de controle adequada (VAN DEN BOSSCHE et al., 2000). A ação quimioprofilática contra as formas sanguíneas pode se estender ao parasita na mosca tsé-tsé. Estudo do efeito do isometamidium no desenvolvimento de formas infectantes de *T. vivax* em *Glossina palpalis* revelou que quando as moscas foram alimentadas in vitro com sangue contendo 1mg/ml de isometamidium e posteriormente alimentadas em animais infectados, nenhum inseto foi infectado, ao passo que quando as moscas foram alimentadas com sangue sem o medicamento, seguido da alimentação em animais infectados, 43% dos insetos foram identificados apresentando *T. vivax* em suas peças bucais (AGU, 1984).

A profilaxia da tripanossomíase africana consiste em quebrar a continuidade da cadeia de transmissão glossina-animal-tripanossoma. Nesse sentido, Jordan (1986) cita

as seguintes medidas de controle da doença: uso de raças tripanotolerantes; uso de drogas tripanocidas com fins curativo e profilático; aplicação de inseticidas residuais e controle biológico do vetor. Além disso, o tratamento dos animais acometidos associado ao controle dos vetores através do uso de inseticidas são as medidas mais eficazes para o controle da doença.

Nas áreas onde há ausência da transmissão cíclica do *T. vivax* por mosca tsé-tsé e a transmissão ocorre mecanicamente, os métodos de controle e tratamento são relativamente simples. O tratamento precoce, visto que a parasitemia é sempre mais alta nos períodos iniciais da doença, provoca a rápida cessão da transmissão mecânica por insetos, se este for o principal modo de transmissão (STEPHEN, 1986). Como forma de prevenir resistência a drogas tripanocidas, Vargas; Arellano (1997) sugerem que no Continente Americano a administração das drogas deve ser restrita somente aos animais infectados, devendo-se evitar a aplicação massiva da droga no rebanho.

1.2 OVÁRIO MAMÍFERO

1.2.1 Aspectos morfológicos e estruturais

O ovário é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano. No córtex ovariano podem ser encontrados folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou em atresia, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996). No córtex, também encontram-se colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ, 1995). A região medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário. Ela consiste de tecido conjuntivo fibroblástico (fibroblasto, fibras de colágeno I e III e fibronectina), nervos e sistemas vasculares (SMITH et al., 1994) que atingem o ovário pelo hilo (HAFEZ, 1995).

O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou gametogênica (produção e liberação de ovócitos) e uma endócrina ou esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteroides) (HAFEZ, 1995). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (PINEDA,

1989). A produção de ovócitos ou gametas femininos é resultante da interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

1.2.2 Folículos Ovarianos

O folículo ovariano é a unidade estrutural e funcional do ovário, contendo um oócito, cercado por células da granulosa, uma membrana basal e células da teca associadas e organizadas sobre a membrana basal (WU et al., 2001). O folículo ovariano sustenta o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001) e de acordo com o grau de evolução pode se dividir em: pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (FIGUEIREDO et al., 2001). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular ovariana (SAUMANDE, 1981) e estão subdivididos de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, em folículos primordiais, os quais apresentam o oócito envolto por uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso ou células da granulosa pavimentosas e cuboidais. Folículos primários, que apresentam uma única camada de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito. Folículos secundários, os quais apresentam uma zona pelúcida evidente, e possui duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito (HULSHOF et al., 1994). Quando há o acúmulo do líquido folicular, na cavidade antral, o folículo é denominado terciário, que posteriormente, evolui para o folículo pré-ovulatório ou de De Graaf (Figura 5) (GEORGE et al., 1998).

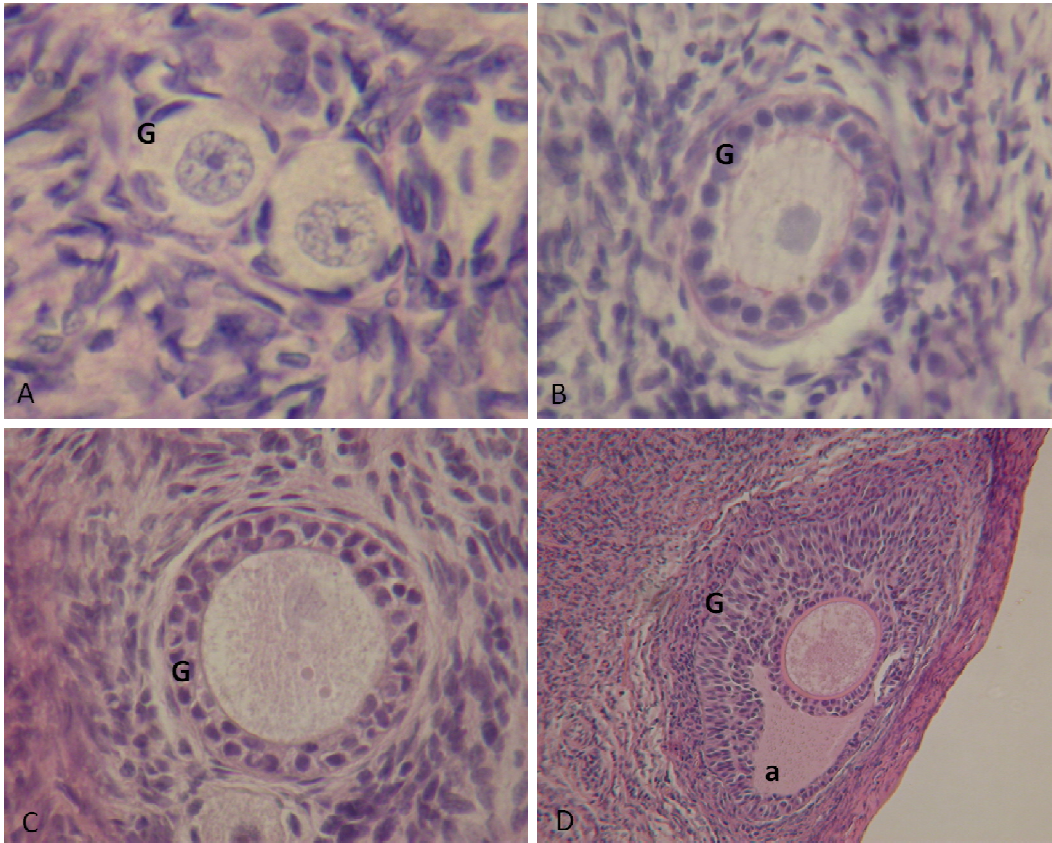


Figura 5: A – Folículo primordial (caprino); B – Folículo primário (caprino); C – Folículo secundário (caprino); D – Folículo terciário (caprino). G – células da granulosa, a – antro. Fonte: LAMOFOPA.

O desenvolvimento folicular normal para que o oócito seja capaz de sofrer fertilização e desenvolvimento embrionário depende de uma sucessão complexa de interações de fatores parácrinos, autócrinos e endócrinos no folículo. Em qualquer fase durante este desenvolvimento, o folículo normalmente pode continuar o seu desenvolvimento ou, mais frequentemente, sofrer o processo de atresia (WU et al., 2001).

1.2.3 Atresia

Nem todos os oócitos desenvolvem-se até a maturação. Para cada oócito que chega à maturação e ovulação, vários iniciam o desenvolvimento, mas nunca atingem a maturidade (HAFEZ, 1995). Isto ocorre devido ao fenômeno da atresia, um processo fisiológico, de duração desconhecida, que pode ocorrer por via degenerativa e/ou

apoptótica em mamíferos, como também em outras espécies (JOHNSON, 2003). Aproximadamente 99,9% dos folículos presentes no ovário se tornam atresícos durante seu crescimento e maturação (CARROL et al., 1990). Os folículos pré-antrais sofrem comumente uma atresia conhecida como do tipo I, onde as alterações degenerativas ocorrem primariamente no oócito. Já os folículos antrais sofrem mais frequentemente, a atresia do tipo II, sendo nesta as primeiras alterações ocorridas nas células da granulosa (Figura 6) (FIGUEIREDO et al., 2001).

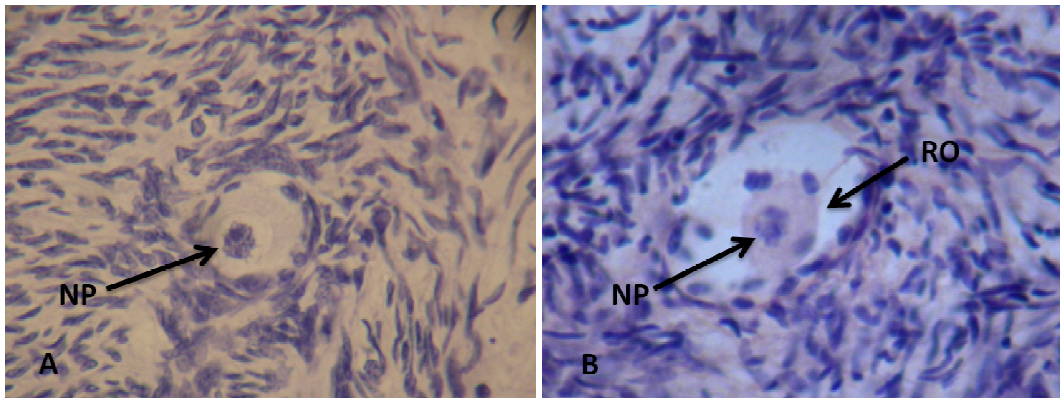


Figura 6: Folículos em atresia. A – Degeneração do tipo I; B – Degeneração do tipo II. NP – núcleo picnótico, RO – retração oocitária. Fonte: LAMOFOPA.

Se o folículo antral não for exposto a um ambiente gonadotrofinico apropriado na fase terminal, a atresia se iniciará quase que imediatamente. Os folículos que regridem são invadidos por células inflamatórias, e a área previamente ocupada por eles acaba sendo preenchida por tecido conjuntivo, e o folículo é então substituído por uma cicatriz ovariana, conhecida como corpo atresíco (CUNNINGHAM, 1993). Independente da fase na qual ocorre, e apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, consequentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2001).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

1.3.1.1 Avaliar as alterações anatomo-histopatológicas em ovários de cabras infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax* e verificar a associação com a presença do parasita no tecido desse órgão.

1.3.2 Específicos

1.3.2.1 Avaliar as taxas de degeneração folicular em ovários de cabras experimentalmente infectadas por *Trypanosoma vivax*;

1.3.2.2 Pesquisar por meio de PCR a presença de *T. vivax* em tecido ovariano de cabras experimentalmente infectadas com *T. vivax*;

1.3.2.3 Verificar a associação entre as alterações anatomo-histopatológicas ovarianas com a presença do *T. vivax* nos ovários.

1.4 REFERÊNCIAS

- ABEBE, R.; WOLDE, A. Preliminary survey on equine trypanosomosis and its vectors in Asosa and Homosha districts in Benishangul Gumuz Regional State, northwest Ethiopia. **Livestock Research Rural Development**, v. 22, p. 1–4, 2010.
- ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; MALELE, I.I.; GIBSON, W.C. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught *tsé-tsé* in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 439-44, 2008.
- ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C. African trypanosomes: celebrating diversity. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 324–328, 2010.
- ADAMU, S.; FATIHU M.Y.; USEH N.M.; MAMMAN M.; SEKONI V.O.; ESIEVO K.A.N. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet Parasitol.** v.43, p.29-34, 2007.
- AGU, W. E. The effect of isometamidium chloride on *Trypanosoma vivax* occurring within the insect vector (Glossina). **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 4, n. 70, p. 431-435, 1984.
- ANDRIANARIVO, A. G.; MUYRA, P.; OPOLLO, M. M.; LOGAN-HENFREY, L.L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of primary infection on bone marrow progenitor cells from N'dama and Boran cattle. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.80, n.3, p. 407-418, 1995.
- AKINWALE, O.P.; NOCK, I.H.; ESIEVO, K.A.; EDEGHERE, H.U.; OLUKOSI, Y.A. Study on the susceptibility of Sahel goats to experimental *Trypanosoma vivax* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 210–213, 2006.
- ANOSA, V. O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. Review Article. **Veterinary Medical**, v. 30, p. 717-741, 1983.
- APPLEWAITE, L. M. Small ruminant trypanosomiasis in Guyana – A preliminary report. **British Veterinary Journal**, v.1, n. 146, p. 93-94, 1990.
- AUTY, H.; MUNDY, A.; FYUMAGWA, R.D.; PICOZZI, K.; WELBURN, S.; HOARE R. Health management of horses under high challenge from trypanosomes: a case study from Serengeti, Tanzania. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 233–24, 2008.
- BARRY, J. D. Capping of variable antigen of *Trypanosoma brucei* and its immunological and biological significance. **J. Cell Sci**, v. 37, p. 287-302, 1979.
- BARRY, D. J.; MCCULLOCH, R. Antigenic variation in Trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. **Advances in Parasitology**, v. 49, p.1-70, 2001.

BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.; GUERRA, J.L. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 31–37, 2006.

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

BATISTA, J.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIRA, R.A.; CARVALHO, J.R.G.; ROSADO NETO, A.M.; PETRI, A.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Clinical, epidemiological and pathological signs of natural infection in cattle by *Trypanosoma vivax* in Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 63–69, 2008.

BATISTA, J.S.; OLIVEIRA, A.F.; RODRIGUES, C.M.F.; DAMASCENO, C.A.R.; OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; PAIVA, E.S.; BRITO, P.D.; MEDEIROS, J.M.F.; RODRIGUES, A.C.; TEIXEIRA, M.M.G. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 131–135, 2009.

BATISTA, J.S.; RODRIGUES, C.M.; OLINDA, R.G.; SILVA, T.M.; VALE, R.G.; CÂMARA, A.C.; REBOUÇAS, R.E.; BEZERRA, F.S.; GARCÍA, H.A.; TEIXEIRA, M.M. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research; in print**. 2011a. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/v34m18634k7v2050/>> Acesso em 25 Jul. 2011a.

BATISTA, J.S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; BEZERRA, F.S.B.; GARCÍA, H.A.; SOTO-BLANCO, B.; TEIXEIRA, M.M.G. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Veterinary Research**, v. 42, p 63, 2011b.

BAWA, E.K.; OGWU, D.; SEKONI, V.O. OYEDIPE, E. O.; ESIEVO, K.A.; KAMBAI, J.E. Effects of *Trypanosoma vivax* on pregnancy of yankansa sheep and the results of homidium chloride chemotherapy. **Theriogenology**, v.54, n.7, p.1033-1040, 2000.

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

CADIOLI, F. A. **Infecção experimental em jumento (*Equus asinus*) com *Trypanosoma evansi* Steel (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae)**. 135 f. 2001. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

CARROL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 90, p. 321-327, 1990.

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

CAVAZZANA, M. JR.; MARCILI A.; LIMA L.; SILVA, F. M. D.A.; JUNQUEIRA, A. C.V.; VELUDO, H.H.; VIOLA L. B.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.B.; PAIVA, F.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt *b*) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 345-355, 2009.

CORTEZ, A.P.; VENTURA, R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; AÑEZ, N.; MACHADO, R.Z.; GIBSON, W.C.; TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South América and Africa. **Parasitology**, v.133, p.159-169, 2006.

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

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, p. 3 -9, 2001.

CUGLOVICI, D.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; REIS-CUNHA, J.L.; CARVALHO, A.U.; RIBEIRO, M.F. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 320-326, 2010.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 454p.

DA SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; POLENZ, M.F.; POLENZ, C.H.; TEIXEIRA, M.M.G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2550-2554, 2009.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. Ann. N. Y. **Acad. Sci.** v. 916, p.199-212, 2000.

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

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DAVILA, A.M.R. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 610-14, 2001.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, v.119, p. 9-19, 2004.

DESQUESNES, M.; BOSSARD, G.; THEVENON, S.; PATREL, D.; RAVEL, S.; PAVLOVIC, D.; HERDER, S.; PATOUT, O.; LEPETITCOLIN, E.; HOLLZMULLER, P.; BERTHIER, D.; JACQUIET P.; CUNY, G. Development and application of an antibody- ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. **Veterinary Parasitology**, v.162, n. 3– 4, p. 214–220, 2009.

DHOLLANDER, S.; JALLOW, A.; MBODGE, K.; KORA, S.; SANNEH, M.; GAYE, M.; BOS, J.; LEAK, S.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Equine trypanosomosis in the Central River Division of The Gambia: a study of veterinary gateclinic consultation records. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, p.152–162, 2006.

DICKIN, S. K.; GIBSON, W. C. Hybridization with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax* . **Molecular Biochemical and Parasitology**, v. 33, p. 135-142, 1989.

DIRIE, M. F.; OTTE, M. J.; THATTHI, R.; GARDINER, P. R. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Parasitology**, v. 106, p. 21-29, 1993.

DUFFY, C.W; MORRISON, L.J; BLACK, A.; PINCHBECK, G.L; CHRISTLEY, R. M.; SCHENEFELD, A.; TAIT, A. TURNER, C.M.R.; MACLEOLD, A. *Trypanosoma vivax* displays a clonal population structure. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 13, p. 1475 -1483, 2009.

DWINGER, R.H.; GROOTENHUIS, J.G.; MURRAY, M.; MOLOO, S.K.; GETTINBY, G. Susceptibility of buffaloes, cattle and goats to infection with different stocks of *Trypanosoma vivax* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. **Research Veterinary Science**, v. 41, p. 307-315, 1986.

ELHASSAN, E.; IKEDE, B.O.; ADEYEMO, O. Trypanosomosis and reproduction: II. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on pregnancy and post-partum cyclicity in ewes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 27, n. 1, p. 9-14, 1995.

FACER, C. A.; CROSSKEY, J. M.; CLARKSON, M. J. Immune haemolytic anaemia in bovine trypanosomiasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 92, n. 3, p. 393-401, 1982.

FAYE, D.; PAULO, J. L.; PEREIRA-ALMEIDA, P.J.L.; GOOSSENS, B.; OSAER, S.; NDAO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; NIEBERDING, F.; GEERTS, S. Prevalence and incidence of trypanosomosis in horses and donkeys in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 101–114, 2001.

FERNANDEZ, A.J. Tripanosomiasis de los bovídeos de Venezuela. **Gac Méd. Caracas**, v. 38, p. 17-21, 1931.

FIASSON, R.; MAYER, M.; PIFANO, F. Le cariacou (*Odoceileus gymnotis*) porteur de *Trypanosoma vivax* en Venezuela. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 41, p. 206-208, 1948.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA**. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela. p. 227-256, 2001.

GARCÍA, H.; GARCIA, M.E.; PEREZ, H.; MENDOZA-LEON, A. The detection and PCR-based characterization of the parasites causing trypanosomiasis in water-buffalo herds in Venezuela. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 359-70, 2005.

GARCÍA, H.; GARCIA, M.E.; PEREZ, G.; BETHENCOURT, A.; ZERPA, E.; PEREZ, H.; LEON, A.M. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, p. 297–305, 2006.

GARCÍA, H.; RANGEL-RIVAS, A.; CONTRERAS, I.; GARCÍA, M.E.; GARCÍA, F.; PERRONE T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios san fernando y biruaca, estado Apure, Venezuela. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 19, n. 3, p. 230 – 237, 2009.

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

GARDINER, P. R.; MAHMOUD, M. M. Salivarian trypanosomes grateful to the following individuals for kindly providing DNA or causing disease in livestock outside sub-Saharan Africa. In “Parasitic blood samples: *T. vivax* from West Africa and Colombia were donated Protozoa”, (J. P. Kreier and J. R. Baker, Eds.), p. 277–313, 1992.

GEERTS, S.; KAAGERUKA, P.; DE DEKEN, R.; BRANDT, J.R.A; KAZADI, J. M.; DIARRA, B.; EISLER, M.C.; LEMMOUCHI, Y.; SCHACHT, E., HOLMES, P.H. Extension of the prophylatic effects of isometamidium and ethidium using sustained release devices. *Proceedings of the first internet conference on salivarian trypanosomes*, 36-38, 1997.

GEERTS, S.; HOLMES, P.H.; EISLER, M.C.; DIAL, O. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. **Trends Parasitol**, v. 17, p. 25-28, 2001.

GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. **Histologia Comparada**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.

GONZALES, J.L.; CHACON, E.; MIRANDA, M.; LOZA, A.; SILES, L.M. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 9–16, 2007.

GUERRA, R.M.S.N.C.; FEITOSA JÚNIOR, A.B.; SANTOS, H.P.; ABREU SILVA, A.L.; SANTOS, A.C.G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 833-835, 2008.

GUTIERREZ, C.; CORBERA, A.J.; MORALES, M.; BUSCHER, P. Trypanosomosis in goats: current status. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 300–310, 2006.

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. 573p.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GAUNT, M.W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1393-1404, 2004.

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, P.B.; ADAMS, E.R.; MALELE, I.I.; GIBSON, W.C. A novel, high throughput technique for species identification reveals a new species of *tsé-tsé*-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 26–33, 2008.

HAMILTON, P.B.; LEWIS, M.D.; CRUICKSHANK, C.; GAUNT, M.W.; YEO, M.; LLEWELLYN, M.S.; VALENTE, S.A.; MAIA DA SILVA, F.; STEVENS, J.R.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 44–51, 2011.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford: 1972.

HUGHES, A.L.; PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, p. 644-652, 2003.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN EN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 18, p.78-80, 1994.

ISOON, T. T. The histopathology of experimental disease produced in mice infected with *Trypanosoma vivax* . **Acta Tropica**, v. 32, n. 3, p. 267-272, 1975.

JOHNSON, A.L. **Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles.** *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 185–201, 2003.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**, 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JONES, T.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax*: out of Africa. **Trends in Parasitology**, v. 2, n. 17, p. 99-101, 2001.

JORDAN, A. M. **Tripanosomiasis control and African rural development.** New York: Logman, 1986. 325p.

KADIMA, K. B.; GYANG, E. O.; SAROR, D. I.; ESIEVO, K. A. N. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. **Veterinarski Arhiv**, v. 70, n. 2, p. 67-74, 2000.

KINABO, L.D.B. Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. **Acta Trop**, v.54, p. 169-183, 1993.

KUPPER, W.; WOLTERS, M. Observation on drug resistance of *Trypanosoma (Nonnomonas) congulense* and *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in cattle at a feedlot in the Northern Ivory Coast. **Tropenmedizin Parasitologie**, v. 3, n. 34, p. 203-205, 1983.

LEGER, M.; VIENNE, M. Epizootie a trypanosomes chez les bovines de la Guyane Française. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique**, v.12, p.258-266, 1919.

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

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congulense*, *T. vivax*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 1-71, 1972.

MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.46-47, 2004. Supl. 1.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I.B.; RIBEIRO, L.R.; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MIGUITA, M.; MELO E.P.S.; ALMEIDA, R.F.C.; LIMA JÚNIOR, M.M. The development of an enzymelinked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 801–807, 2006.

MADRUGA, M.S.; MEDEIROS, E.J.L.; SOUSA, W.H. ET AL. Chemical composition and fat profile of meat from crossbred goats reared under feedlot systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.547-552, 2009.

- MAIKAJE, D. B.; SANNUSI, A.; KYEWALABYE, E. K.; SAROR, D. I. The course of experimental *Trypanosoma vivax* infection in Uda sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 38, p. 267-274, 1991.
- MALELE, I.I.; CRASKE, L.; KNIGHT, C.; FERIS, V.; NJIRU, Z.; HAMILTON, P.; LEHANE, S., LEHANE, M.; GIBSON, W.C. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild *tsé-tsé* flies in Tanzania by PCR. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 271-79, 2003.
- MASAKE, R. A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **The Veterinary Record**, v. 13, p. 551-557, 1980.
- MASAKE, R. A.; MAJIWA, P. A. O.; MOLOO, S. K.; MAKAU, J. M.; NJUGUNA, J. T.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O. K.; NANTULYA, V. M. Sensitive and specific of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v. 85, p. 193-205, 1997.
- MASIGA, D. K.; SMYTH A. J.; HAYES, P.; BROMIDGE T. J.; GIBSON, W. Sensitive detection of trypanosomes in *tsé-tsé* flies by DNA amplification. **International Journal Parasitology**, v. 22, p. 909-918, 1992.
- MAXIE, M. G.; LOSOS, G. J.; TABEL, H. Experimental bovine tripanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*) I. Symptomatology and clinical pathology. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 30, p. 274-282, 1979.
- MICHAEL, C.; TURNER, R. The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 227-231, 1997.
- MOLOO, S. K.; GETTINBY, G.; OLUBAYO, R. O.; KABATA, J. M.; OKUMU, I. O. A comparison of African buffalo, N'Dama and Boran cattle as reservoirs of *Trypanosoma vivax* for different *Glossina* species. **Parasitology**, v. 106, p. 277-282, 1993.
- MOLOO, S. K.; ORINDA, G. O.; SABWA, C. L.; MINJA, S. H.; MASAKE, R. A. Study on the sequential *tsé-tsé*-transmitted *Trypanosoma congolense*, *T. brucei brucei* and *T. vivax* infections to African buffalo, eland, waterbuck, N'Dama and Boran cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p. 197-213, 1999.
- MORLAIS, I.; RAVEL, S.; GRÉBAUT, P.; DUMAS, V.; CUNY, G. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. **Acta Tropica**, v. 80, p. 207-13, 2001.
- MURDOCH, W.J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biol. Ver**, v. 71. p. 529-543, 1996.
- MURRAY, P.K.; MURRAY, M.; WALLACE, M.; MORRISON, W.I.; MCINTYRE, W.I.M. Trypanosomiasis in N'Dama and Zebu cattle. II. The influence of weight of

infection on the severity of the disease. International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control. 15th Meeting. Banjul, The Gambia, 1979.

MURRAY, M.; DEXTER, T. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. **Acta Tropica**, v. 45, p.389-432, 1988.

MYLER, P. J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Tropica**, Basel, v.53, p.205-225, 1993.

MWONGELA, G. N.; KOVATCH, R. M.; FAZIL, M. A. Acute *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle in Coast Province, Kenya. **Tropical Animal Health and Production**, v. 13, n. 2, p. 63-69, 1981.

NANTULYA, V. M.; LINDQVIST, K. J.; STEVENSON, P.; MWANGI, E. K. Application of a monoclonal antibody-based antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (antigen ELISA) for field diagnosis of bovine trypanosomiasis at Nguruman, Kenya. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 86, p. 225-230, 1992.

NJIRU, Z.K.; MAKUMI, J.N.; OKOTH, S.; NDUNGU, J.M.; GIBSON, W.C. Identification of trypanosomes in *Glossina pallidipes* and *G. longipennis* in Kenya. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 29-35, 2004.

NJIOKOU, F.; SIMO, G.; NKININ, S. W.; LAVEISSIÈRE, C.; HERDER, S. Infection rate of *Trypanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. **Acta Tropica**, v. 92, p. 139-146, 2004.

OGWU, D.; NJOKU, C. O.; OSORI, D. I. K. Effects of experimental *Trypanosoma vivax* infection on first-, second-, and third-trimester pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 25, n. 3. p. 383-398, 1986.

OGWU, D.; NJOKU, C.O. Effects of pregnancy on clinical manifestation of bovine trypanosomiasis. **Veterinary Parasitologist**, v. 24. p. 25-33, 1987.

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

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

OLUBAYO, R. O.; MUGERA, G. M. Patogénese of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* in cattle. I. Disseminated intravascular coagulation. **Bulletin of Animal Health an Production in Africa**, v. 33, n. 3, p. 211-217, 1985.

OLUBAYO, R. O.; MUGERA, G. M. The pathogenese of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* infection. II. Pathomorphological changes. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 35, n. 4, p. 286-292, 1987.

OSAER, S.; GOOSENS, B.; KORA, S.; GAYE, M.; DARBOE, L. **Veterinary Parasitology**, v.82, n.2, p.1001-119, 1999.

OSÓRIO, A.L.A.R.; MADRUGA, C.R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C.O.; RIBEIRO, L.R.R.; COSTA, S.C.G. *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the new world - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 1-13, 2008.

OTTE, M. J.; ABUABARA, J. Y.; WELLS, E. A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 26, p. 146-156, 1994.

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A. DE; OSHIRO, E.T.; SALVADOR, S. C., NAKAZATO, L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, 1997. Suplemento.

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

PEREGRINE, A. S.; MOLOO, S. K.; WHITELAW, D. D. Therapeutic and prophylactic activity of isometamidium in Boran cattle against *Trypanosoma vivax* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. **Research in Veterinary Science**, v. 43, n. 2, p. 268-270, 1987.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and delivery systems haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 5, p. 223, 1994.

PINCHBECK, G.L.; MORRISON, L.J.; TAIT, A.; LANGFORD, J.; MEEHAN, L. Trypanosomosis in the Gambia: Prevalence in working horses and donkeys detected by whole genome amplification and PCR and evidence for interactions between trypanosome species. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 7-7, 2008.

PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: McDONALD, L.E. **Vet. Endocr. And Reprod.**, v.12, p.303-354, 1989.

PIOTKVISKA, H.; HUGHES, A.L. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: Paraphyly of the genus *Trypanosoma*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 144, p. 94-99, 2005.

REBESKI, D. E.; WINGER, E. M.; VAN ROOIJ, E. M. A.; SCHÖCHL, R.; SCHULLE, W.; DWINGER, R. H.; CROWTHER, J. R.; WRIGHT, P. Pitfalls in the application of enzyme-linked immunoassays for the detection of circulating trypanosomal antigens in serum samples. **Parasitology Research**, v. 85, p. 550-556, 1999.

RODRIGUES, A.C.; NEVES, L.; GARCIA, H.A.; VIOLA, L.B.; MARCILI, A.; DA SILVA, F.M.; SIGAUQUE, I.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Parasitology**, v. 135, p. 1317-28, 2008.

SAROR, D. I. Observations on the course and pathology of *Trypanosoma vivax* in Re Sokoto goats. **Research in Veterinary Science**, v. 28, p. 36-38, 1980.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v. 157, p.29-38, 1981.

SCHUNEFELD, A.; RUTTCER, D.; MOLOO, S. K. The sensitivity to trypanocidal drugs of *Trypanosoma vivax* isolated in Kenya and Somalia. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.3, n. 38, p. 177-180, 1987.

SEIDL, A.; DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 269–272, 1999.

SEILER, R. J.; OMAR, S.; JACKSON, R. B. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* (surra) of horse. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 120-122, 1981.

SEKONI V.O.; NJOKU C.O.; KUMI-DIAKA J.; SAROR D.I. Pathological changes in male genitalia of cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. **British Veterinary Journal**, v. 146. p.175-180, 1990.

SEKONI, V.O. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A Review. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 557-570, 1994.

SEKONI V.O., REKWOT P.I.; BAWA E.K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, v. 61. P.55-62, 2004.

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

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 66, n. 1, p. 25-33, 1972.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D. P.; MESQUITA, T. C.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. **Trypnews**, v. 4, p.1-2, 1995.

SILVA, R.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, D. P.; RAMIREZ, L.; DÁVILDA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal, Brasil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, p. 561-562, 1996.

SILVA, J.B.A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.** 144 f. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará. 2006.

SILVA, A.S.; PEREZ, H.A.G.; COSTA, M. M.; FRANÇA, R. T.; DE GASPERI, D.; ZANETTE, R. A.; AMADO, J. A.; LOPES, S. T. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; MONTEIRO, S. G. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p. 23-30, 2010.

SIMPSON, A.G.B.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p.168-74, 2006.

SINSHAW, A.; ABEBE, G.; DESQUESNES, M.; YONI, W. Biting flies and *Trypanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tana, Ethiopia. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 35-46, 2006.

SMITH, P.W.S.O.; BRAWN-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; MCNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the Fec b gene. **J. reprod. fert.**, v. 98, p. 41-54, 1994.

STEPHEN, L.E. Trypanosomiasis: a veterinary perspectiva. **Pergamon Press**, New York: 1986.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, W.C. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances Parasitology**, v. 48, p. 1-56, 2001.

TURNER, C. M. R. The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 227-231, 1997.

VAN DEN BOSSCHE, P.; SHUMBA, W.; MAKHAMBERA, P. The distribution and epidemiology of bovine trypanosomiasis in Malawi. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 163-176, 2000.

VARGAS, T. M.; ARELLANO, S. C. La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. **Veterinaria Montividel**, v. 33, p. 136, 1997.

VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.M.S.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax* : characterization of the spliced-leader Gene1 of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37-48, 2001.

VERTEGEN, M. W. A.; ZWART, D.; VAN DER HEL, W.; BROUWER, B. O.; WENSING, T. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on the energy and nitrogen metabolism of West African Dwarf Gotas. **Journal Animal Science**, v. 69, p. 1667-1677, 1991.

WELLS, E. A. Animal trypanosomiasis in South America. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 31-41, 1984.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAY. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, n. 97, p. 51-61, 1988.

WU, J., EMERY, B.R., CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

2 CAPÍTULO 2 - DEGENERAÇÃO FOLICULAR E DIAGNÓSTICO POR PCR EM OVÁRIOS DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE POR *Trypanosoma vivax*

2.1 RESUMO

RESUMO - O objetivo deste estudo foi determinar a taxa de degeneração de folículos ovarianos e pesquisar por PCR a presença do DNA do parasita em tecido ovariano de cabras infectadas experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. Seis cabras, fêmeas, adultas, foram infectadas com $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. vivax* e outras quatro formaram o grupo controle. Diariamente realizaram-se exames clínicos e determinação da parasitemia, e controle dos animais para a identificação de sinais clínicos e alterações de comportamento que indicam a ocorrência de sinais de estro. Após 60 dias de infecção, foi feita a coleta dos ovários e realizado o exame anatomo-patológico. Amostras dos ovários das cabras foram coletadas para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). No exame clínico foi observado nas cabras infectadas, febre (máximo 41°C), anorexia, apatia, palidez de mucosas, nódulos linfáticos aumentados e perda de peso progressiva. Os animais do grupo infectado permaneceram em anestro durante o período experimental. A parasitemia foi observada a partir do 3º dia pós-infecção (dpi) com picos nos 7-14^{os} dpi. No 7º dpi até o final do período experimental, os caprinos do grupo infectado apresentaram redução significativa do valor médio do hematócrito. Quanto ao aspecto macroscópico, os ovários de quatro animais infectados apresentaram-se reduzidos de tamanho, com consistência firme, superfície lisa, sem folículos ou corpo lúteo. A análise histológica mostrou que no grupo de cabras infectadas, o valor médio de folículos, foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Quanto ao estágio de desenvolvimento, no grupo controle, o número de folículos primordiais e primários foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o secundário e terciário. Quanto à integridade, não houve diferença significativa no valor médio dos folículos degenerados tipo I entre o controle e infectados. O número de folículos degenerados do tipo II foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo infectado que no grupo controle, e a maioria dos folículos degenerados tipo II eram primordiais e primários. A análise de *T. vivax* nos tecidos ovariano pelo PCR específico para *T. vivax* (TviCatL-PCR) mostrou a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 177 pb que foi observado nos ovários direito e esquerdo de todos as cabras do grupo infectado. O resultado do PCR, entretanto, foi negativo para todas as amostras do grupo controle. A degeneração folicular associada à presença do parasita nos ovários, detectada por PCR, sugerem a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos.

Palavras-Chave: Tripanossomíases, degeneração folicular e caprinos.

2.2 INTRODUÇÃO

Espécies de tripanossomas pertencentes ao grupo salivaria estão associadas a doenças do gado conhecida como "nagana", causando graves perdas econômicas na África comprometendo o desempenho produtivo e reprodutivo de ruminantes,

especialmente quando os animais são criados em regiões infestadas pela mosca tsé-tsé, que são os vetores biológicos da tripanossomíase africana (JONES; DÁVILA, 2001; AUTY et al, 2008).

Na África, *T. vivax* é de grande importância por causar falhas reprodutivas em bovinos devido à ocorrência de aborto, natimortos ou bezerros fracos, a redução das taxas de fecundidade, diminuição da produção de leite, epididimite, orquite e qualidade do sêmen reduzida, o que pode levar à esterilidade (OGWU et al, 1986; GARDINER; MAHMOUD, 1992; SEKONI, 1994; OKECH et al, 1996; GUTIERREZ et al 2006).

Machos e fêmeas afetados pela tripanossomíase por *T. vivax* têm vários distúrbios reprodutivos, incluindo a degeneração do hipotálamo, hipófise e gônadas, com consequente interrupção nas secreções e as concentrações plasmáticas dos hormônios necessários para os processos reprodutivos em ambos os sexos. Distúrbios reprodutivos causados nos machos incluem puberdade tardia, a perda de libido, graves alterações degenerativas da genitália manifestada pela produção de sêmen de baixa qualidade ou a cessação da produção do sêmen. Em fêmeas as tripanossomíases podem causar graves lesões genitais, anestro temporário ou permanente e ciclo estral anormal. Além disso, pode levar a distocia, aborto, parto prematuro, baixo peso das crias ao nascer, morte fetal, infecção fetal transplacentária, morte neonatal e outros efeitos patogênicos em fetos e crias têm sido relatados (SEKONI, 1994).

Para avaliação da patogenicidade de um isolado de *T. vivax* de um surto na região semiárida do Brasil através da reprodução experimental da doença em ovinos, Bezerra et al (2008) constatou que, em machos, os distúrbios reprodutivos causados por esse parasita são especialmente associados a lesões do testículo e epidídimo e caracterizada por degeneração testicular severa e epididimite. Um achado importante demonstrado neste estudo foi a detecção do parasita nos tecidos testicular e epididimário pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Nas regiões do semiárido brasileiro, o *T. vivax* também tem sido implicado como agente de doença reprodutiva importante em gado leiteiro, ovelhas e cabras da região, promovendo a repetição de cio, aborto, nascimento de filhotes fracos e natimortos, e anestro temporário ou permanente (SILVA et al., 2004; BEZERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2007; 2008). Recentemente, um estudo mostrou que o *T. vivax* pode constituir importante problema de saúde e sugeriu a transmissão transplacentária para os bezerros nesta mesma região (BATISTA et al, 2011).

Embora o *T. vivax* desenvolva todas as fases do seu ciclo de vida no sangue circulante, o parasita apresenta capacidade de migrar nos tecidos e órgãos do hospedeiro vertebrado (GARDINER et al, 1989). Assim, foi sugerido o envolvimento do parasita na patogênese de lesões inflamatórias e degenerativas de órgãos como coração (MASAKI, 1980; KIMETO et al, 1990), sistema nervoso central (BATISTA et al, 2007; BATISTA et al., 2008), testículo e epidídimo (BEZERRA et al., 2008). O ovário pode ser lesionado por microorganismos que afetam a viabilidade oocitária, caracterizado por um grande número de folículos degenerados, que podem ser responsáveis por falhas reprodutivas (SILVA, 2006). Embora os relatos sobre as manifestações clínicas e patológicas de infecção por *T. vivax* em animais domésticos tenham sido bem documentados, há escassez de informações sobre os efeitos do parasita nos ovários. O objetivo deste estudo foi determinar a taxa de degeneração folicular nos ovários bem como pesquisar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença de DNA do parasita no tecido ovariano de caprinos experimentalmente infectados com *T. vivax*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Composição dos Grupos Experimentais

Utilizaram-se doze caprinos fêmeas sem raça definida, com idade aproximada, de quinze meses. Os animais foram alojados em apriscos devidamente telados nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte.

Por 14 dias antes da inoculação do *Trypanosoma vivax*, os caprinos foram avaliados através de exames clínicos e hematológicos e dosificados com anti-helmínticos. Após constatada a higidez dos animais, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo infectado, constituído por seis caprinos infectados por *T. vivax* (Caprinos 1, 2, 3, 4, 5 e 6); grupo controle, composto por quatro caprinos não infectados por *T. vivax* (Caprinos 7, 8, 9 e 10). Todos os animais foram submetidos a condições de manejo idênticas, alimentados com água à vontade, feno de capim tifton e ainda suplementados com ração comercial na quantidade de 1,5% de peso do animal por dia.

2.3.2 Preparo do inóculo e infecção experimental com *Trypanosoma vivax*

O isolado de *T. vivax* empregado na infecção experimental dos caprinos foi oriundo de um surto de infecção natural em ovinos, no município de São João do Rio dos Peixes, Paraíba. Coletou-se sangue de um ovino com parasitemia, em ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA) a 10% e congelado em nitrogênio líquido. Imediatamente antes da inoculação, foi realizado o descongelamento do isolado criopreservado. Em cada animal do grupo experimental inoculou-se, via intravenosa, 1ml de sangue contendo $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. vivax*, estimados de acordo com o método de Batista et al., (2007).

2.3.3 Exames Clínicos, determinação do hematócrito e avaliação da parasitemia

Diariamente durante 60 dias após a infecção (DPI) foram realizados nos animais dos grupos controle e infectado exames clínicos, sendo avaliados temperatura retal, aspecto das mucosas aparentes e volume dos linfonodos externos à palpação. Foi realizado também duas vezes ao dia a inspeção dos animais para identificação de evidências clínicas e alterações do comportamento que indicassem sinais da ocorrência de estro tais como: inquietação, aceitação de monta, edema e hiperemia da vulva e presença de corrimento vaginal.

A parasitemia foi determinada diariamente mediante a pesquisa do tripanossoma no sangue coletado de pequenas veias localizadas no pavilhão auricular usando uma gota espessa de sangue entre a lâmina e lamínula, de acordo com a técnica descrita por Batista et al, 2007.

Concomitante aos exames clínicos e determinação da parasitemia foram obtidos 2ml de sangue, através de punção da veia jugular, acondicionados em tubos esterilizados contendo 1mg/ml de EDTA para determinação do hematócrito.

2.3.4 Coleta e análise histológica dos ovários

Para obtenção dos ovários as cabras foram eutanasiadas no 60º dpi utilizando-se Tiopental sódico (60 mg/kg) por via intravenosa e após a perda do reflexo corneal foi administrado Cloreto de potássio (1 ml/kg), também por via intravenosa. Imediatamente

após a coleta, partes representativas do córtex ovariano foram imersos e fixados em solução de Bouin por 48 horas e em seguida foram conservados em álcool etílico a 70%. Os tecidos fixados foram embebidos em parafina, cortados a 4 μm e corados com hematoxilina e eosina.

Para avaliação quantitativa 30 folículos de cada ovário (direito e esquerdo) por animal foram analisados e classificados em folículos morfológicamente normais ou folículos degenerados. Os folículos foram classificados em quatro classes de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular em: primordiais, aqueles que apresentassem somente uma camada de células da granulosa pavimentosa; em primários, quando apresentassem uma camada de células da granulosa cúbicas circundando o oócito; secundários, quando observadas duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas circundando o oócito e terciários quando havia uma cavidade antral em seu interior (HULSHOF et al, 1994).

A morfologia folicular foi avaliada em microscópio óptico levando-se em consideração, a integridade da membrana basal, densidade celular, presença ou ausência de corpos picnóticos e ainda integridade do oócito. Somente folículos com o núcleo do oócito aparente foram contados. Baseado então nestes parâmetros, os folículos foram classificados individualmente como: normal, degenerado tipo I (apenas oócito degenerado) ou degenerado tipo II (oócito e células da granulosa degenerados) (FIGUEIREDO et al., 2001).

2.3.5 Diagnóstico por PCR no Ovário

Fragmentos de aproximadamente 1cm³ dos ovários direitos e esquerdos dos animais do grupo infectado e do grupo controle foram coletados e acondicionados em eppendorfs contendo etanol. As preparações de DNA foram submetidas a um ensaio altamente específico para *T. vivax* que foi descrito por Cortez et al., 2009. Este método PCR baseado em sequências repetidas do gene que codifica a cisteína proteases (catepsina L) e foi realizado usando os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5'GCC ATC GCC AAG TAC GCC CTC AG 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3') como primers. O diagnóstico foi confirmado através do PCR, amplificando um fragmento de DNA de aproximadamente 177 pb (pares de base), que também é observado no DNA de *T. vivax*

(isolado do Pantanal), que foi utilizado como controle positivo. Para controle negativo foram selecionados previamente amostras de DNA do sangue de cabras não infectadas (CORTEZ et al., 2009).

2.3.6 Parasitemia x intensidade do fragmento no gel de agarose

O número de tripanosomas no sangue periférico de cada animal no dia 60^o dpi foi comparado com a respectiva intensidade das bandas de amplificação do produto de 177 pb. O grau de intensidade das bandas foram classificadas visualmente em fraca (+), média (++) e forte (+++), (MANZO, 2004 modificada).

2.3.7 Análise Estatística

As suposições foram feitas com a análise de variância (ANOVA), utilizando Proc univariada dos SAS software (Statistical Analysis System, versão 6.10). Para comparação de médias diferentes de parasitemia, hematócrito e temperatura retal de cada tempo de observação, bem como as diferenças entre a morfologia dos folículos ovarianos do grupo de infectados e grupo controle, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia

Durante o período de adaptação dos animais, não se observaram alterações clínicas ou hematológicas. Os caprinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax* apresentaram febre no 6^o dia pós-infecção (dpi), com valor máximo de 41 °C no 7^o dpi. Os valores médios deste parâmetro apresentaram-se acima dos valores médios do grupo controle até o final do período experimental (Figura 7).

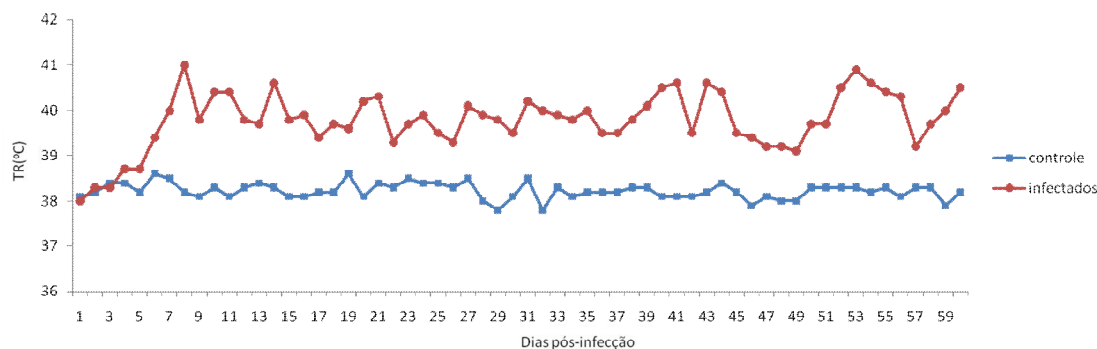


Figura 7: Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em caprinos do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental.

Todos os caprinos do grupo infectado apresentaram do 15º dpi até o final do período experimental, apatia, anorexia, palidez das mucosas, hipertrofia dos linfonodos e perda progressiva de peso. O caprino nº. 4 apresentou agravamento do quadro clínico e no 9º dpi foi encontrado morto na baia.

Os animais do grupo infectado permaneceram em anestro durante todo período experimental, enquanto que nos animais do grupo controle foi detectado a ocorrência de pelo menos um estro por animal durante o período experimental.

A presença de tripanossomas no sangue periférico foi constatada em todos os animais do grupo infectado a partir do 3º dpi. A parasitemia aumentou progressivamente, atingindo nível máximo entre o 7º e o 14º dpi. A partir desse período a parasitemia apresentou valores decrescentes e ocorreram picos parasitemicos de baixa intensidade alternados por períodos com ausência de parasitemia (Figura 8).

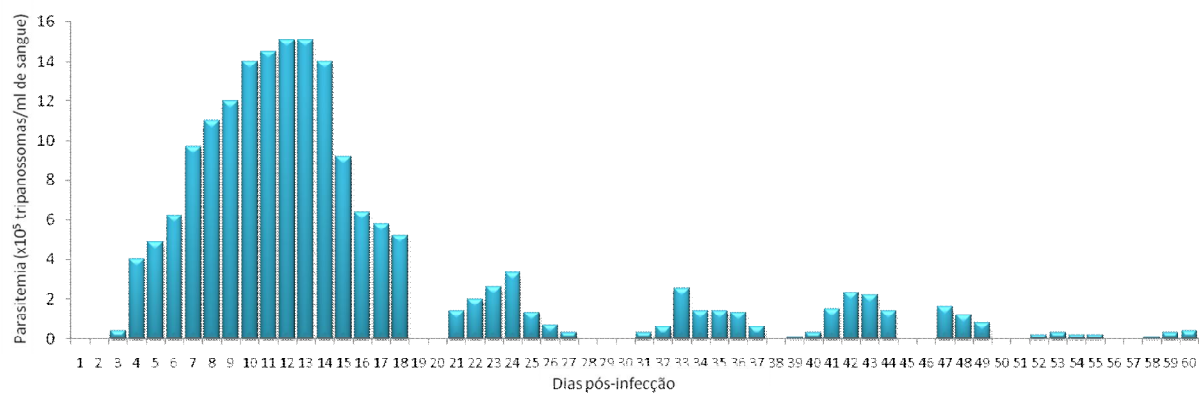


Figura 8: Valores médios das parasitemias ($\times 10^5$ tripanossomas/ml de sangue) de caprinos do grupo experimentalmente infectados por *T. vivax* durante o período experimental.

2.4.2 Avaliação do hematócrito

No 7º dpi até o final do período experimental, os caprinos do grupo infectado apresentaram redução significativa do valor médio do hematócrito em relação ao grupo controle. Os valores médios do hematócrito nos animais do grupo controle permaneceram dentro da normalidade para a espécie durante o período experimental.

2.4.3 Avaliação macroscópica e histológica dos ovários

Quanto ao aspecto macroscópico, os ovários de quatro animais do grupo infectado apresentaram-se reduzido de tamanho, consistência firme, com superfície lisa e ausência de folículos ovarianos ou corpos lúteos. No grupo controle, os ovários apresentaram folículos em crescimento visíveis e corpos lúteos em sua superfície.

A análise histológica mostrou que no grupo infectado houve redução significativa ($P < 0,05$) do valor médio do número de folículos normais quando comparado ao grupo controle. Quanto ao estágio de desenvolvimento dos folículos normais, no grupo infectado não houve diferença significativa entre o número de folículos primordial, primário, secundário e terciário. No grupo controle, o número de folículos primordiais e primários foi significativamente maior que os secundários e terciários (Tabela 1).

Quanto à integridade, não houve diferença significativa do valor médio dos folículos degenerados tipo I entre o grupo controle e infectado. O número de folículos degenerados tipo II foi significativamente maior no grupo infectado que no grupo controle. A maioria dos folículos degenerados tipo II observados no grupo infectado foram primordiais e primários.

Tabela 1: Média e desvio padrão quanto a integridade e classificação dos folículos ovarianos de cabras do grupo controle e infectadas experimentalmente com *Trypanosoma vivax*.

Classificação	Tratamentos					
	Grupo Controle			Grupo Infectado		
	Normais	Degenerados tipo I	Degenerados tipo II	Normais	Degenerados tipo I	Degenerados tipo II
Primordial	21,33 ± 5,13 a A	1,50 ± 2,38 a B	7,00 ± 4,97 a B	3,67 ± 2,58 a B	1,33 ± 1,03 a B	18,83 ± 5,46 a A
Primário	17,35 ± 6,56 ab A	0,50 ± 1,01 a B	3,25 ± 0,50 ab B	3,67 ± 2,50 a B	1,33 ± 1,97 a B	18,17 ± 4,22 a A
Secundário	8,25 ± 6,40 bc A	0,00 ± 0,00 a B	1,75 ± 2,87 ab AB	2,83 ± 2,23 a AB	0,33 ± 0,52 a B	4,20 ± 3,35 b AB
Terciário	2,75 ± 3,10 c A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 b A	1,50 ± 1,38 a A	0,00 ± 0,00 a A	1,83 ± 1,83 b A

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Morfologicamente, os folículos normais apresentaram oócito esférico ou elíptico, com núcleo central e citoplasma uniforme. As células da granulosa apresentaram-se bem organizadas ao redor do oócito e membrana basal intacta. Os folículos degenerados tipo I apresentaram núcleo picnótico e os folículos degenerados II além de núcleo picnótico apresentaram retração oocitária e células da granulosa túrgidas e desorganizadas (Figura 9).

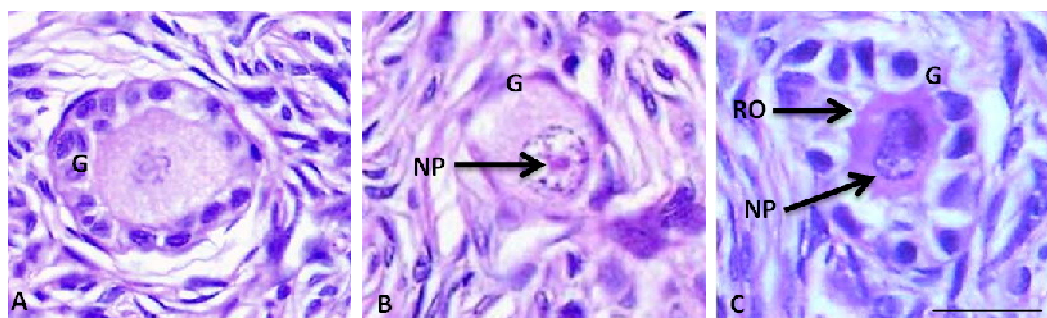


Figura 9: Aspectos histológicos de fragmentos do ovário de cabras experimentalmente infectadas com *T. vivax*. A - Folículos ovarianos morfologicamente normais. B - Núcleo picnótico (NP) (Folículo degeneração tipo I). C - Folículo ovariano degenerado com retração oocitária (RO) e desorganização das camadas de células da granulosa (Folículo degeneração tipo II). Barra de escala representa 10 mm, hematoxilina-eosina, Obj. 40x

2.4.4 Diagnóstico por PCR no Ovário

As análises de *T. vivax* em tecido ovariano pelo PCR para *T. vivax* (TviCatL-PCR) mostrou a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 177 pb específico para *T. vivax* retirado do domínio catalítico do gene Catepsina L, que foi visualizado nos ovários direito e esquerdo de todas as cabras do grupo infectado (Figura 10). O PCR, entretanto, foi negativo para todas amostras do grupo controle.

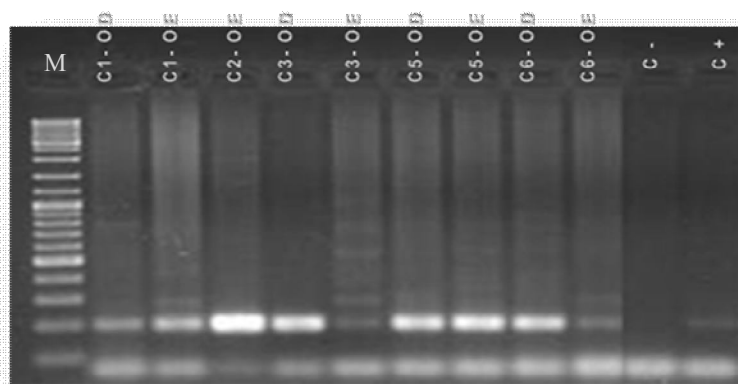


Figura 10: PCR para detecção de *T. vivax* nos tecidos ovarianos utilizando-se 5 µL de DNA. Fragmento de 177pb do gene Catepsina L (gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio), específico para *T. vivax* está evidenciado pela seta. M = marcador molecular; C1 – OD = cabra 1 - ovário direito; C1 – OE = cabra 1 - ovário esquerdo; C2- OE = cabra 2 - ovário esquerdo; C3 – OD = cabra 3 - ovário direito; C3 – OE = cabra 3 - ovário esquerdo; C5 – OD = cabra 5 - ovário direito; C5 – OE = cabra 5 - ovário esquerdo; C6 – OD = cabra 6 - ovário direito; C6 – OE = cabra 6 - ovário esquerdo; C- = Controle negativo; C+ = Controle positivo.

2.4.5 Parasitemia x intensidade do fragmento no gel de agarose

Os caprinos com parasitemia baixa ou ausente apresentaram intensidade forte do fragmento de DNA no gel de agarose e com parasitemia alta apresentaram bandas médias e fracas (Tabela 2).

Tabela 2. Intensidade da banda no gel de agarose X parasitemia observada no 60º dpi em cabras infectadas experimentalmente com *T. vivax*.

ANIMAIS	OVÁRIOS		PARASITEMIA
	DIREITO	ESQUERDO	
C1	++	++	0
C2	+++		0
C3	++	+	4,4
C5	+++	+++	0,6
C6	+++	+	0,2

2.5 DISCUSSÃO

O conhecimento do efeito da infecção por *T. vivax* em animais infectados experimentalmente pode contribuir para a descrição das lesões e esclarecimento da patogênese nos órgãos reprodutores, especialmente na fase crônica, como ocorre em animais infectados naturalmente (BEZERRA et al. 2008). O presente estudo investiga o efeito do parasite na dinâmica folicular e pesquisa através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença do parasita no tecido ovariano de cabras infectadas experimentalmente com *T. vivax* visando esclarecer as causas de anestro frequentemente relatada durante surtos de infecção pelo parasita em ruminantes domésticos.

Após a inoculação, os caprinos infectados experimentalmente apresentaram sintomatologia clínica de tripanossomíase, mostrando que além da parasitemia, a hipertermia e a redução do hematócrito foram os aspectos constatados após a infecção. Estudos de avaliação dos aspectos clínicos patológicos da infecção experimental em caprinos e ovinos com o mesmo isolado de *T. vivax* utilizado no presente estudo foram conduzidos por outros autores provando a patogenicidade do isolado (BATISTA et al. 2008, BEZERRA et al 2008). O curso clínico da enfermidade apresentou padrão de evolução semelhante aos observados pelos referidos autores, caracterizado pela fase aguda com picos de parasitemia entre o 7º e o 14º dpi, seguido pela fase crônica caracterizada por ondas de parasitemia ausente, alternada com parasitemia de baixa intensidade.

Os valores médios da temperatura retal não corresponderam ao pico de parasitemia, ou seja, após a inoculação a temperatura retal dos animais infectados permaneceu elevada com oscilações independente dos picos de parasitemia. O hematócrito também foi outro parâmetro que apresentou evolução típica da infecção por tripanossomas salivaria, com redução progressiva e significativa dos valores a partir do 7º dpi. A avaliação do grau de anemia, mediante pesquisa do hematócrito tem sido freqüentemente empregado no monitoramento da evolução do quadro clínico da enfermidade (BATISTA et al, 2006). A diminuição do hemotócrito foi drástica no grupo de animais infectados, chegou à 11% (50% abaixo do valor normal descrito para a espécie). Reduzido valor do hematócrito está associado a estágios mais graves da tripanossomíase e pode ter contribuído para o curso fatal da enfermidade do caprino n. 4. A ocorrência da anemia confirma os resultados de trabalhos que relatam essa alteração hematológica como a mais freqüentemente observada em animais infectados naturalmente ou experimentalmente por *T. vivax* (PELLÍN et al. 2003, VALERA et al. 2005, BATISTA et al. 2006).

No presente estudo foi avaliado pela primeira vez o envolvimento do ovário na tripanossomíase por *T. vivax*. Nesse estudo ficou evidente que cabras infectadas apresentaram alterações na morfologia ovariana, sob os aspectos macroscópicos e histológicos. As alterações macroscópicas observadas, caracterizadas por ovários de pequeno tamanhos, com ausência de folículos ou corpos lúteos aparentes são característicos de ausência de atividade ovariana em animais que apresentam anestro patológico (MARTINAT-BOTTÉ et al, 2000; MORÉS et al, 2000).

Na análise histológica ficou evidente que houve redução significativa ($p<0,05$) do número de folículos normais em cabras infectadas experimentalmente pelo parasita. No tocante ao estágio de desenvolvimento dos folículos avaliados, a ausência de diferenças significativa entre o número de folículos primordiais, primários, secundários e terciários, sugere a pouca evolução da dinâmica da população folicular no grupo de animais infectados. Diferença significativa ($p<0,05$) observada nos valores médios de folículos do grupo controle demonstram que a população folicular obedeceu a distribuição estimada para espécie. Em ruminantes, cerca de 90% da população ovariana é constituída por folículos primordiais, sendo considerados precursores da população de folículos que chegam ao estágio ovulatório (HULSHOF et al, 1994).

No tocante a avaliação da integridade folicular, o maior número de folículos degenerados do tipo II foi verificado no grupo de animais infectados, afetando principalmente os folículos primordiais e primários. A degeneração folicular é um processo fisiológico (BRAS et al, 2005), responsável juntamente com a apoptose (HUSSEIN, 2005), pela regressão ou atresia folicular, uma vez que grande parte dos folículos pré antrais não ovulam e são eliminados pela atresia. A degeneração folicular embora seja um processo natural, quando intensa pode afetar quantitativamente a população folicular ovariana (SILVA, 2006). No presente estudo verificou-se que a degeneração folicular do tipo II afetou principalmente o pool de reserva dos folículos, o que pode justificar a interrupção da atividade cíclica do ovário e conseqüente anestro.

A redução do número de folículos normais, bem como a elevada taxa de degeneração folicular observados nas cabras infectadas pode ter sido provocada por distúrbios hormonais, uma vez que na tripanossomíase por *T. vivax* ocorre degeneração do hipotálamo, hipófise e gônadas, com conseqüente interrupção nas secreções e as concentrações plasmáticas dos hormônios necessários para os processos reprodutivos (SEKONI, 1994).

A hipotrofia ovariana e conseqüente paralisação completa da atividade ovariana também pode ocorrer como resultado de deficiência nutricional (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). A tripanossomíase é uma doença sistêmica que afeta o metabolismo normal do animal, levando ao balanço energético e protéico negativo (VERTEGEN et al., 1991), anemia (BATISTA et al, 2008; 2009), anorexia (ADEIZA, 2008) e imussupressão (STEPHEN, 1986).

A presença do *T. vivax* no tecido ovariano, identificado mediante a técnica da PCR nos caprinos do grupo infectado, confirma a migração extravascular do parasita frequentemente relatado na literatura, e evidencia a participação do parasita na redução da população de folículos normais e aumento da degeneração folicular. A técnica de reação em cadeia da polimerase, PCR, é uma técnica sensível e específica na detecção de animais infectados por *T. vivax*, utilizando-se como material de análise o sangue (VENTURA et al. 2001). Entretanto, a técnica de extração de DNA de *T. vivax* do ovário para posterior realização da PCR consiste em um fato inédito. Bezerra et al. (2008) conseguiram demonstrar a presença do parasita, mediante a técnica da PCR no parênquima do testículo em caprinos infectados experimentalmente que apresentaram degeneração testicular grave e epididimite.

Neste estudo a parasitemia não apresentou relação com a intensidade das bandas observadas no gel de agarose, ou seja, caprinos com parasitemia baixa ou ausente apresentaram intensidade forte do fragmento de DNA e com parasitemia alta apresentaram bandas médias e fracas. A presença de bandas fortes nos ovários de animais com parasitemia ausente mais uma vez confirma a migração extravascular do *T. vivax* o qual pode está associado a gênese das lesões observadas nos ovários de animais infectados.

2.6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra pela primeira vez a influência do *Trypanosoma vivax* na viabilidade oocitária de cabras infectadas experimentalmente as quais apresentaram redução do número de folículos normais, bem como elevada taxa de degeneração folicular. A presença do *T. vivax* no tecido ovariano, identificado mediante a técnica da PCR nos caprinos do grupo infectado evidencia a participação do parasita na redução da população de folículos normais e aumento da degeneração folicular.

2.7 REFERÊNCIAS

- ADEIZA, A.A; MAIKAI, V.A; LAWAL, A.I. Comparative haematological changes in experimentally infected Savannah brown goats with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma vivax*. **Afr Jou of Bio**, v. 7, p.2295–2298, 2008.
- AUTY, H; MUNDY, A; FYUMAGWA, R.D; PICOZZI, K; WELBURN, S; HOARE, R. Health management of horses under high challenge from trypanosomes: a case study from Serengeti, Tanzania. **Vet Parasit**, v. 154, p. 233–24, 2008.
- BATISTA, J.S; CORREA, F.R; BARBOSA, R.C; GUERRA, J.L. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep. **Pesq. Vet. Bras**, v. 26, p. 31–37, 2006.
- BATISTA, J.S; RIET-CORREA, F; TEIXEIRA, M.M.G; MADRUGA, C.R; SIMÕES, S.D.V; MAIA, T.F. Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet Parasitol**, v. 143, p. 174–181, 2007.
- BATISTA, J.S; BEZERRA, F.S.B; LIRA, R.A; CARVALHO, J.R.G; ROSADO NETO, A.M; PETRI, A.A; TEIXEIRA, M.M.G. Clinical, epidemiological and pathological signs of natural infection in cattle by *Trypanosoma vivax* in Paraíba, Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 28, p.63–69, 2008.
- BATISTA, J.S; OLIVEIRA, A.F; RODRIGUES, C.M.F; DAMASCENO, C.A.R; OLIVEIRA, I.R.S; ALVES, H.M; PAIVA, E.S; BRITO, P.D; MEDEIROS, J.M.F; RODRIGUES, A.C; TEIXEIRA, M.M.G. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Vet Parasitol**, v.165, p.131–135, 2009.
- BATISTA, J.S; RODRIGUES, C.M; OLINDA, R.G; SILVA, T.M; VALE, R.G; CÂMARA, A.C; REBOUÇAS, R.E; BEZERRA, F.S; GARCÍA, H.A; TEIXEIRA, M.M. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research; in print**. 2011. Disponível em: <
- BRAS, M; QUEENAN, B; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, p. 231-239, 2005.
- BEZERRA, F.S.B; GARCIA, H.A; ALVES, H.M; OLIVEIRA, I.R.S; SILVA, A.E; TEIXEIRA, M.M.G; BATISTA, J.S. *Trypanosoma vivax* in testicular and epididymal tissues of experimentally infected sheep. **Pesq Vet Bras**, v. 28, p. 575-582, 2008.
- CORTEZ, A.P; VENTURA, R.M; RODRIGUES, A.C; BATISTA, J.S; PAIVA, F; AÑEZ, N; MACHADO, R.Z; GIBSON, W.C; TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South América and Africa. **Parasitol**, v. 133, p.159-169, 2006.
- CORTEZ, A.P; RODRIGUES, A.C; GARCIA, H.A; NEVES, L; BATISTA, J.S; BENGALY, Z; PAIVA, F; TEIXEIRA, M.M. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma*

vivax from Africa and South America - characterisation, relationships and diagnostic implications. **Mol Cell Probes**, v. 23, p. 44–51, 2009.

CUGLOVICI, D.A; BARTHOLOMEU, D.C; REIS-CUNHA, J.L; CARVALHO, A.U; RIBEIRO, M.F. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Vet Parasitol**, v.169, p.320-326, 2010.

DESQUESNES, M. **Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America**. Paris: OIE & CIRAD, 2004.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Foliculos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA**. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela. 2001. p. 227-256.

GARDINER, P.R; ASSOKU, R.K.G; WHITELOW, D.D; MURRAY, M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. **Vet Parasitol**, v. 31, p.187–197, 1989.

GARDINER, P.R; MAHMOUD, M.M. Salivarian trypanosomes grateful to the following individuals for kindly providing DNA or causing disease in livestock outside sub-Saharan Africa. In “Parasitic blood samples: *T. vivax* from West Africa and Colombia were donated Protozoa”, (J. P. Kreier and J. R. Baker, Eds.), p 277–313, 1992.

GUERRA, R.M.S.N.C; FEITOSA JÚNIOR, A.B; SANTOS, H.P; ABREU-SILVA, A.L; SANTOS, A.C.G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 833–835, 2008.

GUTIERREZ, C; CORBERA, J.A; MORALES, M; BÜSCHER, P. Trypanosomosis in goats: current status. Ann. NY. **Acad Sci**, v.108, p. 300-310, 2006.

HULSHOF, S.C.J; FIGUEIREDO, J.R; BECKERS, J.F; BEVERS, M.M; VAN DER HUCK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet Quart**, v.2, p.78–80, 1994.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reprod Update**, v.11, p.162-178, 2005.

JONES, T.W; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma vivax* out of Africa. **Trends Parasitol**, v.17, p.99–101, 2001.

KIMETO, B.A; MUGERA, G.M; NYAGA, P.N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet Parasitol**, v. 34, p.295–301, 1990.

LINHARES, G.F.C; DIAS-FILHO, F.C; FERNANDES, P.R; DUARTE, S.C. Bovine trypanosomiasis in the municipality of Formoso do Araguaia County, Tocantins, Brazil (case report). **Ciência Animal**, v.7, p.455–460, 2006.

MANSO, M.R.F.C. **Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de malária.** 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) Fundação de medicina tropical do amazonas, UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS, Amazonas. 2004.

MARTINAT-BOTTÉ, F; RENAVAL, G; MADE, F; COSTIOU, P; TERQUI, M; **Ultrasonography and reproduction in swine.** Paris: INRA, 2000:103.

MASAKE, R.A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **Vet Rec**, v.107, p.551-557, 1980.

MORÉS, N; SOBESTIANSKY, J; LOPEZ, A. **Avaliação patológica de suínos no abate: manual de identificação.** Brasília: EMBRAPA comunicação para transferência de tecnologia, 2000: 40p.

OGWU, D; NJOKU, C.O; OSORI, D.I.K. Effects of experimental *Trypanosoma vivax* infection on first, second and third trimester pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 25, p.238-396, 1986.

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

PAIVA, F; LEMOS, R.A.A; NAKASATO, L; MORI, A.E; BRUM, K.B; BERNARDO, K.C. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. I - Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 9, p.135-141, 2000.

PELLÍN CES; GONZÁLEZ, F.A.G; BALDIZÁN, G; LIÑAREZ, F.F.M; Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico em ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. **Vet Tropical**, v.28, p.79-92, 2003.

SEKONI, V.O. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A Review. **Theriogenology**, v. 42, p.557-570, 1994.

SERRA FREIRE, N.M. Oiapoque - outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Rev Bras Med Vet**, v. 4, p.30-31, 1981.

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

SILVA, R.A.M.S; PELLEGRIN, A.O; RAMIREZ, E.S.S.L.L; DÁVILA, A.M.R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 30 p.

SILVA, J.B.A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.** 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará. 2006.

SILVA, A.S; COSTA, M.M; POLENZ, M.F; POLENZ, C.H; TEIXEIRA, M.M.G; LOPES, S.T.A; MONTEIRO, S.G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p.2550-2554, 2009.

SILVA, A.S; PEREZ, H.A.G; COSTA, M.M; FRANÇA, R.T; DE GASPERI, D; ZANETTE, R.A; AMADO, J.A; LOPES, S.T.A; TEIXEIRA, M.M.G; MONTEIRO, S.G. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. **Parasitol Res**, v. 108, p23-30, 2010.

STEPHEN, L.E. **Trypanosomiasis: a veterinary perspectiva.** New York: Pergamon Press, 1986.

VALERA, Z; PARRA, O; ALVARADO, M; BARBOZA, G; ESCALONA, F; RAMÍREZ, R. Efecto de la infección experimental com *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos em ovinos. **Revta Cient**, v.15, p.412-420, 2005.

VENTURA, R.M; PAIVA, F; SILVA, R.A.M.S; TAKEDA, G.F; BUCK, G.A; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene for a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic space sequence. **Exp Parasitol**, v. 99, p. 37-48, 2001.

VERTEGEN, M.W.A; ZWART, D; VAN DER HEL, W; BROUWER, B.O; WENSING, T. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on the energy and nitrogen metabolism of West African Dwarf Gotas. **Journal Animal Science**, v. 69, p.1667-1677, 1991.

ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “FOLLICULAR DEGENERATION AND DIAGNOSTIC PCR IN OVARIES OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma vivax*” À REVISTA THERIOGENOLOGY

Dear Mrs. Rodrigues,

Your submission entitled "Follicular degeneration and diagnostic PCR in ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*" has been received by Theriogenology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Your username is: Carla Monadeli

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/therio/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Theriogenology

ANEXO II - FOLLICULAR DEGENERATION AND DIAGNOSTIC PCR IN OVARIES OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma vivax*

Original do trabalho: Degeneração folicular e diagnóstico por PCR em ovários de cabras infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. Submetido para publicação na *Theriogenology*.

Follicular degeneration and diagnostic PCR in ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*

Carla M. F. Rodrigues^a, Roberio G. Olinda^a, Taciana M. F. Silva^a, Rodolfo G. Vale^a, Anderson E. da Silva^a, Gabriela L. Lima^a, Herakles A. Garcia^b, Marta M. G. Teixeira^b and Jael S. Batista^{a*}

^a Department of Animal Sciences, Federal Rural University of the Semiarid (UFERSA), Av. Francisco Mota, Br 110, Km 47-59, 59625-900 Mossoró, RN, Brazil

^b Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, University of São Paulo (USP), 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The aim of this study was to determine the rate of degeneration of ovarian follicles and search for the presence of parasite DNA by PCR in ovarian tissue from goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Six goats, females, adults were infected with 1.25×10^5 trypomastigotes of *T. vivax* and four others formed the control group. Daily clinical examinations were performed and determination of parasitemia and control of animals for identification of clinical signs and behavioral changes that indicate the occurrence of signs of estrus. After 60 days of infection, was collected from the ovaries and performed the pathological examination. Samples of ovaries were taken to perform the polymerase chain reaction (PCR). On clinical examination it was observed fever, anorexia, apathy, pale mucous membranes, enlarged lymph nodes and progressive weight loss that remained infected for the group above the values shown by the control group throughout the experimental period. The animals in the infected group were in anestrus during the experimental period. The parasitemia was observed from the third day post-infection (dpi) with peaks in the 7-14th dpi. As for gross appearance, the ovaries of four infected animals were reduced in size with firm, smooth surface without follicles or corpus luteum. Histological analysis showed that the group of infected goats, the average value of follicles was significantly lower ($P < 0.05$) compared to the control group. As the stage of development in the control group, the number of primordial and primary follicles was significantly higher ($p < 0.05$) than the secondary and tertiary. As for integrity, no significant difference in the average value of the follicles degenerate type I between control and infected. The number of follicles degenerate type II was

significantly higher ($p < 0.05$) in the infected group than in the control group, and most degenerate type II follicles were primordial and primary. The analysis of *T. vivax* in ovarian tissues by PCR specific for *T. vivax* (TviCatL-PCR) showed amplification of a DNA fragment of approximately 177 bp was observed in right and left ovaries of all the goats of the infected group. The result of PCR, however, was negative for all samples in the control group. The follicular degeneration associated with the presence of the parasite in the ovaries, as detected by PCR, suggesting the involvement of the parasite in the etiopathogenic mechanism of reproductive harm.

Keywords: *Trypanosoma vivax*, follicular degeneration, goats, PCR and anatomopathological.

*Corresponding author.

E-mail address: cmonadeli@hotmail.com

1. Introduction

Species of trypanosomes belonging to the salivarian group are associated with livestock disease known as “nagana”, causing severe economic losses in Africa compromising the productive and reproductive performance in ruminant livestock, especially when animals are raised in regions infested by tsetse flies that are the biological vectors of African trypanosomosis [1, 2].

In Africa, *T. Vivax* is of great significance to cause reproductive failure in breeding due to bovine abortion, stillbirth or weak calves, reduction in fertility rates and decrease in milk production, epididymitis, orchitis and reduced semen quality and may lead to sterility [3, 4, 5, 6, 7].

In Latin America, three species of African trypanosomes, *T. vivax*, *T. evansi* and *T. equiperdum*, adapted to mechanical transmission by hematophagous Diptera such as *Stomoxys* spp. and *Tabanus* spp., and nowadays [1, 8, 9, 10]. In Brasil, *T. vivax* has been reported in cattle herds of several Brazilian states from North to Southern regions [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. Recently, an outbreak in horses naturally infected with *T. vivax* was reported in Rio Grande do Sul [20]. There is the potential risk in that the movement of cattle herds could be favoring the expansion of *T. vivax* in Brazil [14].

Both males and females affected by trypanosomiasis by *T. vivax* have several reproductive disorders including degeneration of the hypothalamus, pituitary glands and gonads with consequent disruptions in the secretions and plasma concentrations of the hormones necessary for normal reproductive processes in both sexes. Reproductive

disorders caused in male animals include delayed puberty, loss of libido, severe degenerative changes of the genitalia manifested by the production of very poor quality semen or the cessation of semen production. In female animals trypanosomiasis cause severe genital lesions, temporary or permanent anestrus, and abnormal estrous cycles. Additionally, trypanosomal-induced death during pregnancy, abnormal pregnancy, dystocia, abortion, premature birth, low birth weight, stillbirth, transplacental fetal infection, neonatal death and other pathogenic effects on fetuses and offspring have been reported [21].

Recent studies of outbreaks show that tripanosomosis by *T. vivax* in semi-arid region of Brazil is a debilitating and often fatal disease that promotes serious economic losses reaching prevalences of infection x%, 29.7% and 25.4% in cows, goats and sheep respectively [15,16].

In evaluating the pathogenicity of one isolate of *T. vivax* from a outbreak in semi-arid region of Brazil through the experimental reproduction of disease in sheep, was found that in male reproductive disorders caused by this parasite are especially associated with lesions of the testis and epididymis and characterized by severe testicular degeneration and epididymitis [22]. An important finding demonstrated in this study was the detection of the parasite in testicular and epididymal tissues by polymerase chain reaction (PCR).

In the Brazilian semiarid regions, *T. vivax* has also been implicated as agent of important reproductive disease in dairy cattle, sheep and goats region by promoting abortion, estrus repetition, birth of weak and stillborn pups, and temporary or permanent anestrus [23, 22, 15, 24]. We recently showed that *T. vivax* can constitutes important health problem and suggested transplacental transmission to calves in this same region [25].

Although *T. vivax* develops all stages of its life cycle in the circulating blood, the parasite presents capacity to migrate in the tissues and organs of the vertebrate host [26]. Thus, it was suggested the involvement of the parasite in the pathogenesis of inflammatory and degenerative lesions of organs such as heart [27,28], central nervous system [15,24], testicle and epididymis [22].

The ovary may be injured by microorganisms that affect oocyte viability, characterized by a large number of follicles degenerate, which may account for reproductive failure [29]. Although reports on the clinical and pathological

manifestations of infection by *T. vivax* in domestic animals have been well documented, there is paucity of information on the effects of the parasite in the ovaries, so the present study was to determine the rate of degeneration of ovarian follicles as well as searching through the polymerase chain reaction (PCR) the presence of parasite DNA in the ovarian tissue of goats experimentally infected with *T. vivax*.

2. Material and methods

2.1 Composition of Experimental Groups

We used twelve goats female mongrel, age, approximate, fifteen months. The animals were housed in a stall properly screened at the premises of the Veterinary Hospital of the University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

For 14 days before the inoculation of *Trypanosoma vivax*, the goats were evaluated by clinical examination and hematological and dosed with anthelmintic. After verified the healthiness of the animals were divided into two experimental groups by random distribution of animals: the infected group, consisting of six goats infected with *T. vivax* (Goats 1, 2, 3, 4, 5 and 6); control group, composed of four goats are not infected by *T. vivax* (Goats 7, 8, 9 and 10). All animals corresponding to the above groups underwent identical management conditions, fed with water *ad libitum*, and Tifton hay supplemented with commercial feed also the amount of 1.5% of body weight per day.

2.2 Preparation of inoculum and experimental infection with *Trypanosoma vivax*

The strain of *T. vivax* used for experimental infection of goats was coming from a natural outbreak of infection in sheep in the city of São José do Rio do Peixe, Paraíba. Blood samples were collected from a sheep with parasitemia in ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA) at 10%, mixed with 8% glycerol and frozen in liquid nitrogen (-196 °C). Immediately before inoculation, we performed the defrosting of cryopreserved isolated. In each animal in the experimental group was inoculated intravenously, 1 ml of blood containing $1,25 \times 10^5$ trypomastigotes of *T. vivax* [15].

2.3 Clinical exams, determination of PCV and parasitemia assessment

Daily for 60 days after infection (DPI) were performed in animals infected and control groups of clinical examinations and were assessed rectal temperature, aspect of apparent mucous, volume of the external lymph nodes on palpation. Was also performed twice daily inspection of animals for identification of clinical evidence and behavioral changes that indicate the occurrence of oestrus signs such as: restlessness, accepting rides, edema and hyperemia of the vulva and the presence of vaginal discharge.

Parasitemia was determined daily by the research of trypanosome in the blood collected from small veins located in the ear using a thick drop of blood spread on a slide and covered by a cover slip [15].

Concomitant clinical examination and determination of parasitemia 2ml of blood were obtained by puncture of the jugular vein, placed in sterile tubes containing 1mg/ml of ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) for determination of PCV.

2.4 Collection, macroscopic and histologic evaluation of ovaries

Ovaries were obtained with surgery under standard technique as described [30]. Immediately after the collection was performed macroscopic evaluation of the ovaries and then representative pieces of ovarian cortex were immersion-fixed in Bouin solution for 48 hours and then were preserved in ethanol 70%. The fixed werw embedded in paraffin, cut 4 μ m thickness and stained with hematoxylin and eosin. For qualitative assessment of 30 follicles from each ovary (right and left) per animal were analyzed and classified as morphologically normal follicles or follicles degenerated.

Follicles were classified into four classes according to the stage of follicular development in: primordial, one layer of flattened or flattened-cuboidal granulosa cells around the oocyte; primary, a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte; secondary, an oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells and tertiary when there is an antral cavity inside [31].

The follicular morphology was observed under an optical microscope evaluated taking into account the integrity of basement membrane, cellular density, presence or absence of pyknotic nuclei and even integrity of the oocyte. Only follicles with the oocyte nucleus apparent were counted to avoid counting the same follicle twice. Then based on these parameters, the follicles were classified individually as normal,

degenerated type I (only degenerated oocytes) or degenerate type II (oocyte and granulosa cells degenerate).

2.5 Diagnosis by PCR in the ovary

Samples of approximately 1 cm³ from the ovarian tissue were collected and placed in Eppendorf tubes containing 70% alcohol. The DNA preparations were subjected to a highly sensitive PCR assay specific for *T. vivax* [10]. This PCR method targets repeated gene sequences that encode cysteine proteases (Cathepsin L) and was carried out using the oligonucleotides Tvi2 (*forward*: 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTCGCCGA3') and DTO156 (*reverse*: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3') as primers. The diagnosis was confirmed via PCR by amplifying a DNA fragment of about 177 bp (base pairs) that is also observed in the DNA of *T. vivax* (isolated from Pantanal), which was used as positive control. The negative controls for PCR were previously selected DNA samples from the blood of non-infected goats [10].

2.6 Statistical analysis

After removing the 5 figures outliers and processing of raw data (y-2), there was the normal condition of the waste by test Cramer-Von Mises (W-Sq = 0.053496, p> 0.25) , using the procedure Proc Univariate of SAS software (Statistical Analysis System, version 6.10). Provided the assumptions made with analysis of variance (ANOVA) using PROC GLM of SAS. For comparison of different mean parasitemia, hematocrit and rectal temperature of each observation time, as well as the differences between the group of infected and morphologically normal as the control (ovarian follicles), we used the Tukey test at 5 % significance (p <0.05).

3 Results

3.1 Clinical examination and determination of parasitemia

During the period of adaptation, there were no clinical or hematologic diseases. The goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* showed fever on day 7 post-infection (dpi), with maximum 41°C (Fig. 1). The average values of this parameter were above the average values of the control group until the end of the experiment.

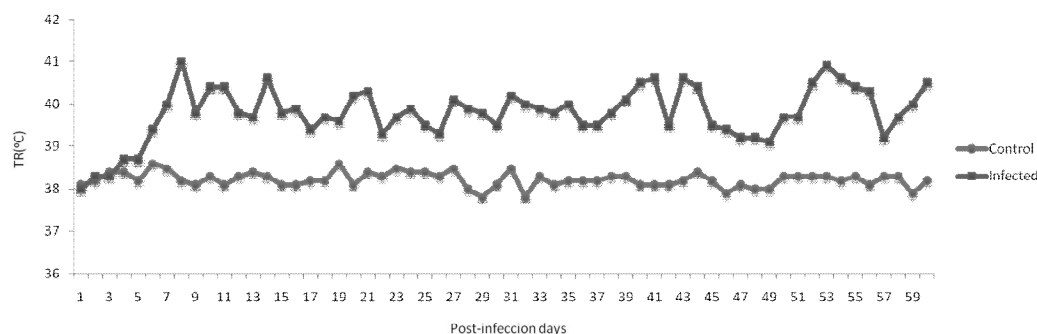


Figure 1. Mean values of rectal temperatures (TR) in °C of goat experimentally infected group with *Trypanosoma vivax* and the control group during the period experimental.

All goats in the infected group showed, from 15^o dpi until the end of experiment, apathy, anorexia, pallor of mucous membranes, enlarged lymph nodes and progressive loss of weight. The goat n. 4 showed worsening of clinical symptoms and 9^o dpi was found dead in the stall.

The animals in the infected group remained anestrous throughout the experimental period, whereas in control animals was detected at least one occurrence of estrus per animal during the experimental period.

The presence of trypanosomes in peripheral blood was found in all animals from the infected group after 3^o dpi. The parasitemia increased progressively, reaching a maximum between the 7^o and 14^o dpi. From that period, the parasitemia showed decreasing and parasitemia peaks were of low intensity alternating periods with no parasitemia (Fig.2).

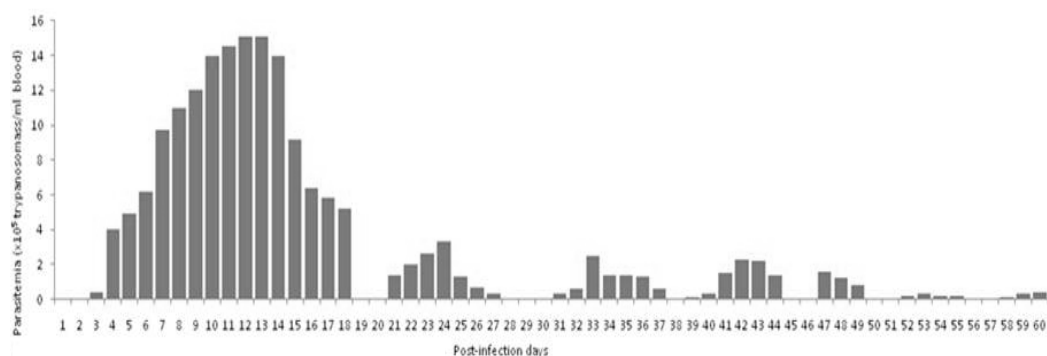


Figure 2. Mean values of parasitemia (x105 trypanosomes / ml blood) of goats experimentally infected group with *T. vivax* during the experimental period.

3.2 PCV assessment

At 7^o dpi until the end of the experiment, the goats in the infected group showed significant reduction ($p < 0.05$) in the mean PCV in the control group. The average PCV in the control group remained within the normality range for the species during the experimental period.

3.3 Macroscopic and histologic evaluation of ovaries

As for macroscopic aspect, the ovaries of four animals infected groups had been reduced in size, with a firm consistency, with smooth surface with no follicles or corpora lutea. In the control group, the ovaries showed growing follicles and corpora lutea visible on its surface.

Histological analysis showed that in the infected group was significantly reduced ($P < 0.05$) in the mean value of follicles compared to control group. Regarding the stage of development of normal follicles, in the infected group there was no significative difference between the number of follicles primordial, primary, secondary and tertiary. In the control group, the number of primordial and primary follicles was significantly higher ($p < 0.05$) than the secondary and tertiary.

Concerning the integrity, no significant difference in the average value of the follicles degenerate type I between the control and infected. The number of follicles degenerate type II was significantly higher ($p < 0.05$) in the infected group than the control group. Most of the follicles degenerate type II observed in the infected group was primordial and primary (Table 1).

Table 1 - Mean values of goat follicles as integrity e category of experimentally infected group with *Trypanosoma vivax* and the control group.

Follicle category	Trataments					
	Control Group			Infected Group		
	Normal	Degenerate type I	Degenerate type II	Normal	Degenerate type I	Degenerate type II
Primordial	21,33 ± 5,13 a A	1,50 ± 2,38 a B	7,00 ± 4,97 a B	3,67 ± 2,58 a B	1,33 ± 1,03 a B	18,83 ± 5,46 a A
Primary	17,35 ± 6,56 ab A	0,50 ± 1,01 a B	3,25 ± 0,50 ab B	3,67 ± 2,50 a B	1,33 ± 1,97 a B	18,17 ± 4,22 a A
Secondary	8,25 ± 6,40 bc A	0,00 ± 0,00 a B	1,75 ± 2,87 ab AB	2,83 ± 2,23 a AB	0,33 ± 0,52 a B	4,20 ± 3,35 b AB
Tertiary	2,75 ± 3,10 c A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 b A	1,50 ± 1,38 a A	0,00 ± 0,00 a A	1,83 ± 1,83 b A

Means followed by same letter in column do not differ at 5% significance level.

Means followed by same capital letter in line, do not differ at 5% significance level.

Morphologically, normal follicle had a spherical or elliptical oocyte, with a spherical or elliptical, with central nucleus and cytoplasm uniform. Granulosa cells without were well organized in layers around the oocyte, and a distinguishable intact basement membrane was present. Follicles degenerated type I showed picnotic nucleus and the follicles degenerated type II beyond nucleus picnotic showed retraction oocyte and granulosa cells turgid and disorganized (Fig. 3).

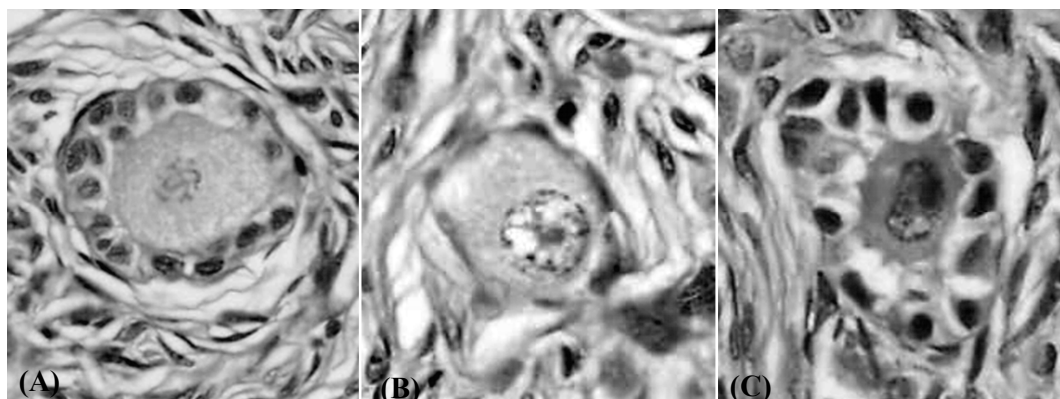


Figure 3. Histological features of canine ovarian fragments. Morphologically normal (A) ovarian follicles. Degenerated ovarian follicle with retraction citoplasmic and disorganization of granulosa cell layers (Follicle degeneration tipe I) (C). Picnotic nucleus and disorganization of granulosa cell layers (Follicle degeneration tipe II). Scale bar represents 10 mm, hematoxilin-eosin staining.

3.4 Diagnosis by PCR in the ovary

The analysis of *T. vivax* in ovarian tissues by a specific PCR for *T. vivax* (TviCatL-PCR) showed the amplification of a DNA fragment of about 177 bp specific for *T. vivax* taken from the catalytic domain of the Cathepsin L gene, which was visualized in the right and left ovaries of all the goats infected groups. PCR was, however, negative for all of control group samples.

4 Discussion

Severe and diverse clinical pathology signs (have been associated with trypanosomosis by *T. vivax* in the semi-arid region of Brazil with outbreaks of infection characterized by anemia, weight loss, neurological symptoms, reduced milk production, perinatal mortality [15, 16].

In this region, the infection has also emerged as a cause of reproductive failure, since the parasite infection in cattle, goats and sheep has been associated with anoestrus, repeat estrus, abortion, and testicular degeneration [15, 24, 22]. The knowledge the effect of infection by *T. vivax* in experimentally infected animals may contribute to the description of injuries and clarification of pathogenesis in reproductive organs, especially in the chronic phase as occurs in naturally infected animals [22]. This study investigates the effect of the parasite in follicular dynamics and research through the polymerase chain reaction (PCR) the presence of the parasite in the ovarian tissue of goats experimentally infected with *T. vivax* aiming elucidate the causes of anestrus frequently reported during outbreaks of infection by the parasite in domestic ruminants.

After inoculation, the experimentally infected goats showed clinical symptoms of trypanosomiasis, showing that addition of parasitemia, hyperthermia and decreased PCV were aspects found after infection. Evaluations of clinical pathology of experimental infection in goats and sheep with the same strain of *T. vivax* used in this study were conducted by other authors that proved the pathogenicity of the isolate [24, 22]. The clinical course of disease showed standard of evolution similar to those observed by these authors, characterized by the acute phase with peaks of parasitemia between 7⁰ and 14⁰ dpi, followed by the chronic phase characterized by absent parasitemia waves, alternating with low intensity parasitemia.

Mean values of rectal temperature did not correspond to the peak of parasitemia, ie, after inoculation, the rectal temperature of infected animals remained high with

independent variations of peak parasitemia. The PCV was also another parameter that showed the typical progression of infection by salivary trypanosomes with significant ($p < 0.05$) and progressive reduction of the values from 7⁰dpi. The assessment of the degree of anemia, through research PCV has been frequently used in monitoring the progression of the disease [32]. The decrease of PCV was drastic in the group of infected animals, reached 11% (50% below normal value for the species described). Low PCV is associated with more severe stages of trypanosomiasis and may have contributed to the fatal course of disease of goats N° 10. The occurrence of anemia confirms the results of studies reporting that hematologic changes as the most frequently observed in animals experimentally or naturally infected by *T. vivax* [32, 33, 34].

In the present study was assessed for the first time the involvement of the ovary in trypanosomiasis caused by *T. vivax*. In this study it was clear that infected goats showed alterations in ovarian morphology, both macroscopically and histological findings. The gross findings, characterized by small sizes of ovaries with no follicles or apparent corpora lutea are characteristic of absence of ovarian activity in animals showing anestrus [35, 36].

Histological analysis it became evident that a significant reduction ($p < 0.05$) in the number of normal follicles in goats experimentally infected with the parasite. Regarding the developmental stage of follicles assessed, the absence of significant differences between the number of primordial, primary, secondary and tertiary follicles, suggesting a little evolution of the dynamics of follicular population in the group of infected animals. Significant difference ($p < 0.05$) observed in mean values of follicle in the control group showed that the follicular population obeyed the estimated distribution for the species. In ruminants, about 90% of the population consists of ovarian primordial follicles and are considered precursors of the population of follicles that reach the ovulatory stage [31].

Regarding the assessment of follicular integrity, the highest number of follicles degenerate type II was found in the group of infected animals, affecting mainly primordial and primary follicles. The follicular degeneration is a physiological process [37], together with apoptosis [38], responsible for follicular atresia or regression, since a large proportion of antral follicles do not ovulate and are eliminated by atresia. The follicular degeneration although it is a natural process, when intense can affect

quantitatively the population of viable ovarian follicle [29]. In the present study we verify that the follicular degeneration type II mainly affected the reserve pool of follicles, which may justify the interruption of cyclic ovarian activity and subsequent anestrus.

Reducing the number of normal follicles, as well as the high rate of follicular degeneration observed in infected goats may have been caused by the characteristics of the infection, since the trypanosomiasis is a disease that affects the normal metabolism of the animal, leading to negative balance energy and protein [39], anemia [16, 24], anorexia [40] and immunosuppression [41].

The presence of *T. vivax* in the ovarian tissue, identified by PCR in goats infected groups, confirms the extravascular migration of the parasite frequently reported in the literature and demonstrates the involvement of the parasite in reducing the population of normal follicles and increased follicular degeneration. The technique of polymerase chain reaction, PCR is a sensitive and specific technique in detecting animals infected with *T. vivax*, using for analysis the blood [42]. However, the technique of extracting DNA of *T. vivax* from ovary for later PCR analysis consists of an unprecedented event. Others studies demonstrate the presence of the parasite by PCR in the parenchyma of the testis in goats experimentally infected showed that severe testicular degeneration and epididymitis [22].

Therefore, this study has shown that the parasitemia was not associated with the intensity of the bands observed in agarose gel, i.e, goats with low or absent parasitemia showed strong intensity of the DNA fragment and with high parasitemia, medium and low bands. The presence of strong bands in the ovaries of animals with parasitaemia absent once again confirms the extravascular migration of *T. vivax* which can be associated with the genesis of the lesions observed in the ovaries of infected animals.

5. References

- [1] Jones TW, Dávila AMR. *Trypanosoma vivax* out of Africa. Trends Parasitol 2001; 17:99–101.
- [2] Auty H, Mundy A, Fyumagwa RD, Picozzi K, Welburn S, Hoare R. Health management of horses under high challenge from trypanosomes: a case study from Serengeti, Tanzania. Vet Parasit 2008; 154:233–24.

- [3] Ogwu D, Njoku CO, Osori DIK. Effects of experimental *Trypanosoma vivax* infection on first, second and third trimester pregnancy in heifers. *Theriogenology* 1986; 25:238-396.
- [4] Gardiner PR, Mahmoud MM. Salivarian trypanosomes grateful to the following individuals for kindly providing DNA or causing disease in livestock outside sub-Saharan Africa. In "Parasitic blood samples: *T. vivax* from West Africa and Colombia were donated Protozoa", (J. P. Kreier and J. R. Baker, Eds.) 1992: 277–313.
- [5] Sekoni VO. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A Review. *Theriogenology* 1994; 42:557-570.
- [6] Okech G, Watson ED, Luckins AG, Makawiti DW. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in boran cattle. *Theriogenology* 1996; 46:859-869.
- [7] Gutierrez C, Corbera JA, Morales M, Büscher P. Trypanosomiasis in goats: current status. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2006; 108:300-310.
- [8] Desquesnes M. Livestock Trypanosomiasis and Their Vectors in Latin America. OIE & CIRAD: Paris, 2004.
- [9] Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Añez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MMG. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitol* 2006; 133: p.159-169.
- [10] Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira MM. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterisation, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes* 2009; 23:44–51.
- [11] Serra Freire NM. Oiapoque - outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Rev Bras Med Vet* 1981; 4:30–31.
- [12] Silva RAMS, Silva JA, Schneider RC, Freitas J, Mesquita D, Mesquita TC, Ramirez L, Dávila AMR, Pereira EB. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal, Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996; 5:561-562.
- [13] Paiva F, Lemos RAA, Nakasato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. I - Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Rev Bras Parasitol Vet* 2000; 9:135–141.

- [14] Linhares GFC, Dias-Filho FC, Fernandes PR, Duarte SC. Bovine tripanosomiasis in the municipality of Formoso do Araguaia County, Tocantins, Brazil (case report). *Ciência Animal*. 2006; 7:455–460.
- [15] Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007; 143:174–181.
- [16] Batista JS, Oliveira AF, Rodrigues CMF, Damasceno CAR, Oliveira IRS, Alves HM, Paiva ES, Brito PD, Medeiros JMF, Rodrigues AC, Teixeira MMG. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Vet Parasitol* 2009; 165:131–135.
- [17] Guerra RMSNC, Feitosa Júnior AB, Santos HP, Abreu-Silva AL, Santos ACG. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciência Rural* 2008; 38: 833–835.
- [18] Silva AS, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STA, Monteiro SG. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 2009; 39:2550-2554.
- [19] Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MF. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 169:320-326.
- [20] Silva AS, Perez HAG, Costa MM, França RT, De Gasperi D, Zanette RA, Amado J A, Lopes STA, Teixeira MMG, Monteiro SG. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitol Res* 2010; 108:23-30.
- [21] Sekoni VO. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A Review. *Theriogenology* 1994; 42:557-570.
- [22] Bezerra FSB, Garcia HA, Alves HM, Oliveira IRS, Silva AE, Teixeira MMG, Batista JS. *Trypanosoma vivax* in testicular and epididymal tissues of experimentally infected sheep. *Pesq Vet Bras* 2008; 28:575-582.
- [23] Silva RAMS, Pellegrin AO, Ramirez ESSLL, Dávila AMR. Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia. *Embrapa Pantanal*, Corumbá 2004:30.

- [24] Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Rosado Neto AM, Petri AA, Teixeira MMG. Clinical, epidemiological and pathological signs of natural infection in cattle by *Trypanosoma vivax* in Paraíba, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2008; 28:63–69.
- [25] Batista JS, Rodrigues CM, Olinda RG, Silva TM, Vale RG, Câmara AC, Rebouças RE, Bezerra FS, García HA, Teixeira MM. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitol Res* 2011; XXXX
- [26] Gardiner PR, Assoku RKG, Whitelaw DD, Murray M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. *Vet Parasitol* 1989; 31:187–197.
- [27] Masake RA. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. *Vet Rec* 1980; 107:551–557.
- [28] Kimeto BA, Mugera GM, Nyaga PN. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. *Vet Parasitol* 1990; 34:295–301.
- [29] Silva JBA. Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará. 2006.
- [30] Tudury EA, Potier GMA. Tratado de Técnica Cirúrgica Veterinária. São Paulo: Med Vet; 2009:447.
- [31] Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van der Huck R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart* 1994;2:78–80.
- [32] Batista JS, Correa FR, Barbosa RC, Guerra JL. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep. *Pesq. Vet. Bras.* 2006; 26:31–37.
- [33] Pellín CES, González FAG, Baldizán G, Liñarez FFM. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico em ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. *Vet Tropical* 2003; 28:79-92.
- [34] Valera Z, Parra O, Alvarado M, Barboza G, Escalona F, Ramírez R. Efecto de la infección experimental com *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos em ovinos. *Revta Cient* 2005; 15(5):412-420.
- [35] Martinat-Botté F, Renavo G, Made F, Costiou P, Terqui M. Ultrasonography and reproduction in swine. Paris: INRA, 2000:103.

- [36] Morés N, Sobestiansky J, Lopez, A. Avaliação patológica de suínos no abate: manual de identificação. Brasília: EMBRAPA comunicação para transferência de tecnologia 2000: 40.
- [37] Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry* 2005; 70: 231-239.
- [38] Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reprod Update* 2005; 11:162-178.
- [39] Vertegen MWA, Zwart D, Van Der Hel W, Brouwer BO, Wensing T. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on the energy and nitrogen metabolism of West African Dwarf Goats. *Journal Animal Science* 1991; 69:1667-1677.
- [40] Adeiza AA, Maikai VA, Lawal AI. Comparative haematological changes in experimentally infected Savannah brown goats with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma vivax*. *Afr Jou of Bio* 2008; 7:2295–2298.
- [41] Stephen, L.E. Trypanosomiasis: a veterinary perspectiva. Pergamon Press, New York; 1986.
- [42] Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene for a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic space sequence. *Exp Parasitol* 2001; 99: 37-48.