



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

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS
EM OVELHAS INFECTADAS POR *Trypanosoma vivax* NO
INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO**

TACIANA DE MELO FERNANDES SILVA

Médica Veterinária

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Maio – 2012

TACIANA DE MELO FERNANDES SILVA

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS
EM OVELHAS INFECTADAS POR *Trypanosoma vivax* NO
INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO**

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

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Maio – 2012

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFRSA**

Bibliotecária:
Vanessa
de Oliveira
Pessoa

CRB15/45
3

S586e Silva, Taciana de Melo Fernandes.
Estudos de parâmetros clínicos e patológicos em ovelhas infectadas por *Trypanosoma vivax* no início e final da gestação. / Taciana de Melo Fernandes Silva.-- Mossoró, 2012.

110 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência animal.) Área de concentração: Sanidade animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Dr. Jael Soares Batista.

1. Aborto. 2. Ovelha. 3. PCR. 4. Trypanosoma. I.Título.

CDD: 636.39089

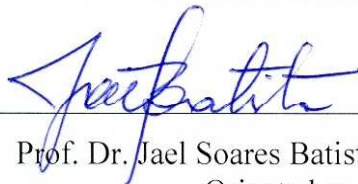
TACIANA DE MELO FERNANDES SILVA

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS
EM OVELHAS INFECTADAS POR *Trypanosoma vivax* NO
INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO**

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 25 / 05 / 12

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)
Orientador



Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas (UFERSA)
Primeiro Conselheiro



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TACIANA DE MELO FERNANDES SILVA – Nascida no Município de Natal-RN, filha de Iaponan Jatahi Lula Fernandes e Paula Frassinete do Nascimento Melo. Concluiu no ano de 2002 Curso Técnico Profissionalizante em Tecnologia Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – IFRN. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2009.1. Tornou-se Especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais pela UFERSA/EQUALIS em 2011. Especializou-se ainda em Residência em Clínica Médica, Cirurgia e Anestesiologista de Pequenos Animais no ano de 2011. Em março desse mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, onde durante o período de mestrado foi colaboradora nas disciplinas de Patologia Geral, Patologia Veterinária, Medicina Legal e Bioética no curso de Medicina Veterinária, realizando diversas publicações na área de Patologia nas diferentes espécies domésticas e silvestres, acompanhando surtos naturais e infecções experimentais de *Trypanosoma vivax*.

Às pessoas que acreditaram em mim, sendo
elas: meus pais, meu esposo, professores,
amigos e familiares.

Dedico

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a força que me protege, ilumina minhas decisões, conforta meu coração e que me ensinou a ter serenidade nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais, Iaponan Jatahi Lula Fernandes e Paula Frassinete do Nascimento Melo, pelo amor incondicional, pela educação e por sempre terem se esforçado para me colocar em uma boa escola, onde constitui minha base para estar aqui. À vocês, agradeço do fundo do meu coração!

Ao meu esposo, Vinícius Sousa e Silva, que não tenho palavras para descrever o quanto me ajuda, sempre com palavras sábias e com gestos de amor e carinho. E dizer que é muito bom tê-lo ao meu lado todos os dias, sendo meu amor, amigo e companheiro.

Ao meu orientador Jael Soares Batista por ter aceitado me orientar, por ter me ensinado desde a graduação, como é a melhor forma de redigir um artigo (inclusive pela grande ajuda nesse em especial), a dar meus primeiros passos como pesquisadora. Hoje não o considero apenas um orientador e sim um amigo. Admiro muito pelo seu trabalho, esforço e como se comporta diante dos seus orientados, porque você não é só um professor e sim um educador.

À todos os membros do colegiado que estão fazendo um trabalho brilhante na pós-graduação, fazendo com que ela se torne melhor cada vez mais; agradeço principalmente ao coordenador Jean Berg Alves da Silva, pela sua serenidade, competência e dinamismo.

Aos meus familiares, pelo apoio e alegria quando estamos todos juntos.

À todos os professores que eu tive durante a minha vida, onde cada um contribuiu para eu chegar até aqui.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite de participarem da minha defesa. Professor Dr. Carlos Iberê Alves Freitas, que sempre contribui da melhor forma com seu empenho e correções. E professor Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto, que pela primeira vez participou de minha banca, foi uma enorme satisfação.

Ao CNPq pela bolsa, pois ela foi muito importante durante esse período. E ao professor Sidney Sakamoto que junto com o Programa PROCAD, viabiliza recursos para melhorar nossas pesquisas e aprendizado.

Aos meus amigos de infância Alcione, Emmanuelle, Fabiana, as Saras (trigêmeas); da graduação (Rejane); e os que ingressaram comigo no mestrado (Vanessa, Manuela, Sávio, entre outros), em especial a Rociene, que juntas fomos muito fortes, mas do que pensávamos que poderíamos ser, pois não foi nada fácil nossa caminhada; amiga sua amizade vou levar pra sempre no meu coração.

Aos companheiros de laboratório, Carla Monadeli, Robério, Maxson, Débora, Canindé e Geysa, obrigada pela companhia e amizade.

À professora, Marta Teixeira que sempre abre as portas para o nosso laboratório, sendo uma grande parceira. Muito obrigada Marta.

Ao laboratório de histologia, principalmente a Sérvulo que passou várias horas aguardando eu tirar fotos no microscópio.

À Wesley, pela ajuda na estatística do trabalho, por sua viagens espaciais no mundo da estatística.

À Antônio Carlos, que foi parceiro no meu artigo, que contribuiu muito, amigo obrigada.

Ao professor Alexandre Paula Braga, pela concessão do espaço para realização do experimento; e ao meu amigo Caju por ter me ajudado a cuidar dos animais.

Em especial, agradeço aos animais que fizeram parte do meu experimento.

Meus sinceros agradecimentos.

ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS EM OVELHAS INFECTADAS POR *Trypanosoma vivax* NO INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO

SILVA, Taciana de Melo Fernandes. **Estudo de parâmetros clínicos e patológicos em ovelhas infectadas por *Trypanosoma vivax* no início e final da gestação**. 2012. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovelhas em diferentes fases da gestação, determinar a patogênese das falhas reprodutivas, e confirmar a transmissão transplacentária por PCR. Foram utilizadas 12 ovelhas prenhas, adultas em três grupos experimentais G1, formado por três ovelhas infectadas no terço inicial da gestação; G2, composto por três ovelhas infectadas no terço final da gestação; e G3, constituído por seis ovinos não infectados (grupo controle). Cada ovelha do G1 e G2 foi inoculada com $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas. Exames clínicos, avaliação do hematócrito, bioquímica sérica, determinação da concentração plasmática de progesterona e parasitemia foram determinados diariamente. Foram realizados exames anatomopatológicos dos fetos, placenta, cordão umbilical e pesquisa de DNA do parasita na placenta, líquido amniótico, sangue e tecidos dos fetos. A parasitemia foi alta, alcançando picos de $2,7 \times 10^6$, sendo persistente durante todo o período experimental. A infecção foi caracterizada por mortalidade das ovelhas e mortalidade perinatal no terço inicial; aborto e mortalidade perinatal no terço final da gestação. Os fatores possivelmente relacionados com as falhas reprodutivas maternas foram baixos escore corporal, hematócrito, níveis séricos de glicose, proteína total, colesterol e progesterona. A presença do DNA do *T. vivax* no sangue e tecidos de fetos, placenta e líquido amniótico, confirma a transmissão transplacentária do parasita. A presença de lesões histológicas nos órgãos fetais e placenta sugerem a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos.

Palavras-Chaves: aborto, PCR, ovelha, transmissão transplacentária, trypanosoma.

STUDY OF CLINICAL AND PATHOLOGICAL PARAMETERS IN EWES INFECTED BY *Trypanosoma vivax* BEGINNING AND END OF PREGNANCY

SILVA, Taciana Fernandes de Melo. **Study of clinical and pathological parameters in ewes infected with *Trypanosoma vivax* in the beginning and end of pregnancy.** 2012. 109f. Dissertation (MSc in Animal Science: Animal Health) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2012.

ABSTRACT: This study aimed to investigate the effect of experimental infection with *Trypanosoma vivax* in ewes at different stages of pregnancy, to determine the pathogenesis of reproductive failure, and confirm transplacental transmission by PCR. A total of 12 pregnant ewes were divided into three groups G1, consisting of three ewes infected in the first third of pregnancy, G2, consisting of three infected ewes in the final third of gestation, and G3, consisting of six non-infected sheep (control group). Each ewe in G1 and G2 was inoculated with trypomastigotes 1.25×10^5 . Clinical examination, assessment of hematocrit, serum chemistry, determination of plasma progesterone and parasitemia were determined daily. Pathological examinations were conducted of the fetus, placenta, umbilical cord blood and DNA detection of the parasite in the placenta, amniotic fluid, blood and tissues of fetuses. The parasitaemia was high, reaching peaks of 2.7×10^6 , being persistent throughout the experimental period. The infection was characterized by the ewes mortality and perinatal mortality in the first third; abortion and perinatal mortality in the final third of gestation. The factors possibly related to maternal reproductive failures were low body score, hematocrit, serum glucose, total protein, cholesterol and progesterone. The presence of DNA of *T. vivax* in the blood and tissues of fetuses, placenta and amniotic fluid, confirming transplacental transmission of the parasite. The presence of histological lesions in the fetal organs and placenta suggest the involvement of the parasite in the pathophysiological mechanism of reproductive damage.

Key words: abortion, PCR, sheep, transplacental transmission, trypanosomiasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µL	Microlitro
µm	Micrômetros
CatL-like	Cathepsin L-like
cm ³	Centímetro cúbico
DL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Dias pós infecção
Dr.	Doutor
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo controle
GH	Hormônio do crescimento
GLUT's	Transportadores de glicose
Kg	Quilograma
MG	Minas Gerais
MHz	Mega-hertz
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Obj	Objetiva
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PB	Paraíba
PCR	Reação em Cadeira Polimerase
Prof.	Professor
RN	Rio Grande do Norte

TviCatL - PCR
UFERSA
USA

PCR específico para *T. vivax* visando sequências CatL-like
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
United States of America

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados e controle de acordo com as variáveis parasitemia, temperatura e hematócrito.	69
Tabela 2 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados e controle de acordo com as variáveis estudadas.	69
Tabela 3 – Valores de curva linear, quadrática e cúbica das variáveis estudadas de acordo o número de dias.	69
Tabela 4 – Valores de curva linear, quadrática e cúbica das variáveis estudadas de acordo o número de dias.	70
Tabela 5 – Análise de correlação entre as variáveis estudadas relacionadas ao grupo G1.	71
Tabela 6 – Análise de correlação entre as variáveis estudadas relacionadas ao grupo G2.	72
Tabela 7 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados de acordo com as variáveis parasitemia e temperatura no decorrer do tempo.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esfregaço da camada leucocitária - <i>Trypanosoma vivax</i> no sangue de ovelha prenha infectada experimentalmente.....	23
Figura 2: Baías teladas para alojar os animais dos grupos experimentais.....	62
Figura 3: Valores médios das parasitemias ($\times 10^5$ tripanossomas/ml de sangue) em ovelhas infectadas experimentalmente por <i>Trypanosoma vivax</i> nos terço inicial da gestação (G1), terço final da gestação (G2), durante o período de observação.....	66
Figura 4: Valores médios de temperatura (°C) em ovelhas infectadas experimentalmente por <i>Trypanosoma vivax</i> nos terço inicial da gestação (G1), terço final da gestação (G2) e grupo controle (G3).....	67
Figura 5: Ovelha apresentando perda de peso, devido à infecção por <i>trypanosoma vivax</i>	68
Figura 6: Feto abortado no terço final da gestação.....	75
Figura 7: Necrose e desaparecimento do epitélio coriônico da placenta de ovelhas infectadas experimentalmente por <i>Trypanosoma vivax</i> no terço final da gestação. Hematoxilina-eosina, obj. 20×.....	76
Figura 8: Necrose hepatocelular difusa e hepatite multifocal mononuclear em feto abortado no terço final da gestação de ovelhas infectadas experimentalmente por <i>Trypanosoma vivax</i> . Hematoxilina-eosina, obj. 40×.	76
Figura 9: Encefalite multifocal monoclear em feto abortado no terço final da gestação de ovelhas infectadas experimentalmente por <i>Trypanosoma vivax</i> . Hematoxilina-eosina, obj. 20×.....	77
Figura 10: As amostras foram positivas nas placentas das ovelhas 1, 2 e 3 (bandas 7, 13 e 23); líquido amniótico da ovelha 4 (banda 22), sistema nervoso central e coração do feto da ovelha 1 (bandas 4 e 5).....	77
Figura 11: As amostras foram positivas nas placentas das ovelhas 5 e 6 (bandas 1 e 2); no sangue do recém-nascido da ovelha 2 (banda 15); rim e testículo do feto da ovelha 5 (bandas 5 e 9).	78

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1.1 O <i>Trypanosoma vivax</i>	20
1.1.1.1 Gênero <i>Trypanosoma</i>	21
1.1.1.2 Taxonomia.....	22
1.1.1.3 Morfologia.....	22
1.1.1.4 Epidemiologia	23
1.1.1.5 Patogenia e sinais clínicos.....	27
1.1.1.6 Alterações hematológicas e bioquímicas	29
1.1.1.7 Alterações anatomopatológicas.....	30
1.1.1.8 Desordens reprodutivas	32
1.1.1.9 Diagnóstico.....	33
1.1.1.10 Controle e tratamento	35
1.1.2 Transmissão transplacentária.....	36
1.1.3 Placenta	37
1.1.3.1 Funções da placenta	37
1.1.3.2 Estrutura geral placentária.....	38
1.1.3.3 Placenta de ruminantes.....	38
1.1.3.4 Placenta de ovinos.....	39
1.2 OBJETIVOS.....	41
1.2.1 Geral	41
1.2.2 Específicos	42
1.3 REFERÊNCIAS	42
2. CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS EM OVELHAS INFECTADAS POR <i>Trypanosoma vivax</i> NO INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO.....	60

2.1 RESUMO	60
2.2 INTRODUÇÃO.....	60
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
2.3.1 Delineamento dos grupos experimentais.....	62
2.3.2 Preparo do inóculo e infecção experimental com <i>Trypanosoma vivax</i>.....	63
2.3.3 Determinação da parasitemia	63
2.3.4 Exames clínicos, escore corporal das ovelhas e peso dos recém-nascidos e fetos abortados.....	64
2.3.5 Avaliação do hematócrito, bioquímica sérica e análise de progesterona	64
2.3.6 Estudo histopatológico	64
2.3.7 Diagnóstico de <i>T. vivax</i> por PCR.....	65
2.3.8 Análise estatística	65
2.4 RESULTADOS	66
2.4.1 Parasitemia	66
2.4.2 Sinais clínicos e alterações reprodutivas	66
2.4.3 Hematócrito, bioquímica sérica e análise de progesterona	68
2.4.4 Estudo anatomohistopatológico	75
2.4.5 Detecção do DNA do parasita em tecidos fetais e placenta	77
2.5 DISCUSSÃO.....	78
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
2.7 REFERÊNCIAS	83
ANEXOS.....	90
ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PATOGÊNESE DAS FALHAS REPRODUTIVAS INDUZIDA POR <i>Trypanosoma vivax</i> EM OVELHAS PRENHAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE À REVISTA VETERINARY RESEARCH.....	90
ANEXO II - PATHOGENESIS OF REPRODUCTIVE FAILURE INDUCED BY <i>Trypanosoma vivax</i> IN EXPERIMENTALLY INFECTED PREGNANT EWES.....	91

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tripanossomíases são doenças provocadas por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, que têm larga distribuição e importância econômica em países africanos, principalmente em regiões ocupadas pelo seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé (GARDINER et al., 1989). No Oeste da África o *Trypanosoma vivax* é considerado o hemoparasita mais patogênico e importante de ruminantes.

T. vivax foi introduzido na América Latina com a importação de gado da África, provavelmente no final do século XIX. No continente americano o parasita se adaptou à transmissão mecânica por insetos hematófagos tais como *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp. Esse fato foi responsável pela dispersão do *T. vivax* em muitos países, como Guiana Francesa, Colômbia, Panamá, Bolívia, Venezuela e Costa Rica (SILVA et al., 1998; DESQUESNES, 2004; GARCÍA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

No Brasil, *T. vivax* foi descrito inicialmente no Estado do Pará, onde o parasita foi detectado em um búfalo que apresentava febre e emagrecimento (SHAW; LAINSON, 1972). Desde então, já foi relacionado em rebanhos bovinos de diversos estados brasileiros de Norte a Sul (SERRA FREIRE, 1981; SILVA et al., 1996; PAIVA et al., 2000; LINHARES et al., 2006; GUERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2007, 2008; CUGLOVICI et al., 2010).

Como a tripanossomíase é uma doença ainda emergente no Brasil, a maioria dos produtores desconhece seus sinais clínicos e patológicos. Em estudos recentes, que notificaram surtos da infecção pelo *T. vivax* no Nordeste brasileiro, com bovinos, ovinos e caprinos, ficou constatado que o parasita apresenta alta patogenicidade sendo a enfermidade marcada por morte de animais e desordens reprodutivas caracterizadas por aborto, repetição de cio, nascimento de natimortos, crias fracas e anestro temporário ou permanente (BATISTA et al., 2007, 2008).

Contudo, apesar de ser um parasita com surtos já identificados no Nordeste brasileiro, ainda é pouco conhecido o papel epidemiológico da transmissão transplacentária do *T. vivax*, e quais os prejuízos que possam vir a causar na economia dessa região. Nesse contexto, deve-se considerar que existem muitas causas de perdas fetais e de recém nascidos em rebanhos ovinos, resultando em prejuízos econômicos significativos, sendo, pois, a identificação dessas causas de fundamental importância para se determinar as devidas medidas de prevenção e controle.

Entre os 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 essa susceptibilidade, ovinos e caprinos são frequentemente utilizados como modelo experimental na avaliação da virulência e patogenicidade dos isolados. O curso da infecção experimental por *T. vivax* nos ovinos pode ser dividido em duas fases: a fase aguda, que persiste por aproximadamente duas semanas, caracterizada por parasitemia e febre alta; e a fase crônica, caracterizada por temperatura normal e parasitemia baixa ou ausente (BATISTA et al., 2006).

Em um surto com alta mortalidade de ovelhas infectadas por *T. vivax* criadas extensivamente em uma região não endêmica no Nordeste brasileiro, Galiza et al. (2011) verificaram que a mortalidade perinatal, devido a abortos e mortes neonatais, foi de quase 75%. Mortalidade perinatal também foi uma das principais manifestações verificadas por Batista et al. (2012) durante surtos ocorrido em fazendas localizadas na região semi-árida brasileira. Os autores sugerem que a transmissão transplacentária apresenta importância epidemiológica para manutenção e disseminação da doença em rebanhos de ruminantes infectados.

Embora existam evidências dos efeitos negativos da tripanossomíase causada por *T. vivax* sobre a reprodução de ruminantes, ainda há lacunas para ser esclarecidas sobre a patogênese das falhas reprodutivas durante a prenhes. Ciente de que a ovinocultura no Nordeste encontra-se em crescimento acelerado, contando com mais de 50% do rebanho de ovinos do país, sua importância no desenvolvimento socioeconômico é visivelmente relevante nesta região (EMBRAPA; 2002), havendo a necessidade de se estudar os efeitos negativos da tripanossomíase.

Os impactos econômicos causados por esta tripanossomíase estão relacionados com a queda na produção, associada ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis, e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutridos (GARCÍA et al., 2006).

Desta forma, as tripanossomíases possuem uma grande importância econômica para a pecuária por gerarem perdas na produção de leite, infertilidade, aborto, orquite, anemia e morte dos animais afetados (LOSOS, 1986; ANOSA, 1988). Nesse contexto, os efeitos do *T.*

vivax sobre a reprodução despontam como um dos principais responsáveis por acarretarem prejuízos econômicos para o produtor em áreas onde a enfermidade é prevalente.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da infecção experimental por *T. vivax* em ovelhas no início e final da gestação, determinar a patogênese do abortamento, bem como confirmar a transmissão transplacentária mediante pesquisa da presença de DNA de parasitas na placenta e tecidos de fetos abortados, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), promovendo a expansão do que se conhece acerca da transmissão desse parasita em neonatos de ovinos.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 O *Trypanosoma vivax*

Dentre os trypanosomas mais patogênicos para animais domésticos estão *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei* (ANOSA, 1988). Esses agentes são responsáveis por doenças em mamíferos de grande interesse econômico, especialmente bovinos, bufalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, e suínos, na África, Ásia e Américas Central e do Sul, sendo todas de origem africana, onde circulam entre ungulados selvagens que agem como reservatórios e raramente apresentam sinais clínicos da doença (STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2004; 2007).

A tripanossomíase provocada pelo *Trypanosoma vivax* é uma enfermidade debilitante e comumente fatal nos animais domésticos, que acarreta perdas econômicas por provocar crescimento retardado, aborto, perdas na produtividade, altos custos de tratamento e morte dos animais afetados (MARTINS et al., 2008). Segundo Losos (1986) e Anosa (1988), as tripanossomíases possuem grande relevância econômica para a pecuária por também gerarem perdas na produção de leite, infertilidade, orquite e anemia.

Acredita-se que o *Trypanosoma vivax* tenha sido introduzido na América do Sul em 1830, através de um carregamento de zebus oriundo do Senegal (DAVILA; SILVA, 2000). Entretanto, o primeiro relato da enfermidade no Brasil foi registrada por Shaw e Lainson, em 1972, no Pará, onde o parasita foi identificado mediante esfregaço sanguíneo em um búfalo com sintomatologia de febre e perda de peso. A tripanossomíase bovina por *Trypanosoma vivax*, recentemente, tem sido reportada em várias regiões do país.

As moscas tsé-tsé, responsável pela transmissão do *T. vivax*, infestam 10 milhões de quilômetros quadrados e afetam 37 países, principalmente na África, onde é conhecido como “nagana”. A doença infecta várias espécies de mamíferos, mas, do ponto de vista econômico, a tripanossomose transmitida pela mosca tsé-tsé é particularmente importante em bovinos (RADOSTITIS ET AL., 2000).

A subfertilidade está presente em muitos dos rebanhos acometidos pela doença. Em fêmeas, *T. vivax* provoca aborto, repetição de cio, queda na produção de leite, natimortos ou nascimento de crias fracas e anestro temporário ou permanente. Em machos, patologias reprodutivas ocasionadas por *T. vivax* estão especialmente ligadas a lesões testiculares e epididimárias e à queda na qualidade do sêmen. Nos casos crônicos da doença, infertilidade ou mesmo esterilidade podem estar presentes.

1.1.1.1 Gênero *Trypanosoma*

Distribuídos em todo o mundo, os *trypanosomas* encontram-se entre os parasitas mais abrangentes e com maior número de hospedeiros (STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007). Várias espécies de *trypanosomas* 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 *trypanosomas* de mamíferos nas secções Salivaria e Stercoraria segundo o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, consequentemente, na via de transmissão.

Dentre os *trypanosomas* 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 *trypanosoma* de origem Americana é considerado patogênico para ungulados. Nessa secção estão classificados *trypanosomas* com distribuição mundial, *T. theileri* e espécies relacionadas, que infectam bovinos e outros ruminantes em todo o mundo.

Os *trypanosomas* mais patogênicos para animais domésticos são o *Trypanosoma congolense*, o *T. vivax* e o *T. brucei* (ANOSA, 1988), sendo responsáveis por uma alta mortalidade de bovinos na África, onde são abundantes nas áreas de influência da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.). Nas regiões livres desta mosca, 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.

T. vivax já foi reportado em muitos países da América Latina (DÁVILA; SILVA, 2000). Tal distribuição fora do seu local de origem, o continente africano, tem sido atribuída à capacidade de adaptação à transmissão mecânica por insetos hematófagos como *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp. (ANOSA, 1983; OTTE; ABUABARA, 1991).

1.1.1.2 Taxonomia

Trypanosoma vivax é um hemoprotozoário eucariótico, flagelado, da ordem Kinetoplastida, família trypanosomatidae e subgênero Duttonella (HOARE, 1972). Segundo a sua forma de transmissão ao hospedeiro definitivo, está classificado na seção Salivaria, que engloba todos os trypanosomas transmitidos através da saliva contaminada das moscas tse-tse, pertencentes ao gênero *Glossina*. As principais espécies pertencentes a essa seção são: *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* e *T. suis* (STEPHEN, 1986).

Esses trypanosomas são ciclicamente transmitidos por moscas tsé-tsé ou mecanicamente por diversas moscas hematófagas. Os trypanosomas patogênicos para ungulados pertencem à seção 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).

1.1.1.3 Morfologia

As diversas espécies de trypanosoma podem diferir no tamanho e forma do corpo, na posição do núcleo e cinetoplasto, bem como no grau do desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (LEVINE, 1973).

As formas tripomastigotas de *T. vivax* encontradas na corrente sanguínea apresentam cinetoplasto grande, em forma de meia lua, localizado na porção terminal, um único flagelo livre e comprimento que varia de 16 a 26 µm (HOARE, 1972). Apresentam forma lancetada

com corpo alongado, achatado, extremidades afiladas e membrana ondulante reduzida (DÁVILA et al., 1997).

T. vivax é um parasito de ruminantes, também reportado em equinos (LOSOS; IKEDE, 1972; LEVINE, 1973), que se caracteriza morfológicamente por apresentar comprimento entre 18 e 31 μ m, incluindo o flagelo livre posterior, membrana ondulante inconspícua, extremidade posterior arredondada e cinetoplasto bem evidente, subterminal e lateral (HOARE, 1972). Isolados brasileiros também apresentam essas características morfológicas (DÁVILA et al., 1997).

Em estudo, Linhares (2006) encontrou uma média de 19,42 μ m $\pm$ 3,35, referente ao comprimento total dos trypanosomas encontrados em bovinos (Figura 1), que está próxima aos valores indicados por Fairbairn (1953), citado por Hoare (1972), de 21,4 a 24,6 μ m para caracterizar as formas curtas de *T. vivax*, em contraste com as formas longas de 23,6 a 27,0 μ m.

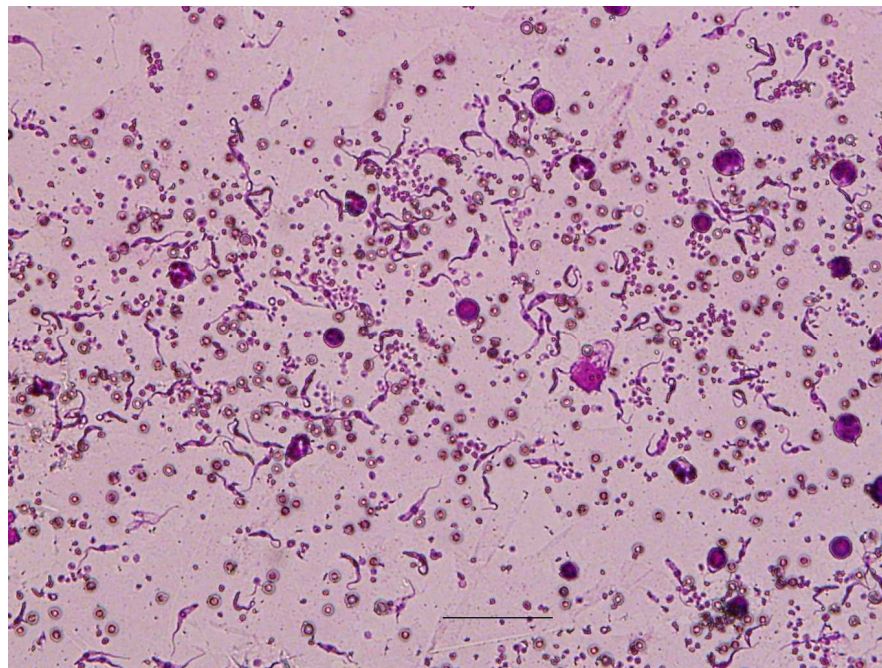


Figura 1: Esfregaço da camada leucocitária -*Trypanosoma vivax* no sangue de ovelha prenha infectada experimentalmente. Obj. 40X

1.1.1.4 Epidemiologia

T. vivax é um parasito originário da África, de onde se difundiu para outras regiões do mundo como Ásia, América do Sul, América Central e Caribe (HOARE, 1972; MELÉNDEZ

et al., 1995). Na África, a tripanossomíase nos animais é conhecida como “nagana” ou “secadeira”, termo genérico que abrange a infecção por *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei* (GARDINER, 1989).

Esse parasita causa a mais importante forma de tripanosomose em bovinos no Oeste da África, e surtos agudos têm sido relatados no Leste da África (LOSOS; IKEDE, 1972). A ampla dispersão geográfica deste parasita fora do continente africano é atribuída a sua habilidade de adaptação à transmissão mecânica por insetos hematófagos (ANOSA, 1983; CORDOVES et al., 1982; OTTE; ABUABARA, 1991).

T. vivax tem sido identificado na América do Sul desde 1919 (LEGER; VIENNE, 1919). A teoria mais aceita é a que este parasita foi introduzido por um rebanho vindo do Senegal (África) em 1830 (CURRASON, 1943). Depois difundiu-se de um país a outro por meio de traslados de bovinos.

Na América do Sul, a transmissão da infecção por *T. vivax* é mecânica e atribuída, principalmente, a tabanídeos. Esta tripanossomose é altamente prevalente nas regiões Norte e Central (Pantanal) do Brasil, onde é, geralmente, assintomática (SHAW; LAINSON, 1972; PAIVA et al., 2000; JONES; DÁVILA, 2001; CORTEZ et al., 2006).

Até 1976 a sua distribuição abrangia todos os países da costa Norte do Oceano Atlântico, além do Panamá, Brasil e as Ilhas de Guadalupe e Martinica (WELLS et al., 1982). Anticorpos sanguíneos contra o *T. vivax* foram encontrados em vários países da América do Sul: El Salvador, 15%; Costa Rica, 22,9%; Colômbia, 48,2%; Equador, 22,5%; Peru, 14,3%; Paraguai, 40% e Brasil, 54%, sendo que foram coletados, respectivamente, 100, 192, 3.324, 310, 49, 15 e 666 bovinos.

No Brasil, a ocorrência do *T. vivax* foi mencionada por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no Estado do Pará. Posteriormente Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasita em um búfalo (*Bubalis bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram feitos também por Serra Freire (1981), em ovinos e bovinos, no Oiapoque, Amapá; em búfalos no Amapá, por Serra Freire (1983) e em bovinos do Pantanal por Silva et al. (1996). Outros relatos em bovinos foram descritos nos estados do Mato Grosso (SILVA et al., 1996), Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 2000), Tocantins (LINHARES et al., 2006) e Paraíba (BATISTA et al., 2007).

Em Oiapoque, Amapá, Serra Freire (1981) relatou que 25% (8/32) dos búfalos examinados parasitologicamente apresentaram infecção por *T. vivax*, apresentando inclusive

diferentes índices de parasitemia, como houveram relatos de casos de morte entre os animais, o autor considerou como sendo patogênico o isolado encontrado. Num outro estudo no Amapá, Serra Freire (1981) e Serra Freire (1983) relataram uma prevalência de 8,9% em bubalinos e 7,6% em bovinos infectados com *T. vivax* nas localidades de Curiaú, Lagoa de Fora e Rio Pedreiras nos municípios de Macapá, Magazão Velho e Magazão Novo, respectivamente, sendo que a maior parte dos rebanhos tinha animais importados dos Estados do Mato Grosso e do Pará.

No Pantanal, estudos de Barros e Foil (1999) demonstraram que a época com mais Tabanidae ocorre na primeira metade da estação chuvosa, de setembro/outubro à dezembro/janeiro. Contudo, os tabanídeos ainda permanecem em grande número até o final da estação chuvosa. Essa estação representa o período de maior risco de transmissão de trypanosomas por esses insetos devido a sua abundância, pique populacional de *Tabanus importunus*, espécie com alto potencial vetorial.

Originalmente, no Velho Mundo, o *T. vivax* é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé, enquanto que no Novo Mundo o *T. vivax* conseguiu manter-se na ausência do vetor biológico, adaptando-se à transmissão mecânica por insetos nativos do grupo dos tabanídeos (mutucas) e por *Stomoxys calcitrans* (SILVA et al., 1997; PAIVA et al., 2000). A transmissão mecânica também pode ocorrer de forma iatrogênica (SILVA et al., 1997).

Esse agente etiológico possui a capacidade de parasitar principalmente ungulados, incluindo ruminantes domésticos, silvestres e equídeos (NJIOKOU et al., 2004; PINCHBECK et al., 2008; DUFFY et al., 2009). Desses hospedeiros vertebrados susceptíveis, a tripanossomíase por *T. vivax* tem importância relevante em ruminantes domésticos, pois a infecção por esse parasita causa perdas produtivas e reprodutivas em bovinos, ovinos e caprinos, seguida de manifestações de sinais clínicos e aparecimento de lesões da doença (BATISTA et al., 2007, 2009).

No Brasil, é importante ressaltar as diferenças das características epidemiológicas da tripanossomíase por *T. vivax* verificadas no pantanal e no semiárido nordestino. No pantanal, verifica-se o fato de que animais domésticos dessa região endêmica 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 ao animal, embora possa ter repercussões na produtividade do rebanho (PAIVA et al., 2000). A exposição prévia e constante ao parasita parece ser responsável por conferir esse nível de proteção, já que

animais de regiões não endêmica, como verificado no caso da região semiárida, são altamente susceptíveis e manifestam doença clínica severa durante uma infecção primária, com altos picos parasitêmicos. No entanto, fatores inerentes ao hospedeiro (raça, idade, sexo, prenhes, estado nutricional, estresse de produção e infecções intercorrentes), fatores ambientais, e de manejo animal, são todos de grande importância na prevalência e severidade das manifestações clínicas da doença (BATISTA et al., 2011b).

No entanto não somente no pantanal e no semiárido há relatos de sua existência. A detecção de um caso isolado de *T. vivax* no centro do Rio Grande do Sul, distante das áreas endêmicas do Brasil, sugere que esse parasita pode ter sido introduzido e estar distribuído nessa região há muito tempo, não tendo sido previamente diagnosticado devido ao desenvolvimento, até esse estudo, apenas de quadros clínicos assintomáticos (SILVA ET AL., 2009)

Até recentemente, os estudos sobre *T. vivax* no Brasil foram conduzidos somente em áreas endêmicas, principalmente após surtos de doença aguda, como ocorridos no Pantanal (SILVA et al., 1996; VENTURA et al., 2001; MADRUGA et al., 2006; CORTEZ et al., 2006). 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. Os animais exibiram sintomatologia de febre, letargia, perda de apetite com substancial perda de peso em pouco tempo, fraqueza, lacrimejamento, disenteria e aborto. Alguns animais que estavam na fase crônica por quatro ou seis meses apresentaram edemaciação e severa caquexia (SILVA et al., 1996).

Porém, os relatos recentes de infecção por *T. vivax* em bovinos da Paraíba (BATISTA et al., 2007), Maranhão (GUERRA et al., 2008) e Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008) demonstraram que os veterinários estão mais atentos aos sinais clínicos, que podem ser muito variados, e preparados para fazer o diagnóstico de tripanossomoses.

Na Região Nordeste, o primeiro surto de tripanossomíase por *T. vivax* foi diagnosticado em 2002, no município de Catolé do Rocha, sertão da Paraíba. Os animais afetados apresentaram febre, anemia, perda de peso, hipoglicemia e sinais nervosos caracterizados por incoordenação, tremores musculares, cegueira transitória e ou permanente, hipermetria, além de lesões histológicas caracterizadas por meningoencefalite não-supurativa e malácia (BATISTA et al., 2007). A patogenicidade do isolado foi confirmada através da reprodução experimental da doença em 4 ovinos inoculados com 1ml de sangue contendo

$1,85 \times 10^5$ tripomastigotas. Os animais infectados apresentaram febre, anemia, leucopenia, perda de peso e miocardite (BATISTA et al., 2006).

1.1.1.5 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da tripanossomíase por *T. vivax* é associada a fatores inerentes ao hospedeiro, como susceptibilidade do animal, e também por fatores inerentes ao parasita, como virulência do isolado que pode provocar infecções graves com alterações hematológicas (trombocitopenia e hemólise dos eritrócitos) e migração extravascular do parasita causando danos teciduais severos, como verificados nos testículos, epidídimo, coração e no sistema nervoso central (ANOSA, 1983; BEZERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2011a).

Os sinais clínicos observados em surtos por *T. vivax* em ruminantes domésticos, foram caracterizados por exibirem febre, anemia, letargia, perda de apetite com substancial perda de peso em pouco tempo, fraqueza, lacrimejamento, diarreia, aborto, edemaciação severa, caquexia, sinais nervosos caracterizados por incoordenação, ataxia, tremores musculares, cegueira transitória ou permanente e hipermetria (SILVA et al., 1996; BATISTA et al., 2007).

A anemia geralmente se desenvolve em animais afetados e é seguida pela perda da condição corporal, a diminuição da produtividade e, muitas vezes a mortalidade. Os sinais podem incluir emagrecimento, aumento dos linfonodos, aumento do fígado e do baço, líquido ascítico e hemorragias petequiais. Em animais que morreram durante a fase crônica da doença, encontra-se miocardite e os órgãos linfóides estão geralmente aumentados.

O agente desencadeia uma anemia hemolítica nos estágios iniciais da infecção, que é atribuída a mecanismos imunomediados, apresentando como principais achados clínicos febre, anemia, inapetência, fraqueza progressiva, emaciação, aborto e síndromes hemorrágicas, que podem levar o animal à morte (SCHENK et al., 2001). Paiva et al. (2000) consideraram que, pelas características debilitantes da tripanossomíase, as infecções secundárias podem ocorrer, dificultando o diagnóstico e determinando casos mais graves. Gonzáles et al. (2003) reportaram os riscos de perdas econômicas em decorrência da movimentação de animais suscetíveis, procedentes de áreas livres, para áreas enzoóticas.

Em estudo que relatou aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção por *T. vivax* diagnosticado no Estado do Tocantins, em um rebanho de bovinos composto de 189 animais da raça Brahman provenientes do Estado de São Paulo, Linhares et al. (2006) constatou em

nove animais, sinais clínicos como emagrecimento, edema de barbeta, febre e palidez de mucosa. Embora a tripanossomíase por *T. vivax* não apresente sintomatologia patognomônica, os sinais clínicos observados nos animais do rebanho foram compatíveis com o que consta na literatura referente às infecções naturais (SILVA et al., 1999; PAIVA et al., 2000) e experimentais (PAIVA et al., 2000; SCHENK et al., 2001).

Tanto machos quanto fêmeas acometidos pela tripanossomíase por *T. vivax* apresentam várias desordens reprodutivas quer seja em infecções naturais ou experimentais. Tais alterações são reportadas quase que exclusivamente em ruminantes domésticos, os principais susceptíveis à doença (ANOSA, 1983).

A patogenicidade do isolado foi confirmada através da inoculação experimental do sangue parasitado em uma ovelha, que morreu 83 dias após a infecção (SHAW; LAINSON, 1972).

Quanto ao isolado de *T. vivax* existente no Brasil, sabe-se que está filogeneticamente mais relacionada com o isolado do Oeste Africano que a existente no Leste deste país (CORTEZ et al., 2006). 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, por fatores relacionados ao parasita, tais como: frequência de passagem cíclica ou mecânica e quantidade de tripanossomos inoculados (STEPHEN, 1986).

O curso da infecção experimental por *T. vivax* nos ovinos pode ser dividido em duas fases: a fase aguda, que persiste por aproximadamente duas semanas, caracterizada por parasitemia e febre alta, e a fase crônica, caracterizada por temperatura normal e parasitemia baixa ou ausente. Anemia, leucopenia com linfocitose e ausência de ganho de peso foram observados, também, durante a fase crônica (BATISTA et al., 2006).

Apesar da multiplicação do *T. vivax* ocorrer na corrente sanguínea, o período septicêmico é seguido pela migração extravascular do parasita (GARDINER, 1989). O que influi sobremaneira na fisiopatogenia das lesões inflamatórias e degenerativas descritas no coração (MASAKE, 1980) e sistema nervoso (WHITELAW et al., 1988) de caprinos infectados experimentalmente por *T. vivax*, bem como nos órgãos reprodutivos de carneiros também experimentalmente infectados (BEZERRA et al., 2008).

T. vivax já foi identificado no sistema nervoso central, humor vítreo (WHITELAW et al., 1988) e miocárdio (KIMETO et al., 1990) onde foi apontado como causador de patologias nessas regiões.

Entretanto, alterações hematológicas e nervosas, que podem levar a morte, além de abortos e alterações na reprodução, foram descritas em bovinos, ovinos e caprinos infectados por *T. vivax* (SILVA et al., 1996; BATISTA et al., 2006; 2007; 2008).

O curso da infecção por *T. vivax* varia entre os isolados de parasitos, bem como as espécies e raças de ruminantes hospedeiros (CORTEZ et al., 2006; BATISTA et al., 2006; 2007; 2008). Em bovinos infectados naturalmente com *T. vivax* no Brasil (Pantanal), foram observados sinais clínicos como anemia, leucopenia, lacrimejamento e fraqueza progressiva, marcada por perda de peso e abortos (SILVA et al., 1999). No primeiro surto no Nordeste do Brasil (Paraíba), em gado leiteiro, com diagnóstico de *T. vivax*, os animais infectados apresentaram febre, anemia e perda de peso. Todos os bovinos com sinais nervosos morreram, e outros abortaram ou pariram um bezerro que morreu logo após o parto (BATISTA et al., 2007).

O *Trypanosoma vivax* pode provocar uma doença fatal associada a uma alta e persistente parasitemia (LOSOS; IKEDE, 1972). Resposta imune reduzida, hemorragias e anemias têm sido verificado em bovinos infectados com *T. vivax* (ILRAD, 1984; WHITELAW, 1979). Na forma aguda os animais morrem dentro de cinco semanas (entre 37 e 58 dias, após a infecção experimental) e apresentam alta temperatura, letargia, fraqueza, anemia, leve perda na condição física, lacrimação e diarreia.

Contudo, cada enfermidade pode ser controlada efetivamente com ambos agentes quimioterapêuticos ou quimioproláticos, bem como também o controle dos artrópodes vetores (PEREGRINE, 1994).

1.1.1.6 Alterações hematológicas e bioquímicas

Além de verificada a presença do *T. vivax* em tecidos do hospedeiro vertebrado, o mesmo também se multiplica no sangue, onde encontra todos os elementos necessários para sobrevivência. Durante a infecção, *T. vivax* pode provocar diferentes graus de alterações hematológicas, 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). Gardiner (1989) verificou queda do hematócrito para 9%, cinco semanas após a infecção em bovinos que desenvolveram síndrome hemorrágica quando infectados com um isolado queniano de *T. vivax*. 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 hematócrito em bovinos, infectados com um isolado 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).

Olubayo e Muger (1985) sugerem que a severa trombocitopenia devida ao consumo de plaquetas para a formação de microtrombos induzidos pelo parasita seja o principal fator responsável pela síndrome hemorrágica. Emeribe et al. (1990) observaram que o principal mecanismo indutor de diátese hemorrágica em ovelhas foi a diminuição da agregação plaquetária.

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

Observam-se também 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 uréia, 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).

1.1.1.7 Alterações anatomopatológicas

Quanto às alterações anatomopatológicas ocasionadas por *T. vivax*, entre as 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, no saco pericárdio e aumento de volume dos gânglios linfáticos (STEPHEN, 1986). Importante referir que nessas infecções pode não ocorrer alterações anatomopatológicas, e quando ocorrem são geralmente inespecíficas.

A distribuição e severidade das lesões provocadas por *T. vivax* são similares às de outras tripanossomíases. Comprometimento cardíaco, semelhante ao observado na cardiopatia chagásica humana, caracterizado por acentuado edema intersticial, miocardite mononuclear multifocal, degeneração e necrose de miofibrilas e do tecido de condução do coração foi observado por Masake (1980) em bovinos e caprinos infectados experimentalmente por *T. vivax*. Kimeto et al. (1990), correlacionaram a severidade das lesões inflamatórias com a localização extravascular do parasita.

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 trypanosomas na corrente sanguínea é seguida da invasão do sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano, que resulta em lesões caracterizadas por meningoencefalite não-supurativa e malácia atingindo diversas estruturas que podem ser acompanhadas de sintomatologia nervosa e ocasionalmente óbito (LOSOS; IKEDE, 1972; SEILER et al., 1981; WHITELOW 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 (WHITELOW et al., 1988; BATISTA et al., 2007; 2011b), testículos e epidídimo (BEZERRA et al., 2008). Em infecções com isolados 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; ISOON, 1975; OLUBAYO; MUGERA, 1987; GARDINER et al., 1989). Em conjunto, estas características são as principais causas de morte dos animais (MURRAY et al., 1979).

Em algumas ocasiões, a presença dos tripanossomos na corrente sanguínea é seguida da invasão do sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano, a qual resulta em lesões caracterizadas por meningoencefalite e malácia, atingindo diversas estruturas que podem ser

acompanhadas de sintomatologia nervosa e ocasionalmente óbito. Lesões semelhantes não têm sido descritas na tripanossomíase por *T. vivax* em infecções naturais. No entanto, em infecção experimental, Whitelaw et al. (1988) constataram meningoencefalite em cabras que apresentavam sintomatologia nervosa durante a fase aguda da infecção por *T. vivax*.

A base histológica da lesão provocada pelo *T. vivax* em bovinos é a presença generalizada de trombos de fibrina e êmbolos formados por trypanosomas, 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 acometidas do parasita.

Hemorragias generalizadas das vísceras e superfícies das mucosas são manifestações patológicas importantes em hospedeiros ruminantes que apresentam síndrome hemorrágica durante a fase aguda (MWONGELA et al., 1981; GARDINER et al., 1989).

1.1.1.8 Desordens reprodutivas

A tripanossomíase ainda é, na África, uma das enfermidades que tem maior implicação sobre o processo reprodutivo e produtividade dos rebanhos. Estudos mostram que a tripanossomíase causa uma série de desordens reprodutivas em rebanhos bovinos, como a degeneração do hipotálamo, das glândulas pituitárias e das gônadas, com conseqüentes alterações nas concentrações plasmáticas e nas secreções dos hormônios necessários para a reprodução em ambos os sexos (SEKONI, 1994).

No Pantanal mato-grossense e na Bolívia, Silva et al. (2004) relataram aborto em bovinos e observaram que a anemia acompanhada de aborto no terço final da gestação é um sinal clínico característico da tripanossomíase nessas regiões.

Ovinos e caprinos também podem apresentar aborto quando infectados por *T. vivax*. Osaer et al. (1999) verificaram consideráveis taxas de aborto em caprinos nas áreas do Gambia de risco moderado e alto para tripanossomíase. Em ovinos, os autores observaram um aumento da mortalidade de cordeiros em ambas as áreas, sem contudo, influenciar o ganho de peso desta categoria.

Em touros, *Trypanosoma vivax* produz lesões de vários graus no sistema reprodutor, especialmente no testículo e epidídimo, onde em casos crônicos leva à séria infertilidade podendo culminar com esterilidade (SEKONI et al., 1990; ADAMU et al., 2007).

Sekoni et al. (2004) estudou os efeitos da infecção experimental com *T. vivax* sobre as características do sêmen de zebus. Os autores relataram queda na qualidade do sêmen, manifestada por uma drástica redução da concentração espermática (oligozoospermia ou mesmo azoospermia), diminuição do volume do sêmen, bem como aumento do número de teratozoospermias.

Bezerra et al. (2008) estudaram a anatomopatologia de testículos e epidídimos de ovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. Os animais foram orquiectomizados 30 dias após a infecção. Macroscopicamente os testículos 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.

Em fêmeas bovinas infectadas naturalmente por *T. vivax*, várias desordens reprodutivas já foram reportadas. Aborto, repetição de cio, natimortos ou nascimento de crias fracas e anestro temporário ou permanente são as alterações mais freqüentemente relatadas (SILVA et al., 2004, BEZERRA et al., 2006, BATISTA et al., 2007; 2008).

Além disso, o trypanosoma induz a morte fetal, distocia, abortamento, morte neonatal, e outros efeitos patogênicos no feto e no recém nascido (SEKONI, 1994). O *Trypanosoma vivax* também pode causar aborto em ovinos e caprinos. Osaer et al. (1999) relataram que as taxas de aborto em caprinos eram maiores em áreas de risco moderado e alto para tripanosomíase. Para ovinos, houve aumento da mortalidade de cordeiros em ambas as áreas, sem, contudo influenciar o ganho de peso desta categoria (OSAER et al., 1999).

1.1.1.9 Diagnóstico

O diagnóstico de infecções por *T. vivax* é rotineiramente realizado por métodos parasitológicos, como esfregaços de sangue total e da camada leucocitária, que são pouco sensíveis, particularmente, em animais na fase crônica que apresentam baixa parasitemia.

Existem ainda os métodos de diagnóstico indireto, através da detecção de anticorpos no soro sanguíneo. Esses testes sorológicos são especialmente indicados em inquéritos epidemiológicos quando há infecção subclínica nos rebanhos (EISLER et al., 1998). As reações de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA) são os métodos sorológicos mais comumente utilizados para o diagnóstico de tripanossomíases em seres

humanos e animais, e apresentam sensibilidade variável que na maioria das vezes, não apresentam especificidade suficiente para diferenciar as diferentes espécies de tripanosomos (EISLER et al., 1998; DESQUESNES; TRESSE, 1996; MASAKE et al., 1997), fato que segundo Jones e Dávila (2001) diminui o valor dessas provas na América do Sul, devido a resultados falsos-positivos provocados por reações cruzadas do *T. vivax* com *T. evansi* e *T. theileri*.

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 e na detecção do parasito em tecidos de animais infectados experimentalmente (CORTEZ et al., 2006; 2009; BATISTA et al., 2011a).

Portanto, o diagnóstico deve contar com técnicas diretas que confirmem a presença de trypanosomas quer por visualização microscópica ou por técnicas serológicas indiretas ou por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Clinicamente, a tripanossomíase pode ser confundida com babesioses, anaplasmoses teilerioses hemonchosis, raiva ou intoxicações por plantas. O diagnóstico diferencial é orientado por observações clínicas, a evolução contexto epidemiológico, mas que se baseia essencialmente no diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico direto pode ser realizado pelos métodos do “aspirado” do linfonodo, da gota espessa, da lâmina delgada ou, ainda, pelo método do micro-hematócrito ou técnica de Woo, consistindo na observação direta das formas sangüíneas, reveladas em preparações coradas e examinadas através da microscopia ótica (SILVA; DÁVILA, 1998; SILVA et al., 2002).

Entretanto, muito cuidado deve ser tomado no diagnóstico diferencial de espécies baseado apenas na morfologia de formas do sangue, uma vez que três espécies de trypanosoma podem ser encontradas com frequência em ruminantes no Brasil, muitas vezes em infecções mistas: *T. vivax*, *T. evansi* e *T. theileri*.

Outro fator bastante limitante no diagnóstico de tripanossomoses em bovinos é o número reduzido desses parasitas no sangue, exigindo a utilização de métodos sensíveis e específicos como a PCR para a detecção desses parasitas (VENTURA et al., 2001; DAVILA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003; CORTEZ et al., 2009).

1.1.1.10 Controle e tratamento

O tratamento da tripanosomíase pode ser curativo, usando uma droga que dá pouca ou nenhuma ação residual ou preventiva. A diferença entre cura e prevenção depende da droga que está sendo usada e, em alguns casos, da dosagem que está sendo administrada (SILVA et al., 2004).

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 (Trypamidium), 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).

Contudo, em decorrência da rapidez com a qual os trypanosomas 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 são armazenadas nos tecidos e por uma lenta liberação na corrente circulatória mantém a concentração do composto ativo suficiente para controlar abortos (PEREGRINE, 1994). As drogas curativas são usadas quando a incidência é baixa, quando somente poucos casos ocorrem em um rebanho durante o período de um ano, ou quando o tratamento de poucos casos ocorre principalmente durante uma estação a qual geralmente é a das chuvas.

Durante décadas vários métodos de controle, tais como desmatamento, uso de machos estéreis e armadilhas impregnadas com inseticidas para o controle dos vetores, pulverização de inseticidas nos animais, na vegetação, uso de inseticidas *pour on* e quimioprofilaxia foram tentados na África. Porém, atualmente, apenas a quimioprofilaxia e o controle dos vetores com drogas *pour on* e armadilhas impregnadas com inseticidas continuam sendo usadas.

A quimioterapia é provavelmente o mais importante método pelo qual a tripanosomíase é controlada em animais domésticos. O tratamento e a profilaxia da enfermidade nos bovinos, ovinos e caprinos é correntemente dependente de sais de três compostos: homidium, isometamidium e dimenazene.

Embora o uso de medicamentos possam 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 trypanosoma ao tripanocida é uma ameaça permanente à sua utilização sustentável no controle da tripanossomíase.

1.1.2 Transmissão transplacentária

Estudos recentes vêm investigando a possibilidade da ocorrência da transmissão transplacentária em animais domésticos por protozoários, através de análises histopatológicas de tecidos fetais, órgãos e líquidos fetais (RAZMI et al., 2007; DUBEY, 2009; CHRYSSAFIDIS et al., 2011; WIENGCHAROEN et al., 2011). Esses parasitos são responsáveis pela disseminação e manutenção do patógeno em rebanhos bovinos por várias gerações (BJÖRKMAN et al., 1996). A transmissão dos agentes parece ser mais comum no terço final de gestação, conforme tem sido descritos em vários trabalhos que enfoca essa temática na literatura (ANDERSON et al., 1997; DUBEY, 2009; CHRYSSAFIDIS et al., 2011; WIENGCHAROEN et al., 2011). Geralmente é observada a doença clínica que ocorre na forma de problemas perinatais como abortos, natimortos e animais recém nascidos fracos (URQUHART et al., 1998).

Ensaio realizados para avaliar a probabilidade de transmissão transplacentária por *T. vivax*, em bovinos foram relatados no continente africano e na América do Sul. Nestes estudos encontraram evidências da transmissão congênita causada por *T. vivax* em bovinos de leite, sugerindo que a infecção por esse protozoário pode persistir dentro de uma propriedade leiteira por várias gerações (LOSOS; IKEDE, 1972; OGWU et al., 1986; MENDÉNDEZ; WILLIAN, 1993; BATISTA et al., 2011b). Especula-se que a transmissão transplacentária pode causar abortamento, prematuridade, retardo de crescimento intra-uterino, nati e mortalidade perinatal (LOSOS; IKEDE, 1972; OGWU et al., 1986), no entanto pode ocorrer o nascimento de animais com aspecto clínico normal, porém cronicamente infectado. BATISTA

et al. (2011b) reportam que bezerros nascidos de mães infectadas mostram sinais clínicos em cerca de dois a cinco dias após o parto; observaram ainda alta taxa de mortalidade e letalidade da doença nos bezerros neonatos, tendo sido verificado no exame histopatológico miocardite e hiperplasia de polpa branca, mostrando a importância do estudo desta enfermidade nos ruminantes criados no semiárido brasileiro.

OGWU et al. (1986) confirmaram a ocorrência da transmissão transplacentária de *T. vivax* em bovinos através da detecção de alta parasitemia em um bezerro nascido de uma vaca infectada no terceiro trimestre da gestação. Na Venezuela, MELENDEZ et al. (1993) também observaram transmissão congênita em um bezerro, onde se detectou parasitemia e anticorpos anti- *T. vivax* através de imunofluorescência indireta.

1.1.3 Placenta

1.1.3.1 Funções da placenta

Define-se placenta como um órgão transitório formado por tecidos maternos e fetais, com a função de transportar substâncias nutritivas do organismo materno para o feto, bem como promover trocas metabólicas e desempenhar funções endócrinas quanto à produção de hormônios na manutenção da gestação (LEISER; KAUFMANN, 1994). A placentação consiste na forma com que as membranas fetais vêm a se desenvolver e a se associarem ao endométrio (BJORKMAN, 1976).

A placenta de diferentes espécies exibe uma grande diversidade de estruturas que incluem diferentes organizações, quanto ao tipo celular, forma e modelo de distribuição sobre o endométrio. Assim a placenta pode ser classificada mediante sua forma, a interdigitação materno-fetal e o grau de separação entre as membranas materno-fetal (KAUFMANN, 1983).

A placenta dos mamíferos eutéricos é uma estrutura que se forma pela aposição de membranas fetais e tecidos maternos onde a principal função consiste em regular a troca fisiológica entre o feto e a mãe (NODEN; DE LA HUNTA, 1990). É considerado um órgão de nutrição responsável pelo desenvolvimento do embrião e pela viabilidade do recém-nascido (SCHOENAU et al., 2005).

1.1.3.2 Estrutura geral placentária

No processo de desenvolvimento da placenta estão relacionadas quatro estruturas membranosas: o córion, o âmnio, o saco vitelino e o alantóide (LEISER; KAUFMANN, 1994). O cordão umbilical é o anexo fetal que une o feto à placenta, apresentando no seu interior os vasos umbilicais, que são responsáveis pelas trocas sanguíneas entre os organismos fetal e materno (MICHEL; SCHWARZE, 1970).

A funcionalidade desta depende do fluxo sanguíneo entre as circulações materna e fetal e desta forma com a vascularização. Os vasos do funículo umbilical dividem-se no ponto de implantação da placenta em vasos coriônicos. Estes percorrem as porções placentárias dos cornos uterinos em direção as suas extremidades. Neste percurso, que é mais curto nos vasos que se dirigem ao lado gestante, emitem perpendicularmente ramos que suprem as regiões cotiledonária e intercotiledonária (SCHOENAU et al., 2005).

Para TSUTSUMI (1962), as artérias e veias umbilicais quando chegam no córion vão para a direita e para a esquerda, seguindo para as extremidades dos cornos uterinos ao longo do lado mesometrial da mucosa uterina. PELAGALLI et al. (1973) relataram que a artéria da porção da placenta dirigida ao corno gestante é de maior calibre que aquela dirigida ao do corno não gestante.

Segundo KAUFMANN (1983), o suprimento de oxigênio da placenta afeta o crescimento e sua diferenciação, onde em situação de hipóxia a entrada de oxigênio fetal é facilitada pela expansão do leito capilar viloso através de angiogênese, de forma que a disposição paralela das hastes reflete uma condição de aporte adequado de oxigênio para o feto.

As hastes vasculares emitem perpendicularmente arteríolas em seis a oito ordens ou vênulas em maior número. As arteríolas dos vilos terminais se desdobram em alças capilares e se anastomosam com vênulas situadas na base do vilo. Estas alças apresentam às vezes a forma de leque, característica dos ruminantes. (SCHOENAU et al., 2005)

1.1.3.3 Placenta de ruminantes

A placenta de ruminantes é formada por placentomas, que são estruturas numerosas com tamanhos e formas variadas, são caracterizadas pela presença de um tufo de vilosidades

fetais conhecida como cotilédones e por invaginações criptiformes reunidas no útero que são as carúnculas uterinas (PINTO, 2002).

As vilosidades coriônicas apresentam-se agrupadas em determinadas regiões e denominam-se cotilédones. A cada cotilédone corresponde a uma região modificada do endométrio uterino, denominada carúncula, que são projeções da mucosa uterina. O conjunto formado por um cotilédone e uma carúncula, recebe o nome de placentoma. Entre os placentomas o coriôn dos ruminantes não apresenta vilosidades. Estas carúnculas são convexas na vaca e côncava na ovelha e cabra (BENESCH, 1963).

A passagem e a troca de nutrientes da mãe para o feto são realizadas por meio dos vilos placentários (MAYHEW, 2002).

A placenta dos ruminantes foi incluída na categoria sindesmocorial devido a perda do epitélio uterino materno, fazendo com que o cório esteja em contato com um sincício materno-fetal e não com tecido conjuntivo. No entanto o termo mais apropriado seria sinepiteliocorial, devido o resultado da migração e fusão das células binucleadas do trofoblasto com as células do epitélio uterino (WOODING, 1992).

Na maioria dos mamíferos, as interdigitações estão concentradas em áreas específicas, tendo, assim, a placenta cotiledonária, típica nos ruminantes (LEISER; KAUFMANN, 1994).

1.1.3.4 Placenta de ovinos

A placenta é um órgão passível de adaptação, variável nas diferentes espécies e que pode variar inclusive dentro da mesma espécie (SCHOENAU et al., 2005).

LEISER et al. (1998) relataram ainda que o cotilédone ovino era constituído de um aglomerado de longas árvores vilosas ramificadas de forma cilíndrica. A forma das árvores vilosas no cotilédone é a de um cilindro, podendo às vezes se parecer com a de um cone.

A placenta ovina apresenta 187 arranjos artério-cotiledonários diferentes, formados por grupos de placentônios, envolvidos com um ou mais ramos cotiledonários, onde os arranjos envolvendo apenas um ramo cotiledonário são mais freqüentes. As anastomoses coriônicas são mais comuns entre as veias coriônicas (83,87%) e ocorrem com menor freqüência entre as artérias coriônicas (16,12%). As anastomoses arteriais acontecem entre ramos cotiledonários e através de cotilédones (SCHOENAU et al., 2005).

Os tipos placentários podem ser classificados em níveis complementares que refletem diversas características placentárias, tais como a origem e tipos das membranas, forma, interdigitação materno-fetal, interrelação do fluxo sanguíneo materno-fetal, camadas teciduais da barreira materno-fetal, invasão trofoblástica e reação de decidualização celular, formação de sinciotrofoblasto e separação placentária ao nascimento (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Nos ovinos, o componente fetal da placenta é formado a partir da fusão do córion avascular e o alantóide vascular. Isso aumenta a área de superfície de contato entre a mãe e o feto através do desenvolvimento de projeções das vilosidades, que são agrupados em áreas distintas, conhecido como cotilédones. Diante disso, a placenta dos ovinos é classificada como sendo corioalantóideana, com vilosidades e cotiledonar (SAMMIN et al., 2009).

Em ovinos, a implantação e a placentação superficial começam por volta dos 15° - 16° dias (REGNAULTA et al., 2002). Nas ovelhas, o endométrio é composto por duas áreas distintas – uma área aglandular caruncular e uma glandular intercaruncular. As áreas de caruncula possuem epitélio endometrial e um compacto estroma como locais de implantação e placentação superficial. No 16° dia, o trofoblasto começa a aderir firmemente à parede endometrial. A interdigitação do trofotoderma e endométrio ocorre em ambas as áreas (caruncular e intercaruncular). A adesão do trofotoderma ao endométrio progride ao longo do corno uterino e parece ser concluído por volta do 22° dia (SPENCER et al., 2004).

Existem uma variedade de proteases e seus inibidores que regulam a remodelação do endométrio e a invasão do trofoblasto neste endométrio durante a gestação. Estudos recentes estabeleceram vários tipos de cisteína, presentes no útero e placenta de ovelhas gestantes e de inibidor da protease (SONG et al., 2007).

Em ovinos, a densidade vascular materna de tecidos placentários aumentam substancialmente a partir do 40° dia até a metade da gestação, e mais lentamente em seguida. No entanto, a densidade vascular dos cotilédones fetais permanecem relativamente constante até metade da gestação, e aumentam drasticamente depois (PAWEL et al., 2007). A formação de novos vasos ocorrem através da vasculogênese e da angiogênese, ambos os processos são regulados por promotores e inibidores, sendo cruciais para a formação da placenta e da manutenção da gravidez. (KLAGSBRUN; AMORE 1991; REYNOLDS et al., 1992).

O peso máximo da placenta dos ovinos é conseguido por volta dos 90 dias de gestação. Posteriormente, a crescente demanda do feto durante a fase de crescimento exponencial são atendidas através do aumento do transporte sanguíneo útero-umbilical. Isto é

conseguido através do aumento do leito capilar materno associado à elevação no número de ramificação e a uma maior área de superfície da microvasculatura fetal (REYNOLDS et al., 2005).

Um nutriente necessário para o desenvolvimento do feto é a glicose, que atravessa facilmente a barreira placentária através de transportadores de glicose (GLUT's) que consistem em glicoproteínas que medeiam, por difusão, este transporte por meio das membranas plasmáticas (KNIPP et al., 1999). Duas formas isómeras destas glicoproteínas (GLUT 1 e GLUT 3) foram identificadas na placenta de ovinos e afirmam-se que estejam localizadas nas células coriônicas epiteliais (trofoblasto) e nas células que fazem a interface materno-fetal (EHRHARDT; BELL, 1997; DAS et al., 1998). Estudos mais recentes apontam para a presença de outra glicoproteína presente na placenta de ovinos (GLUT 8), estando também localizada nas células epiteliais e coriônicas e sugerindo sua participação no transporte de glicose principalmente ao final da gestação, onde é aumentada a demanda de glicose pelo conceito (LIMESAND et al., 2004).

Os placentomas dos ovinos geralmente são de forma côncava, mas ocasionalmente podem apresentar-se convexo, assim como os placentomas de bovinos (SAMMIN et al., 2009).

O GH foi detectado na placenta ovina durante as fases iniciais e metade da gestação com aparecimento predominante de expressão ocorrendo entre 35º e 55º dia de idade gestacional (LACROIX et al., 1999).

As ovelhas possuem dois genes do hormônio do crescimento (GH): oGH-1 e oGH-2. O oGH-2 tem alelos múltiplos (oGH- 2N e oGH-2Z) (GOOTWINE et al., 1993). A expressão do gene oGH-2 tem sido detectada na placenta de ovinos (LACROIX et al., 1999) e pode-se inferir que tanto o N e Z-alelos do gene são expressos (OFIR; GOOTWINE 1997).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

1.2.1.1 Investigar o efeito da infecção experimental com *T. vivax* em ovelhas no início e final da gestação, e confirmar a transmissão transplacentária pela reação em

cadeia da polimerase (PCR) através da presença do DNA do parasita na placenta e tecidos de fetos abortados.

1.2.2 Específicos

1.2.2.1 Verificar a possibilidade de transmissão transplacentária em neonatos de ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax*.

1.2.2.2 Acompanhar a evolução clínica-patológica da infecção experimental de ovelhas prenhas.

1.2.2.3 Verificar a associação entre as alterações anatomo-histopatológicas das placentas, anexos e tecidos fetais com a presença do *T. vivax* nesses tecidos.

1.2.2.4 Identificar através da técnica Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a presença do DNA do *Trypanosoma vivax* na placenta e anexos de ovelhas prenhas infectadas.

1.3 REFERÊNCIAS

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.

ANDERSON, M. L.; REYNOLDS, J. P.; ROWE, J. D.; SVERLOW, K. M.; PACKHAM, A. E.; BARR, B. G.; CONRAD, P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 210, n. 8, p. 1169-1172, 1997.

AMARO FILHO J. 1991. *Contribución al estudio del clima del Rio Grande do Norte*. Madrid: ETSIA/UPM. 311p. (Tese doutorado).

ANOSA, V. O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. Review Article. **Veterinary Medical**, v. 30, p. 717-741, 1983.

ANOSA V. O. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomosis. Parts I and II. Revue Élevage Méd.Vét. **Pays Tropicaux**, v. 41, p. 151-164, 1988.

BARROS, T.; FOIL, L. Seasonal occurrence and relative abundance of Tabanidae (Diptera) from the Pantanalregion. **Mem. Entomol. Int**, v.14, p.387-396, 1999.

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. 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, 2011a.

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**. 2011b.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C. L.; REBOUÇAS, R. E. S.; BEZERRA, F. S. B.; GARCÍA, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitol Res**, v. 110, p. 73–80, 2012.

BENESCH, F. **Tratado de obstetrícia y ginecología veterinárias**. Barcelona: Editorial Labor S.A., 1963. p. 56-57.

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.

BJÖRKMAN, N. **Placentation**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1976.

BJÖRKMAN, C.; JOHANSSON, O.; STELUND, S.; HOLMDAHL, O. J. M.; UGGLA, A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 208, p. 1441-1444, 1996.

BOULHOSA, J. **Informação científica**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1946. p.21-26. (Boletim Técnico).

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.

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.

CHRYSSAFIDIS, A. L.; SOARES, R. M.; RODRIGUES, A. A. R.; CARVALHO, N. A. T.; GENNARI, S. M. Evidence of congenital transmission of *Neospora caninum* in naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetus from Brazil. **Parasitol Res**, v. 108, p. 741–743, 2011.

CURRASON, L. **Traité de protozoologie vétérinaire et comparée**. Paris: Vigot Fréres, 1943.

CORDOVES, C. O.; FERNANDEZ, C.; GARCIA, A. J.; GONZALEZ, B. R. *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905). Lista de transmisores mecánicos en Cuba. **Rev Cub de Cien Vet**, v. 13, p. 219-221, 1982.

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.

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.

DAS U. G.; SADIQ H. F.; SOARES M. J.; HAY JÚNIOR W. W.; DEVASKAR S. U. Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 339-47, 1998.

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.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Morphological and Biometrical Differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 357-358, 1997.

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

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. **Revue D'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 49, p. 322-327, 1996.

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.

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.

EMBRAPA. **Projeto plataforma regional do agronegócio ovinocaprinocultura**. Ceará. 2002. 49 p.

EMERIBE, A. O. et al. Plaqueta aggregation inhibition in *Trypanosoma vivax* infection of sheep. **Cen. Afr. Jou. Med.**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 1990.

EHRHARDT R. A.; BELL A. W. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 1132-41, 1997.

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

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patologia Clínica Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, 1981. 279p.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. **Vet Parasitol**, v.16, p. 89–103, 2009.

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, n. 13, p. 1475 -1483, 2009.

EISLER, M. C. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. **Vet Parasitol**, v.79, p.187-201, 1998.

GALIZA, G. J. N. ; GARCIA, A. H. ; ASSIS, A. C. ; OLIVEIRA, D. M. ; PIMENTEL, L. A. ; DANTAS, A. F. M. ; SIMOES, S. V. D. ; TEXEIRA, M. M. G. ; RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 359-363, 2011.

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.

GARDINER, P. R.; ASSOKU, R. K. G.; WHITELOW, 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.

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 prophylactic effects of isometamidium and ethidium using sustained release devices. **Proceedings of the first internet conference on salivarian trypanosomes**, p. 36-38, 1997.

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

GONZALES, J. L.; JONES, T. W.; PICOZZI, K.; CUELLAR, H. R. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolivia. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, n. 8, p. 1-14, 2003.

GOOTWINE, E.; SISE, J. A.; PENTY J. M.; MONTGOMERY, G. W. The duplicated gene copy of the ovine growth hormone gene contains a PvuII polymorphism in the second intron. **Animal Genetics**, v. 24, p. 319–321, 1993.

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.

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.

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

ILRAD. Anaemia in trypanosomiasis: haemorrhagic *T. vivax* may provide a clue. **Reports**, v.2, n.4, p. 399, 1984.

ILRAD. International Laboratory for Research on Animal Diseases. **Annual report of the international laboraratory for reseach on animal diseases**, Nairobi, Kenya, p. 24-66, 1989.

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

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.

KADIMA, K. B. et al. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. **Vet. Arh.**, v. 70, n. 2, p. 67-74, 2000.

KAUFMANN, P.; Vergleichend-anatomische und funktionelle: Aspekte des placenta – Baues, Funkt. **Biol. Med.** v. 2, p. 71–79, 1983.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. v. 1, p. 441-484.

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.

KLAGSBRUN M.; AMORE P. A. Regulators of Angiogenesis. **Anual Review of Physiology**, v. 53, p. 217–239, 1991.

KNIPP G. T.; AUDUS K. L.; SOARES M. J. Nutrient transport across the placenta. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 38, p. 41-58, 1999.

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

LACROIX, M. C.; DEVINOY, E.; CASSY, S.; SERVELY, J. L.; VIDAUD, M.; KANN, G. Expression of growth hormone and its receptor in the placental and feto–maternal environment during early pregnancy in sheep. **Endocrinology**, v. 140, p. 5587–5597, 1999.

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.

LEISER, R., KAUFMANN, P. Placental structure: In a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**. v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LEISER, R. et al. Feto-maternal anchorage in epithelichorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. **Trophoblast Research**, n. 12, p. 21-39, 1998.

LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. Minneapolis: Burgess, 1973. 406p.

LIMESAND, S. W.; REGNAULT, T. R. H.; HAY JÚNIOR W. W. Characterization of glucose transporter 8 (GLUT8) in the ovine placenta of normal and growth restricted fetuses. **Placenta**, v. 25, p. 70-77, 2004.

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.

LOSOS G. J. **Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals**. Longman Scientific and Technical, Harlow Essex, 1986. 938p.

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.

MARTINS, C. F.; MADRUGA, C. R.; KOLLER, W. W.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; MELO, E. S. P.; RIOS, L. R.; ALMEIDA, R. C. F.; LIMA JR, M. S. C.; BARROS, A. T. M.; MARQUES, L. C. *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesq.Vet. Bras.**, v.28, p. 51-56, 2008.

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.

MAYHEW, T. M. *Fetoplacental angiogenesis* during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. **Placenta**, v. 23 p. 742–750, 2002.

MAXIE, M. G.; LOSOS, G. J.; TABEL, H. Experimental bovine tripanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *Trypanosma congulense*) I. Symptomatology and clinical pathology. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 30, p. 274-282, 1979.

MELÉNDEZ M. F.; WILLIAM, F. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Parasitology**, v. 7, p. 293–294, 1993.

MELÉNDEZ, R. D.; FORLANO, M.; FIGUEROA, W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Trypnews**, n. 2, p. 4-5, 1995.

MICHEL, G.; SCHWARZE, E. **Compendio de anatomia veterinária**. Acribia: Zaragoza,

1970. p. 136-143.

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**. Banjul, The Gambia, 1979.

MURRAY V. M.; CLARKSON M. J. Characterization of stocks of *Trypanosoma vivax*. I. Isoenzyme studies. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v. 76, p. 283-292, 1982.

MURRAY M.; TRAIL J. C. M.; Genetic resistance to animal trypanosomiasis in Africa. **Prev. Vet. Med**, v. 2, p. 541-551, 1984.

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

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.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Acribia : Zaragoza, 1990. 399p.

OFIR, R.; GOOTWINE, E. Ovine growth hormone gene duplication– structural and evolutionary implications. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 770–772, 1997.

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.

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 de haemorrhages in *Trypanosoma vivax* in cattle. I. Disseminated intravascular coagulation. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 33, n. 3, p. 211-217, 1985.

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. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. **Acta Trop**, v. 49, p. 73-76, 1991.

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.

PAWEL, P.; BOROWICZ, D. R.; ARNOLD, M. L. J.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; DALE, A.; REYNOLDS, L. P. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression. **Biology of reproduction**, v. 76, p. 259–267, 2007.

PELAGALLI, G. V.; MASTRONARDI, M.; POTENA, L. La circolazione placentare in alcuni ruminanti. **Acta Medica Veterinaria**, v. 1, p. 1-2, 1973.

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.

PINTO, L. M. **Caracterização da célula binucleada na placenta de vacas nelore (*Bos indicus*-Linnaeus, 1758)**. 2002. 87p. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina veterinária da universidade de são paulo, São Paulo, 2002.

RADOSTITS, O. M; Gay, C. C; BLOOD, D. C; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAZMI, G. R.; MALEKI M.; FARZANEH N.; GAROUSSI M. T.; FALLAH A. H. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. **Parasitol Res**, v. 100, p. 755–757, 2007.

REGNAULTA, T. R. H.; GALANB, H. L.; PARKERA, T. A.; ANTHONYA, R. V. Placental Development in Normal and Compromised Pregnancies—A Review. **Placenta**, v. 23, p. 119-129, 2002.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; VONNAHME, K. A.; JOHNSON, M. L.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A., CATON, J. S. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. **The Journal of Physiology**, v. 565, p. 43–58, 2005.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 698–708, 1992.

RODRIGUES, A. C. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma* (Megatrypanum) theileri: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v.116, n.3, p.185-207, 2003.

SAMMIN, D.; MARKEY, B.; BASSETT, H.; BUXTON, D. The ovine placenta and placentitis-A review. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 90–97, 2009.

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.

SCHENK, M. A. M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 157-161, 2001.

SCHOENAU, L. S. F.; PINTO, L. M.; PEREIRA, F. T. V.; SCHOENAU, W.; MIGLINO, M. A. Aspectos anatômicos da macro e microvascularização da placenta em ovinos (*Ovis aries*) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 405-413, 2005.

SCHUNEFELD, A.; RUTTCHER, 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.

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. 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.

SERRA-FREIRE, N. M. Reavaliação dos focos de *Trypanosoma vivax* Ziemann 1905 em bovinos e bubalinos do Território Federal do Amapá (TFA). **Revista da Faculdade de Veterinária da UFF**, v.1, n.1, p.41-45, 1983.

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

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, R. et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 5, p. 561-562, 1996.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle, p.123-145 In: KESSLER R. H.; SCHENK M. A. M. Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. **Embrapa Gado de Corte**, Campo Grande, MS, 1998.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle**. 1. ed., Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 141 p.

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**. Documentos 75, Embrapa Pantanal, Corumbá, 2004. 30p.

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.

SONG, F. W. G.; BAZER, T. E. SPENCER differential expression of cathepsins and cystatin c in ovine uteroplacental tissues. **Placenta**, v. 28, p. 1091-1098, 2007.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, p. 657-668, 2004.

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

TSUTSUMI, Y. The vascular pattern of the placenta in farm animal. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v. 52, p. 372-482, 1962.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 86-87.

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 Goats. **Journal Animal Science**, v. 69, p. 1667-1677, 1991.

WELLS, E. A.; RAMIREZ, L. E.; BETANCOURT, A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: Interpretation of field results. **Tropical Animal Health and Production**, v.14, p.141-150, 1982.

WIENGCHAROEN, J.; THOMPSON, R. C. A.; NAKTHONG, C.; RATTANAKORN, P.; SUKTHANA, Y. Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*? **Parasitol Res** v. 10, p. 1235–1241, 2011.

WHITELAW, D. D. Immunosuppression in bovine trypanosomiasis: Studies with louping-ill vaccine. **Research in Veterinary Science**, v.26, p.10-107, 1979.

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.

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 101–113, 1992.

2. CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS EM OVELHAS INFECTADAS POR *Trypanosoma vivax* NO INÍCIO E FINAL DA GESTAÇÃO

2.1 RESUMO

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovelhas em diferentes fases da gestação, determinar a patogênese das falhas reprodutivas, e confirmar a transmissão transplacentária por PCR. Foram utilizadas 12 ovelhas prenhas, adultas em três grupos experimentais G1, formado por três ovelhas infectadas no terço inicial da gestação; G2, composto por três ovelhas infectadas no terço final da gestação; e G3, constituído por seis ovinos não infectados (grupo controle). Cada ovino do G1 e G2 foi inoculado com $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas. Exames clínicos, avaliação do hematócrito, bioquímica sérica, determinação da concentração plasmática de progesterona e parasitemia foram determinados diariamente. Foram realizados exames anatomopatológicos dos fetos, placenta, cordão umbilical e pesquisa de DNA do parasita na placenta, líquido amniótico, sangue e tecidos dos fetos. A parasitemia foi alta, alcançando picos de $2,7 \times 10^6$, sendo persistente durante todo o período experimental. A infecção foi caracterizada por mortalidade das ovelhas e mortalidade perinatal no terço inicial; aborto e mortalidade perinatal no terço final da gestação. Os fatores possivelmente relacionados com as falhas reprodutivas maternas foram baixos escore corporal, hematócrito, níveis séricos de glicose, proteína total, colesterol e progesterona. A presença do DNA do *T. vivax* no sangue e tecidos de fetos, placenta e líquido amniótico, confirma a transmissão transplacentária do parasita. A presença de lesões histológicas nos órgãos fetais e placenta sugerem a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos.

Palavras-Chaves: aborto, PCR, ovelha, transmissão transplacentária, *trypanosoma*.

2.2 INTRODUÇÃO

Tripanossomíase é uma doença provocada pelo protozoário do gênero *trypanosoma*, que tem uma ampla distribuição e importância econômica em países africanos, principalmente nas regiões ocupadas por seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé (GARDNER et al., 1989). Na África Ocidental, o *Trypanosoma vivax* é considerado o mais importante hemoparasito patogênico de gado, causando desordens reprodutivas. A adaptação da transmissão mecânica por dípteros como *Stomoxys* spp e *Tabanus* spp tem sido responsável pela disseminação do *T. vivax* na América do Sul (DÁVILA; SILVA, 2000; SILVA et al., 2002). Assim, a presença do *T. vivax* em bovinos já foi relatada na Guiana Francesa (LEGER; VENN, 1919), na costa

atlântica da Colômbia (ZAPATA, 1931; OTTE et al., 1994) e Bolívia (SILVA et al., 1998; DÁVILA; SILVA, 2000).

Vários estudos têm mostrado que a tripanossomíase por *T. vivax* encontra-se em ampla expansão no Brasil, tendo sido diagnosticado de Norte a Sul do país (SERRA FREIRE, 1981; SILVA et al., 1996; PAIVA et al., 2000; LINHARES et al., 2006; GUERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2007; 2009; SILVA et al., 2009; CUGLOVICI et al., 2010; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012).

BATISTA et al. (2012) relataram a prevalência de infecção por *T. vivax* na região semi-árida brasileira 46,6% e 80% em vacas leiteiras e bezerros, respectivamente. No entanto, em cabras e ovelhas criadas extensivamente na mesma região, a prevalência alcançou 29,7% e 25,4%, respectivamente (BATISTA et al., 2009). Na região semiárida do Nordeste do Brasil, a infecção por *T. vivax* foi caracterizada pelas taxas de parasitemia elevadas associadas aos sinais clínicos da doença, alta mortalidade e perdas econômicas. O parasita também tem sido implicado como um importante agente de doença reprodutiva em gado leiteiro, ovinos e caprinos, promovendo a repetição do cio, aborto, anestro, natimortos e crias fracas (BEZERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2007; 2008; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012).

Em um surto de tripanossomíase com alta mortalidade em ovelhas criadas extensivamente que ocorreu em uma região não-endêmica no Nordeste do Brasil, Galiza et al. (2011) observaram que a mortalidade perinatal devido a abortos e mortes neonatais chegou a quase 75%. A mortalidade perinatal foi também uma das principais manifestações durante os surtos que ocorreram em fazendas localizadas na região semiárida brasileira, especialmente no estado da Paraíba. Os autores sugerem que a transmissão transplacentária tem importância epidemiológica para a manutenção e propagação de doenças nos rebanhos infectados de ruminantes (BATISTA et al., 2012).

Embora existam evidências do efeito negativo da tripanossomíase causada por *T. vivax* sobre a reprodução de ruminantes, ainda existem lacunas que precisam ser esclarecidas sobre a patogênese das falhas reprodutivas durante a gestação. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da infecção experimental com *T. vivax* em ovelhas em diferentes fases da gestação, determinar a patogênese do aborto, e confirmar a transmissão transplacentária pela reação em cadeia da polimerase (PCR) através da presença do DNA do parasita na placenta e tecidos de fetos abortados.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Delineamento dos grupos experimentais

Foram utilizadas 12 ovelhas, prenhas, sem raça definida, com idade de aproximadamente 24 meses. Os animais foram alojados em campo da UFERSA, Mossoró/RN, cujas coordenadas geográficas são 5°11' de latitude sul e 37°20' de longitude oeste. O clima da região, segundo a classificação de Koppen, é seco e quente, apresentando temperatura média anual de 27°C (AMARO FILHO, 1991) em baias teladas e separadas por grupo no setor de ovinocaprinocultura, onde funciona o núcleo de estudos e pesquisa em pequenos ruminantes da Universidade Federal Rural do Semiárido (Figura 2).



Figura 2: Baias teladas para alojar os animais dos grupos experimentais.

Foram realizados exames ultrassonográficos com equipamento de ultrasson GE Logiq Pro 100 (GE Medical System, Wisconsin, USA) acoplado a um transdutor convexo de 3.5 MHz para verificar o estágio de gestação, ressaltando-se que a gestação foi dividida em duas fases distintas (até os 90 primeiros dias e de 90 a 150 dias de gestação).

Antes de serem inoculados, os animais foram submetidos a exames clínicos, hematológicos e bioquímicos; foi realizado o PCR; pesados e desparasitados. Permaneceram por duas semanas em observação e, constatada a higidez, realizou-se a composição dos grupos experimentais.

Após constatada a higidez dos animais, eles foram distribuídos entre o grupo infectado por *T. vivax* no terço inicial da gestação G1 (ovino 1, 2 e 3); grupo infectado por *T. vivax* no terço final da gestação, G2 (ovino 4, 5 e 6) e grupo controle, composto por seis ovinos não infectados por *T. vivax* G3 (ovino 7, 8, 9, 10, 11 e 12). Todos os animais foram submetidos a condições de manejo idênticas, água e sal mineral *ad libidum*, alimentados com capim tifton e suplementados com ração comercial na quantidade de 1,5% de peso do animal.

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

O isolado de *T. vivax* que foi empregada na infecção experimental das ovelhas prenhas foi proveniente de um surto de infecção natural em ovinos, no município de São João do Rio dos Peixes, Paraíba/PB. O sangue foi colhido em um tubo com ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 10%. Foi acrescentado 8% de glicerol e armazenado em palhetas de 0,5ml, submetido ao congelamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Imediatamente antes da inoculação, foi realizado o descongelamento do isolado criopreservado. Em cada animal dos grupos infectados foi inoculado por via intravenosa 1ml de sangue contendo aproximadamente $1,25 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. vivax*, estimados de acordo com o método de BATISTA et al. (2007).

2.3.3 Determinação da parasitemia

A parasitemia foi determinada diariamente mediante a pesquisa do trypanosoma no sangue colhido 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).

2.3.4 Exames clínicos, escore corporal das ovelhas e peso dos recém-nascidos e fetos abortados

Foi realizado exame clínico diariamente nas ovelhas, avaliação da temperatura retal, aspectos das mucosas e análise dos linfonodos periféricos, também foram examinadas para saber se havia sinais de parto ou aborto. O escore corporal foi determinado semanalmente utilizando uma escala de 0 (para animais muito magros) a 5 (para animais gordos) (FREITAS JÚNIOR et al., 2008). No início do experimento, todas as ovelhas foram classificadas com escore corporal entre 3,5 a 4. Imediatamente após o parto ou aborto, recém-nascidos e fetos foram medidos e pesados com uma balança eletrônica digital.

2.3.5 Avaliação do hematócrito, bioquímica sérica e análise de progesterona

Concomitante aos exames clínicos e determinação da parasitemia foi colhido sangue, através de punção da veia jugular, acondicionados em tubos esterilizados contendo 1mg/ml de EDTA para determinação do hematócrito e colheita de sangue para análise de bioquímica sérica (proteína, albumina total, glicose, colesterol e uréia), utilizando-se kits comerciais (Katal, Belo Horizonte, MG) e um analisador automático SBA-2000 (Celm, Barueri, SP).

Amostras de sangue foram coletadas em intervalos semanais através de punção da veia jugular, e colocados em tubos de Vacutainer estéreis, sendo a progesterona plasmática avaliada pelo método imunoenzimático (Immulite 2000, PRG, Progesterona, Siemens Healthcare Diagnostics Products Limited).

2.3.6 Estudo histopatológico

O exame histopatológico foi realizado através de fragmentos de fetos abortados, e natimortos (órgãos torácicos, abdominais e sistema nervoso central) placenta e cordão umbilical, foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina, cortados a 5 µm e corados com hematoxilina e eosina.

2.3.7 Diagnóstico de *T. vivax* por PCR

O sangue dos neonatos foram colhidos nas primeiras seis horas de vida, sendo 1ml de sangue total misturados a 1ml de álcool a 99%. Também colheu-se 1 ml de fluido de líquido amniótico onde foram acondicionados em microtubos.

Fragmentos de cerca de 1 cm³ de placenta, cordão umbilical, órgãos de fetos abortados ou recém-nascidos (coração, fígado, rins, pulmões, testículo, baço, e córtex cerebral) foram conservados em etanol 99%.

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 177 pb (pares de base), que também é observado no DNA de *T. vivax* (isolado de Catolé do Rocha, Paraíba, nordeste do Brasil), que foi utilizado como controle positivo e para controle negativo foram selecionados previamente amostras de DNA do sangue de ovelhas prenhas não infectadas (CORTEZ et al., 2009).

2.3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão avaliados pelos programas estatísticos SAS (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA) versão 9.0 e SigmaPlot for Windows (Systat Software) versão 12.0. Primariamente, os dados foram avaliados quanto a normalidade por Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) e homocedasticidade por Levene. Diferença estatística entre os valores dos grupos infectados G1,G2 e seus respectivos controles foram calculados quando normais por teste t independente e não normais por Mann-Whitney. A análise da parasitemia e temperatura pelos diferentes períodos foi feita por análise de variância (One Way ANOVA) para medidas repetidas seguida por Tukey quando obteve-se dados normais e Friedman para não normais. Verificou-se a correlação entre as variáveis, de acordo com a normalidade, por Pearson e Spearman. O comportamento das

mesmas no decorrer dos dias, foi quantificado por análise de regressão. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Parasitemia

O *T. vivax* foi detectado pela primeira vez no sangue periférico por volta do terceiro dia pós-infecção (dpi) nos grupos G1 e G2 (Figura 3). A parasitemia aumentou progressivamente, alcançando picos no 13 e 15 dpi nas ovelhas dos G1 e G2, respectivamente. Após este período, uma discreta diminuição nos valores médios para a parasitemia, embora permanecendo elevado durante todo o período experimental em ambos os grupos.

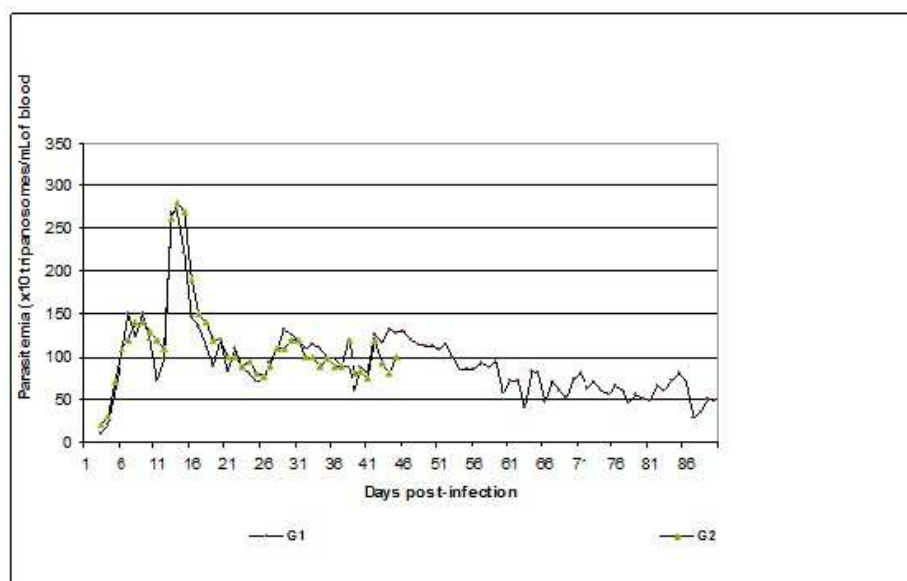


Figura 3: Valores médios das parasitemias ($\times 10^5$ tripanossomas/ml de sangue) em ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax* nos terço inicial da gestação (G1), terço final da gestação (G2), durante o período de observação.

2.4.2 Sinais clínicos e alterações reprodutivas

As ovelhas dos grupos G1 e G2 apresentaram aumento da temperatura retal entre o 6 e 24 dpi, tendo uma máxima de $41,5^\circ \text{C}$ (Figura 4). Após, esse período as ovelhas do grupo

G1 apresentaram ainda aumento dos valores médios da temperatura retal no 45, 51 e 54 dpi. Nos outros períodos, a temperatura retal manteve-se dentro dos parâmetros normais para a espécie e não diferiu significativamente quando comparado com o grupo controle ($P > 0,05$).

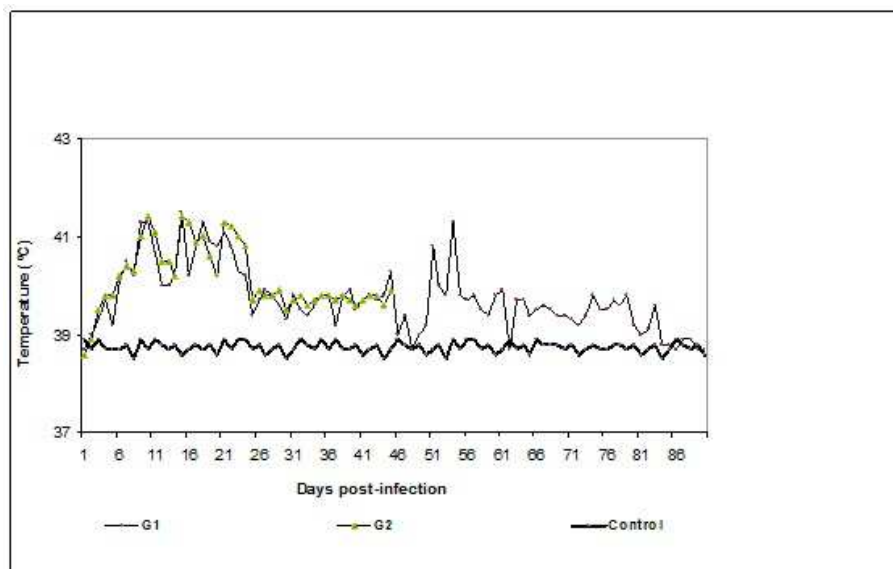


Figura 4: Valores médios de temperatura (°C) em ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax* nos terço inicial da gestação (G1), terço final da gestação (G2) e grupo controle (G3).

Os sinais clínicos eram evidentes desde 7 dpi, e consistiam de apatia, taquipnéia, taquicardia, hiporexia, mucosas hipocoradas e aumento dos gânglios linfáticos. As ovelhas 2 e 3 apresentaram diarreia severa no período 7 e 18 dpi. A partir deste período, o estado diarréico desapareceu, reincidindo no 50 dpi, persistindo até o final do período experimental.

As ovelhas dos grupos infectados apresentaram uma progressiva redução no escore corporal (Figura 5). As ovelhas 1 e 3 apresentaram escore corporal de 1,5, enquanto que as ovelhas 4, 5, e 6 apresentaram escore corporal 2. As ovelhas do grupo G3 mantiveram-se ao longo do experimento o mesmo escore corporal observado inicialmente.

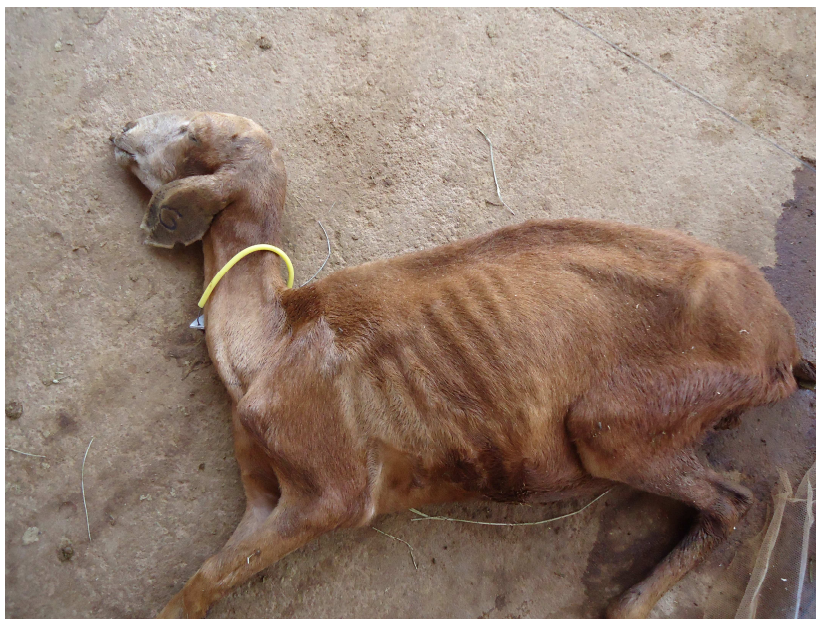


Figura 5: Ovelha apresentando perda de peso, devido à infecção por *trypanosoma vivax*.

As ovelhas 1 e 3 apresentaram agravamento dos sinais clínicos, tais como: prostração, fraqueza, letargia, anemia severa (hematócrito de 8,0%), anorexia, decúbito, relutância em se movimentar, e após dois dias morreram.

As ovelhas 2 e 4 pariram dois cordeiros fracos, pesando 1,5 e 1,1 kg, respectivamente, enquanto que no grupo controle os animais pesavam em torno de 3,5 kg. Estes animais apresentaram úberes pouco desenvolvidos, agalaxia, e não ingeriram colostro, após cinco dias de nascimento morreram. Aproximadamente, no dia 120 de gestação, a ovelha 5 abortou dois cordeiros com quase 25 centímetros de comprimento, pesando 1,2 kg. E a ovelha 6 também abortou um feto com 130 dias de prenhez com 23 centímetros de comprimento, com 1,1Kg. Após o parto, esta ovelha apresentou secreção vaginal mucopurulenta.

2.4.3 Hematócrito, bioquímica sérica e análise de progesterona

A partir do 7 dpi até o final do experimento, as ovelhas dos grupos G1 e G2 mostraram redução significativa ($P < 0,05$) nos valores médios do hematócrito em comparação ao grupo controle. Os valores de glicose média ficaram abaixo dos parâmetros normais para a espécie a partir do 30 dpi nas ovelhas dos grupos infectados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados e controle de acordo com as variáveis parasitemia, temperatura e hematócrito.

Variáveis	Período	Infectado	Controle	Valor de P
Parasitemia	G1	89,93 $\pm$ 4,70	0	<0,001*
	G2	109,57 $\pm$ 8,35	0	<0,001*
Temperatura	G1	39,72 $\pm$ 0,07	38,74 $\pm$ 0,01	<0,001*
	G2	40,14 $\pm$ 0,10	38,43 $\pm$ 0,05	<0,0001*
Hematócrito	G1	16,64 $\pm$ 0,64	39,28 $\pm$ 0,32	<0,0001*
	G2	19,26 $\pm$ 1,18	35,0 $\pm$ 0,511	<0,0001*

* Significa diferença estatística (P<0,05)

Os níveis séricos médios de glicose, colesterol e proteínas totais diminuíram significativamente nos animais G1 (P <0,05) em relação ao G3. Já os níveis séricos de albumina diminuíram significativamente (P <0,05) em ambos os grupos infectados. Houve um aumento gradual de uréia nos animais dos G1 e G2. E em G2 houve uma redução acentuada nos níveis de progesterona tendo uma diferença significativa (P <0,05) em comparação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados e controle de acordo com as variáveis estudadas.

Variáveis	Período	Infectado	Controle	Valor de p
Glicose (mg/dl)	G1	38,0 $\pm$ 7,71	71,42 $\pm$ 1,50	0,008*
	G2	49,25 $\pm$ 9,62	70,5 $\pm$ 2,10	0,14
Proteína total (g/dl)	G1	5,15 $\pm$ 0,53	7,07 $\pm$ 0,08	0,02*
	G2	5,67 $\pm$ 0,75	7,12 $\pm$ 0,13	0,148
Albumina (g/dl)	G1	2,30 $\pm$ 0,19	3,51 $\pm$ 0,03	0,0017*
	G2	2,62 $\pm$ 0,38	3,52 $\pm$ 0,04	0,03*
Colesterol (mg/dl)	G1	54,28 $\pm$ 5,26	72,42 $\pm$ 1,08	0,015*
	G2	61,5 $\pm$ 9,64	74,25 $\pm$ 0,94	0,24
Uréia (mg/dl)	G1	53,42 $\pm$ 9,84	14,42 $\pm$ 0,94	0,01*
	G2	44,25 $\pm$ 13,3	13,5 $\pm$ 1,55	0,02*
Progesterona (ng/dl)	G1	12,99 $\pm$ 1,97	17,4 $\pm$ 0,69	0,10
	G2	9,56 $\pm$ 2,80	18,63 $\pm$ 0,29	0,007*

* Significa diferença estatística (P<0,05)

Tabela 3 – Valores de curva linear, quadrática e cúbica das variáveis estudadas de acordo o número de dias.

Variáveis	Período	Linear	R ²	Quadrática	R ²	Cúbica	R ²
Parasitemia	G1	$Y = 121.0 - 0.6836X$	0,16	$Y = 69.02 + 3.302X - 0.04344X^2$	0,325	$Y = 22.02 + 13.75X - 0.3568X^2 + 0.002321X^3$	0,742
	G2	$Y = 114.3 - 0.2071$	0,02	$Y = 45.20 + 6.097X - 0.1244X^2$	0,303	$Y = -17.29 + 22.17X - 0.9835X^2 + 0.01235X^3$	0,632
Temperatura	G1	$Y = 41.24 - 0.02648X$	0,59	$Y = 41.54 - 0.04148X + 0.000143X^2$	0,60	$Y = 44.67 - 0.3037X + 0.005933X^2 - 0.000037X^3$	0,812
	G2	$Y = 40.46 - 0.01361X$	0,07	$Y = 39.61 + 0.09455X - 0.002351X^2$	0,356	$Y = 38.34 + 0.49090X - 0.01926X^2 + 0.000245X^3$	0,758
Hematócrito	G1	$Y = 19.77 - 0.06860X$	0,085	$Y = 28.84 - 0.6603X + 0.006503X^2$	0,495	$Y = 40.34 - 2.137X + 0.04684X^2 - 0.000295X^3$	0,936
	G2	$Y = 32.33 - 0.5679X$	0,882	$Y = 38.08 - 1.302X + 0.01596X^2$	0,976	$Y = 38.87 - 1.498X + 0.02648X^2 - 0.000153X^3$	0,977

Tabela 4 – Valores de curva linear, quadrática e cúbica das variáveis estudadas de acordo o número de dias.

Variáveis	Período	Linear	R ²	Quadrática	R ²	Cúbica	R ²
Glicose (mg/dl)	G1	$Y = 59.6 - 0.481X$	0,77	$Y = 70.36 - 1.338X + 0.009524X^2$	0,974	$Y = 73.19 - 1.968X + 0.02841X^2 - 0.000140X^3$	0,99
	G2	$Y = 71.3 - 0.980X$	0,973	$Y = 73.05 - 1.330X + 0.007778X^2$	0,984	-	
Proteína total (g/dl)	G1	$Y = 7.06 - 0.0424X$	0,928	$Y = 7.445 - 0.07286X + 0.000339X^2$	0,968	$Y = 7.379 - 0.05804X - 0.000106X^2 + 0.000003X^3$	0,97
	G2	$Y = 7.43 - 0.0780X$	0,988	$Y = 7.355 - 0.06300X - 0.000333X^2$	0,991	-	
Albumina (g/dl)	G1	$Y = 3.00 - 0.0155X$	0,92	$Y = 3.133 - 0.02643X + 0.000122X^2$	0,958	$Y = 3.167 - 0.03384X + 0.000344X^2 - 0.000002X^3$	0,963
	G2	$Y = 3.51 - 0.0393X$	0,963	$Y = 3.385 - 0.01433X - 0.000556X^2$	0,998	-	
Colesterol (mg/dl)	G1	$Y = 72.6 - 0.407X$	0,896	$Y = 69.69 - 0.1738X - 0.002593X^2$	0,921	$Y = 72.86 - 0.8775X + 0.01852X^2 - 0.000156X^3$	0,972
	G2	$Y = 83.1 - 0.960X$	0,928	$Y = 79.10 - 0.1600X - 0.01778X^2$	0,985	-	-
Uréia (mg-dl)	G1	$Y = 19.89 + 0.7452X$	0,86	$Y = 9.714 + 1.560X - 0.009048X^2$	0,946	$Y = 13.38 + 0.7447X + 0.01540X^2 - 0.000181X^3$	0,966
	G2	$Y = 13.50 + 1.367X$	0,989	$Y = 15.25 + 1.017X + 0.007778X^2$	0,995	-	
Progesterona (ng/dl)	G1	$Y = 21.66 - 0.1651X$	0,919	$Y = 22.37 - 0.2002X + 0.000335X^2$	0,921	$Y = 15.94 + 0.3387X - 0.01157X^2 + 0.000076X^3$	0,957
	G2	$Y = 19.27 - 0.3233X$	0,999	-		-	

Tabela 5 – Análise de correlação entre as variáveis estudadas relacionadas ao grupo G1.

	Hematócrito	Temperatura	Parasitemia	Glicose	Proteína	Albumina	Colesterol	Uréia
Temperatura	-0.302	-						
Parasitemia	-0.176	0.885*	-					
Glicose	0.220	0.145	0.927*	-				
Proteína	0.218	0.180	0.942*	0.991*	-			
Albumina	0.165	0.145	0.898*	0.981*	0.991*	-		
Colesterol	0.109	0.108	0.828*	0.954*	0.964*	0.991*	-	
Uréia	-0.165	-0.154	-0.927*	-0.972	-0.991*	-0.981*	-0.954*	-
Progesterona	0.202	-0.257	0.70	0.898*	0.942*	0.927*	0.885*	-0.942*

* Significa diferença estatística a $P < 0.05$.

Tabela 6 – Análise de correlação entre as variáveis estudadas relacionadas ao grupo G2.

	Hematócrito	Temperatura	Parasitemia	Glicose	Proteína	Albumina	Colesterol	Uréia
Temperatura	0.846	-						
Parasitemia	0.968	0.952	-					
Glicose	0.964*	0.888	0.984	-				
Proteína	0.916	0.622	0.831	0.962*	-			
Albumina	0.861	0.70	0.887	0.954*	0.981*	-		
Colesterol	0.826	0.768	0.926	0.940	0.960*	0.995*	-	
Uréia	-0.910	-0.63	-0.828	-0.963*	-0.999*	-0.986*	-0.967*	-
Progesterona	0.991	0.768	0.926	0.978	0.979	0.995	0.99*	-0.981

* Significa diferença estatística a $P < 0.05$.

Tabela 7 – Valores de média $\pm$ erro padrão para os grupos infectados de acordo com as variáveis parasitemia e temperatura no decorrer do tempo.

		Dias						
Variáveis		0	15	30	45	60	75	90
Parasitemia	G1	0	220.0 ± 15.27a	126.0 ± 47.12abc	128.0 ± 4.61b	57.0 ± 3.51c	55.0 ± 8.38c	48.0 ± 2.0c
	G2	0	270.0 ± 5.77a	120.0b	100.0 ± 16.09b	-	-	-
Temperatura	G1	38.7 ± 0.05b	41.5 ± 0.05a	39.3 ± 0.05ab	40.3 ± 0.05ab	39.8 ±0.1ab	39.5 ±0.05ab	38.7 ±0.05b
	G2	38.6 ± 0.11b	41.4±0.05a	39.5±0.15ab	39.9±0.15ab	-	-	-

G1 – Grupo infectado início da gestação; G2 – Grupo infectado final da gestação

* Significa diferença estatística ($P < 0,05$)

2.4.4 Estudo anatomohistopatológico

Achados de necropsia incluíram áreas de hemorragias difusas nos cotilédones, aspectos friáveis e áreas focais de necrose nas células epiteliais coriônicas da placenta das ovelhas 5 e 6. Todos os fetos abortados e neonatos mortos após o nascimento apresentaram uma quantidade moderada de líquido sero-sanguinolento na cavidade abdominal, torácica e saco pericárdico. Apresentou também edema subcutâneo, congestão no fígado, rins, pulmões e cérebro. No coração de um dos fetos abortados, observou-se petéquias e sufusões no epicárdio (Figura 6).



Figura 6: Feto abortado no terço final da gestação.

Histologicamente, observou-se o desaparecimento do epitélio placentário coriônico das ovelhas 5 e 6 (Figura 7). No fígado do feto abortado, verificou-se hepatite caracterizada por infiltrados inflamatórios linfocítico multifocais e necrose hepatocelular difusa (Figura 8). Nos fetos abortados, notou-se pericardite caracterizada por infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos ao longo do epicárdio e encefalite linfocítica multifocal localizada na substância branca do cérebro (Figura 9).

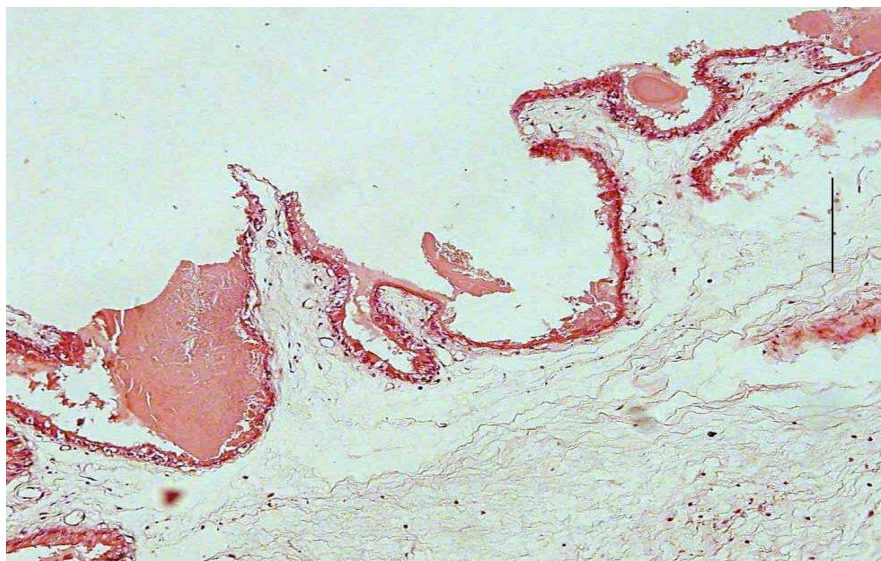


Figura 7: Necrose e desaparecimento do epitélio coriônico da placenta de ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax* no terço final da gestação. Hematoxilina-eosina, obj. 20×.

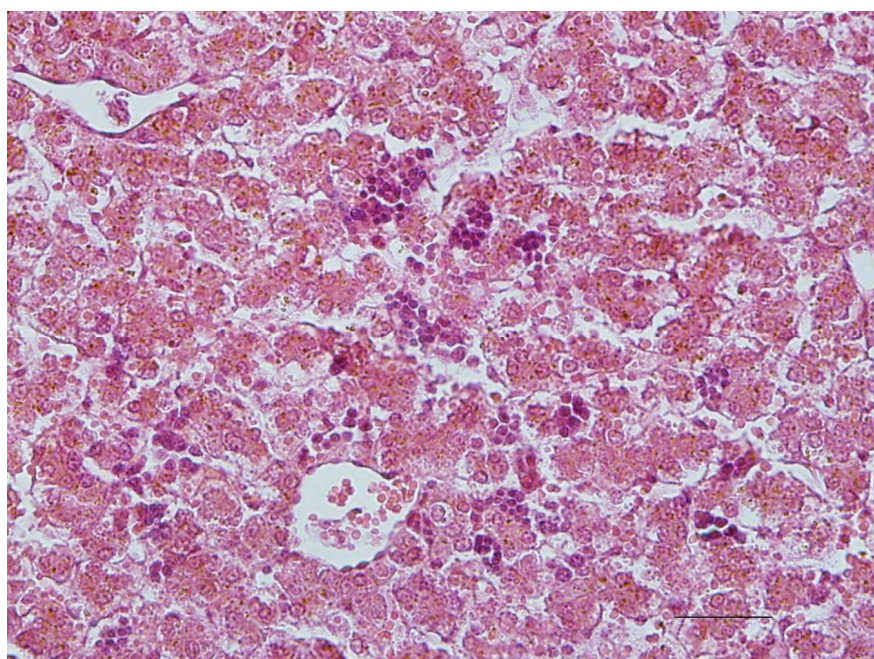


Figura 8: Necrose hepatocelular difusa e hepatite multifocal mononuclear em feto abortado no terço final da gestação de ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. Hematoxilina-eosina, obj. 40×.

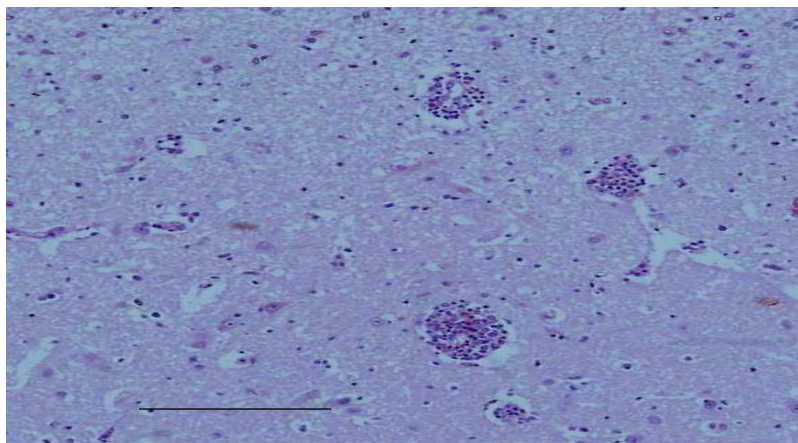


Figura 9: Encefalite multifocal mononuclear em feto abortado no terço final da gestação de ovelhas infectadas experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. Hematoxilina-eosina, obj. 20×.

2.4.5 Detecção do DNA do parasita em tecidos fetais e placenta

A análise do PCR para *T. vivax* (TviCatL-PCR) demonstrou a amplificação de um fragmento de DNA de 177pb, específico para *T. vivax*, e retirado do domínio do gene Catepsina L, que foi visualizado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. As amostras foram positivas nas placentas das ovelhas 1, 2, 4, 5 e 6; líquido amniótico da ovelha 4; encéfalo e coração do feto da ovelha 1; sangue do recém-nascido da ovelha 2 e fígado, rim e testículo do feto da ovelha 5. O PCR foi negativo para todas as amostras do grupo controle (Figuras 10 e 11).

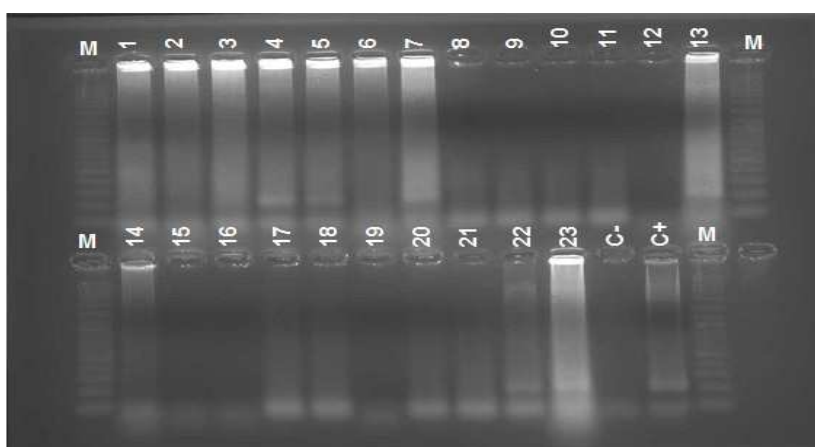


Figura 10: As amostras foram positivas nas placentas das ovelhas 1, 2 e 3 (bandas 7, 13 e 23); líquido amniótico da ovelha 4 (banda 22), sistema nervoso central e coração do feto da ovelha 1 (bandas 4 e 5).

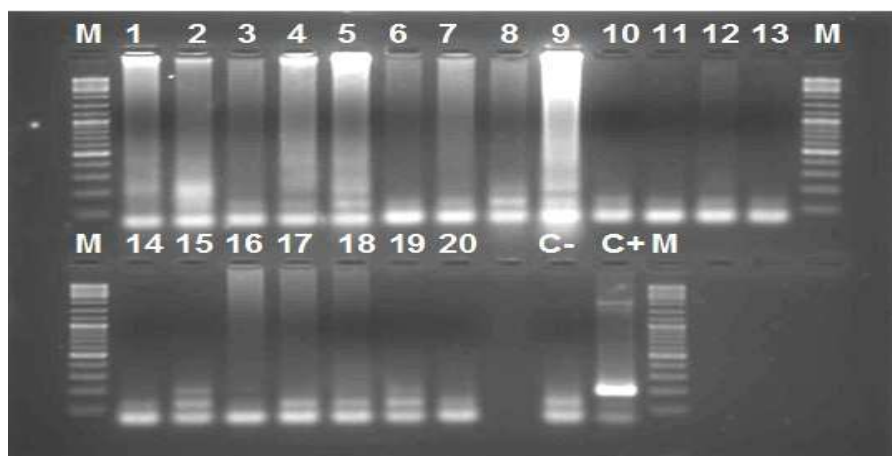


Figura 11: As amostras foram positivas nas placentas das ovelhas 5 e 6 (bandas 1 e 2); no sangue do recém-nascido da ovelha 2 (banda 15); rim e testículo do feto da ovelha 5 (bandas 5 e 9).

2.5 DISCUSSÃO

Nossos resultados indicaram que a prenhez mudou os aspectos clínicos da tripanossomíase, já que houve uma exacerbação da infecção, manifestada por parasitemia elevada e persistente seguido de hipertermia. Estudos avaliando os aspectos clínicos e patológicos da infecção experimental em caprinos e ovinos, com isolados de *T. vivax* de surtos em bovinos no Nordeste do Brasil, mostraram alta parasitemia e hipertermia somente na fase aguda, enquanto que na fase crônica, a parasitemia encontrava-se ausente ou de baixa intensidade (BATISTA et al., 2006; BEZERRA et al., 2008).

Os valores médios de hematócrito mostraram a evolução típica da infecção por *trypanosomas*, com uma redução progressiva dos valores durante todo o período de infecção. A avaliação do grau de anemia por determinação do hematócrito tem sido frequentemente utilizado na monitorização da evolução da doença, já que este parâmetro hematológico é mais freqüentemente alterado em animais naturalmente ou experimentalmente infectados por *T. vivax* (PELLIN et al., 2003; VALERA et al., 2005; BATISTA et al., 2006). O hematócrito diminuiu drasticamente nos grupos de animais infectados, atingindo 8% nas ovelhas 1 e 3. Hematócrito baixo está associado com os estágios mais graves de tripanossomíase e pode ter contribuído para o curso fatal da doença nas ovelhas 1 e 3, bem como na redução do peso corporal de cordeiros recém-nascidos e fetos abortados das ovelhas infectadas.

As consequências patológicas da infecção em fêmeas prenhas parecem estar diretamente relacionadas ao período gestacional em que ocorre. No presente estudo, duas ovelhas infectadas no primeiro terço da gestação apresentaram uma infecção grave e morreram dentro de 35 dias. No entanto, a mortalidade das ovelhas infectadas no terço final da gestação não ocorreu, duas dessas ovelhas abortaram, e a outra pariu um cordeiro vivo, fraco que morreu logo após o nascimento.

A infecção experimental com *T. vivax* em ovelhas prenhas mostrou que de três ovelhas infectadas no terço inicial da gestação, duas morreram sem abortar, e uma morreu após o aborto, sendo que todas essas ovelhas apresentaram infecção uterina. No caso das ovelhas infectadas no terço final da gestação, duas abortaram e uma teve parto prematuro, os cordeiros foram afetados provavelmente por uma infecção intra-uterina, e nenhum deles foram viáveis (ELHASSAN et al., 1995).

O efeito negativo da tripanossomíase em fêmeas gestantes é provavelmente uma consequência da depressão imunológica proveniente da gestação, que aumenta as necessidades metabólicas da mãe, o que também está associado ao fato dos trypanosomas promover no hospedeiro anorexia, alterações hematológicas, bioquímicas e imunológicas (STEPHEN, 1986; ADEIZA et al., 2008; OHAERI; ELUWA, 2011).

Além disso, em ovelhas, a placenta passa a secretar progesterona por volta do dia 55, a qual é suficiente para manter a gestação, na maioria das ovelhas quando o corpo lúteo regride. Portanto, o dano para a placenta, que é causado pelo protozoário podem promover a secreção insuficiente de progesterona placentária e consequente interrupção da gestação (WEEMS et al., 2007).

A avaliação da concentração de glicose no sangue foi utilizado como indicador da atividade metabólica de energia. Portanto, o metabolismo das ovelhas é caracterizado por elevada demanda de glicose (ROOK, 2000). O efeito do *T. vivax* no metabolismo energético em ovelhas promoveu um aumento de 25% das necessidades energéticas de manutenção. A hipoglicemia é um achado comum na tripanossomíase aguda, que é atribuído ao gasto de energia causado por hipertermia e consumo de glicose no sangue por trypanosomas (KADIMA et al., 2000).

Neste estudo, a hipoglicemia é uma modificação bioquímica importante que foi observada nos grupos de ovelhas infectadas. Assim, a combinação de exigências de energia aumentada na gestação associados com um balanço negativo de energia promovida pela

infecção é incompatível com a manutenção das funções vitais e da saúde das ovelhas infectadas e desenvolvimento fetal. Além disso, a frutose fetal é produzida pela placenta a partir de glicose, e compreende cerca de 70-80% do açúcar no sangue fetal. Os valores de frutose fetal são correlacionados com os níveis de glicose maternos, e para a manutenção de concentrações elevadas podem ser vistos como um indicador da função fetal ideal placentária (JAINUDEEN; HAFEZ, 2000).

Outra importante alteração metabólica observada na infecção é o aumento no catabolismo das proteínas, o que é evidenciado pela diminuição da proteína total no soro e aumentado de uréia (VAN DAM et al., 1996). Uma tendência semelhante foi observada no presente estudo, em que os níveis plasmáticos baixos de proteína total e elevados níveis de uréia foram observados nos grupos infectados.

Nossos estudos confirmam a importância do *T. vivax* como agente causador de abortos e mortalidade perinatal, como já demonstrado nos surtos de infecção em bovinos, ovinos e caprinos na região semiárida brasileira (BATISTA et al., 2008; 2009; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012). Os nossos dados sugerem que o *T. vivax* é capaz de causar abortos ou mortalidade perinatal de diferentes maneiras. De fato, os distúrbios reprodutivos causados pelo parasita pode ser multifatorial, com efeitos sistêmicos maternos e lesão na placenta e nos fetos. Ambos os eventos são capazes de promover a interrupção da gestação.

Uma alteração sistêmica importante observada em ovelhas infectadas foi a diminuição do escore corporal, o qual apresentou condição corporal baixa com o limite inferior de 1,5 nas ovelhas 1 e 3. Seja qual for a causa, pequenos ruminantes com uma condição corporal de 1,5 são nove vezes mais propensas a abortar em comparação com aqueles com uma boa condição corporal (MELLADO et al., 2004).

Outras manifestações sistêmicas importantes, encontradas na literatura como capazes de promover o aborto, são hipertermia e anemia (PARKINSON, 2009). A redução na concentração plasmática de progesterona é outra causa de origem sistêmica materna que pode provocar aborto.

Neste estudo, foi observado que os níveis séricos de progesterona de ovelhas infectadas foram significativamente menores do que as observadas no grupo de controle. Sabe-se que a diminuição nos resultados de progesterona pode interromper a gestação e promover a expulsão do feto morto. Distúrbios hormonais na tripanossomíase causada por *T. vivax* ocorre devido à degeneração do hipotálamo, hipófise e gônadas, o que resulta em

interrupção das secreções e as concentrações plasmáticas de hormônios que são necessários para os processos reprodutivos (SEKONI, 1994).

Outra hipótese para os abortos consiste na ocorrência de hipoglicemia materna e, conseqüentemente, hipoglicemia fetal. Este evento é seguido por sucessivos aumentos de corticosteróides, estrógeno e prostaglandina, causando a luteólise e aborto (WENTZEL, 1982).

A detecção de DNA do parasito por PCR na placenta, sangue e tecidos de fetos abortados e neonatos mortos nos permite sugerir que os protozoários atravessam a corrente sanguínea da mãe. Assim, a infecção invade o útero gravídico, causando danos placentários, e se espalham para os tecidos e sangue fetal. Os nossos resultados histopatológicos demonstraram necrose hepatocelular difusa, hepatite e encefalite nos fetos, portanto, classificado como um aborto infeccioso, tal como lesões foram encontradas em alguns tecidos fetais, consistindo de células mononucleares e/ou células polimorfonucleares visualizadas pelo método de hematoxilina e eosina (CABRAL et al., 2009).

O aborto ou nascimento de crias fracas também pode ser explicado pela insuficiência placentária, as falhas reprodutivas devido ao dano epitelial coriônico podem ocorrer devido a uma nutrição inadequada ou má oxigenação fetal. Em tais casos, o feto sofre anoxia, libera o hormônio adrenocorticotrófico com a liberação subsequente de cortisol fetal, que estimula a produção de estrógeno e da prostaglandina $F_{2\alpha}$ pela placenta. Este evento resulta em luteólise, com uma conseqüente diminuição da progesterona (DUBEY et al., 2006).

A presença do DNA do *T. vivax* na placenta, diagnosticada por PCR, associada com a presença de necrose do epitélio coriônico em ovelhas prenhas infectadas experimentalmente sugere que o parasita tem um papel importante na patogênese da disfunção placentária e do aborto.

A detecção do DNA do *T. vivax* por PCR na placenta, líquido amniótico, sangue fetal e tecidos é um evento sem precedentes, e confirma o primeiro diagnóstico de transmissão transplacentária do parasita em ovelhas no Brasil. Apesar de pouco investigado, a transmissão transplacentária foi confirmada pela primeira vez em 1972 pela descoberta de grandes números de tripanossomos no sangue 4 horas após o nascimento de cordeiros de ovelhas experimentalmente inoculados com *T. vivax* no terço final da gestação (IKEDE; LOSOS, 1972).

Mais tarde, houve a confirmação da transmissão transplacentária de *T. vivax* em bovinos através da detecção de alta parasitemia em um bezerro nascido de uma vaca infectada no mesmo período de gestação (OGWU et al., 1986). Na Venezuela, a transmissão congênita também foi observada em um bezerro, em que a parasitemia e anticorpos anti-*T. vivax* foi detectado por imunofluorescência indireta (MELENDEZ et al., 1993). Recentemente, no Brasil, a transmissão transplacentária provável foi reconhecida em quatro bezerros com três dias de idade, apresentou parasitemia alta e nascidos de vacas cronicamente infectadas (BATISTA et al., 2012). Estes autores atribuem a alta prevalência da tripanossomíase por *T. vivax* no Nordeste do Brasil devido a transmissão transplacentária, em função do clima regional (quente e seco) não favorecer o desenvolvimento de vetores durante a maior parte do ano.

Em rebanhos ovinos naturalmente infectados, a transmissão transplacentária do parasita não é conhecida ou é subestimada pelos agricultores e profissionais. Este fato não foi suficientemente estudado na infecção experimental. Os casos já publicados de transmissão transplacentária por *T. vivax* não descrevem lesões e parasitismo da placenta, e não mostram nenhuma evidência morfológica da infecção no feto.

Neste estudo, a ocorrência de transmissão transplacentária em ovelhas baseou-se na identificação de lesões patológicas, sugerindo infecção por protozoários, e também pela detecção de DNA do parasita na placenta, líquido amniótico, sangue e tecidos de fetos abortados e recém-nascidos mortos.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A parasitemia foi alta e persistente durante todo o período experimental, sendo a infecção caracterizada por mortalidade das ovelhas e mortalidade perinatal no terço inicial; aborto e mortalidade perinatal no terço final da gestação. Os fatores possivelmente relacionados com as falhas reprodutivas maternas foram baixos escore corporal, hematócrito, níveis séricos de glicose, proteína total, colesterol e progesterona.

A presença de lesões histológicas nos órgãos fetais e placenta, como necrose e desaparecimento do epitélio coriônico da placenta, encefalite multifocal mononuclear, necrose hepatocelular difusa e hepatite multifocal mononuclear em feto abortado sugerem a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos.

A transmissão transplacentária por *T. vivax* foi comprovada, bem como os seus efeitos sobre os fetos e recém-nascidos, que podem ocorrer no terço inicial ou final da gestação. É provável que este tipo de transmissão contribua para a sobrevivência do parasita e propagação da infecção em rebanhos, e está também associada a casos de aborto, nascimentos prematuros, baixo peso e mortalidade perinatal na região do semiárido brasileiro.

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.

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.; 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.; 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.; 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. **Parasitol. Res.**, v. 110, p. 73–80, 2012.

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.

CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T. C.; OKUDA L. H.; PITUCO E. M.; DEL FAVA, C. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.

CHAMOND, N.; COSSON, A.; BLOM-POTAR, M. C.; JOUVION G.; D'ARCHIVIO S.; et al. *Trypanosoma vivax* Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 8, p. 792, 2010.

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.

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.

DUBEY, J. P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 267-289, 2006.

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.

FREITAS JÚNIOR J. E.; ROCHA JÚNIOR V. R.; RENNÓ F. P.; MELLO M. T. P.; CARVALHO A. P.; CALDEIRA L. A. Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês× Zebu. **Rev Bras Zootec**, v. 37, p. 116–121, 2008.

GALIZA, G. J.; GARCIA, H. A.; ASSIS, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; DANTAS, A. F.; SIMÕES, S. V.; TEIXEIRA, M. M. G.; RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Vet. Parasitol**, v. 182, p. 359–363, 2011.

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

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.

JAINUDEEN M. R.; HAFEZ E. S. E. Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto. In: HAFEZ E. S. E. **Reprodução animal**. 6. Ed. Editora Manole, 2000. p. 217-240.

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.

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

LINHARES G. F. C.; DIAS-FILHO F. C.; FERNANDES P. R.; DUARTE S. C. Bovine tripanosomiasis in the municipality of Formoso do Araguaia County, Tocantins, Brazil (case report). **Ciência Animal**, 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.

MELLENDEZ, D. R.; FORLANO, M.; FIQUEROA, W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 293-294, 1993.

MELLADO, M.; VALDEZ, R.; LARA, L. M.; GARCÍA, J. E. Risk factors affecting conception, abortion and kidding rates of goats under extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 55 p. 191-198, 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, p. 238-396, 1986.

OHAERI C. C.; ELUWA M. C. Abnormal biochemical and haematological indices in trypanosomiasis as a threat to herd production. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 199–202, 2011.

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

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.

PARKINSON, T. Specific infectious diseases causing infertility and subfertility in cattle. In: NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 9. Ed. London: Saunders Elsevier, 2009. p. 476-516.

PELLÍN C. E. S.; 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.

PIMENTELA, D. S.; RAMOSA C. A. N.; RAMOSA, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBAC, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 286–289, 2012.

RODRIGUES A. C.; GARCIA H. A.; BATISTA J. S.; MINERVINO A. H. H.; GÓES-CAVALCANTE G.; MAIA DA SILVA F.; FERREIRA R. C.; CAMPANER M.; PAIVA F.; TEIXEIRA M. M. G. Characterisation of spliced leader genes of *Trypanosoma* (Megatrypanum) theileri: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. **Parasitol**, v. 137, p. 111–122, 2010.

ROOK, J. S. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. **Veterinary clinics of North America, Food Animal and Practice**, v. 16, n. 2, p. 203-317, 2000.

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 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 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.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, R. Y. Outbreaks of Trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the cattle in Bolivian. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 153-157, 1998.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDI, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax: biology, diagnosis and control**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. p. 137.

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, n. 5, p. 412-420, 2005.

VAN DAM, J. T. P.; HEIDE, D. V. et al. The effect of *Trypanosoma vivax* infection energy and nitrogen metabolism and serum metabolites and hormones in West African Dwarf goats on different food intake levels. **Journal Animal Science**, v. 63, p. 111-121, 1996.

WEEMS Y. S.; KIM L.; TSUDA V.; YIN C.; WEEMS C. W. What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 84, p. 54–65, 2007.

WENTZEL, D. Non-infection abortion in Angora goats. In: **International Conference on Goat Production and Disease**, 10-15 January, 1982. University of Arizona: Tucson, Arizona, 1982. p. 155-161.

ZAPATA, A. La affection de los ganados ilamada vulgarmente “huequera”, “secadera”, “cachohueco”. **Revista Medicina Veterinária**, v. 3, p. 165-180, 1931.

ANEXOS

ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PATOGÊNESE DAS FALHAS REPRODUTIVAS INDUZIDA POR *Trypanosoma vivax* EM OVELHAS PRENHAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE À REVISTA VETERINARY RESEARCH

Article title: Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes

MS ID : 1766619301722551

Authors : Taciana MF Silva, Robério G Olinda, Carla MF Rodrigues, Antonio CL Câmara, Francisco C Lopes, Múcio FB Ribeiro, Carlos IA Freitas, Marta MG Teixeira and Jael S Batista

Journal : Veterinary Research

Dear Dr Batista

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.veterinaryresearch.org/imedia/1766619301722551_article.pdf (896K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.veterinaryresearch.org/imedia/8919186647225577_comment.pdf

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within 8 weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on veterinary.research@jouy.inra.fr. We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to info@biomedcentral.com.

Best wishes,

The Veterinary Research Editorial Team

e-mail: veterinary.research@jouy.inra.fr

Web: <http://www.veterinaryresearch.org/>

ANEXO II - PATHOGENESIS OF REPRODUCTIVE FAILURE INDUCED BY *Trypanosoma vivax* IN EXPERIMENTALLY INFECTED PREGNANT EWES

Original do trabalho: Patogênese das falhas reprodutivas induzida por *Trypanosoma vivax* em ovelhas prenhas infectadas experimentalmente. Submetido para publicação na Veterinary Research.

Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes

Taciana M. F. Silva¹, Roberio G. Olinda¹, Carla M. F. Rodrigues², Antonio C. L. Camara¹, Francisco C. Lopes¹, Múcio F. B. Ribeiro³, Carlos Iberê A. Freitas¹, Marta M. G. Teixeira², Jael S. Batista^{1*}

¹ Department of Animal Sciences, Federal Rural University of the Semiarid (UFERSA), Av. Francisco Mota, Br 110, Km 47-59, 59625-900 Mossoró, RN, Brazil

² Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, University of São Paulo (USP), 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Postal: 486, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract

The present study aimed to investigate the effect of the experimental infection by *Trypanosoma vivax* in different stages of pregnancy, to determine the pathogenesis of reproductive failure, and to confirm transplacental transmission by PCR. We used 12 adult female sheep distributed into three experimental groups: G1 formed by three ewes infected during initial third of pregnancy; G2 composed by three ewes infected during the last third of pregnancy; and G3 with six non-infected ewes (control group). Each ewe of G1 and G2 was inoculated with 1,25x10⁵ tripomastigotas. Infected sheep developed high parasitemia, fever and low PCV. Clinical examination, parasitemia, serum biochemistry (albumin, total protein, glucose, cholesterol, and urea), and hematocrit were assessed daily; while serum progesterone was dosed weekly. Pathological examination was carried out in fetuses, placenta, and umbilical cords. Placenta, amniotic fluid, blood and tissues from the fetuses were submitted to PCR. Parasitemia was high and persistent during all experimental period. G1 and G2 were characterized by mortality of ewes, and abortion and perinatal mortality, respectively. The risk factors possibly involved with the maternal reproductive failure included low hematocrit, body score, serum glucose, protein, cholesterol, and progesterone. Histologically, loss of

placental chorionic epithelium of was observed. In the aborted fetuses, it was evident the presence of hepatitis, pericarditis and encephalitis. The presence of *T. vivax* DNA in the placenta, amniotic fluid, blood, and tissues the fetuses confirms the transplacental transmission of the parasite. Histological lesion in the fetuses organs and placenta suggest the involvement of the parasite in the etiopathogenesis of reproductive failure in sheep.

Key words: abortion, PCR, sheep, transplacental transmission, trypanosomiasis.

*Corresponding author

E-mail address: jaelsoares@hotmail.com

1. Introduction

Trypanosomiasis is a disease that is caused by the pathogenic protozoa of the genus *Trypanosoma*, which has a wide distribution and economic importance in African countries, mainly in regions occupied by their biological vector, the tsetse fly [1]. In West Africa, *Trypanosoma vivax* is considered the most important and pathogenic hemoparasite of livestock promoting reproductive disorders. Adaptation to the mechanical transmission by diptera as *Stomoxys* spp and *Tabanus* spp has been responsible for the spread of *T. vivax* in South America [2, 3]. Thus, the presence of *T. vivax* in cattle was already reported in French Guiana [4], the Atlantic Coast of Colombia [5, 6], and Bolivia [7, 2].

Several studies have shown that trypanosomiasis by *T. vivax* is in wide expansion in Brazil, having been diagnosed from north to south of the country [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Batista et al. [19] reported the prevalence of infection by *T. vivax* in the Brazilian semiarid region to be 46.6% and 80% in dairy cows and calves, respectively. However, in extensively raised goats and sheep in the same region, the prevalence achieved 29.7% and 25.4%, respectively [14]. In the semiarid region of Northeastern Brazil, infection by *T. vivax* was characterized by the high parasitemia rates associated with clinical signs of the disease with concomitant high mortality and economic losses. The parasite has also been implicated as an important agent of reproductive disease in dairy cattle, sheep, and goats, promoting abortion, estrus repetition, anestrus, stillbirths, and weak offspring [20, 13, 21, 17, 18].

In a high-mortality outbreak of trypanosomiasis in extensively raised ewes that occurred in a non-endemic region in Northeastern Brazil, perinatal mortality due to abortions and neonatal deaths reached nearly 75% [17]. Perinatal mortality was also one of the main manifestations during outbreaks that occurred on farms located in the Brazilian semiarid region, particularly the state of Paraíba. The authors suggest that transplacental transmission

has epidemiological significance for the maintenance and spread of disease in infected herds of ruminants [19].

Although there is evidence of the negative effect of trypanosomiasis caused by *T. vivax* on the reproduction of ruminants, there are still gaps that need to be informed about the pathogenesis of reproductive failure during pregnancy. Thus, the objective of this study was to investigate the effect of the experimental infection with *T. vivax* in pregnant ewes at different stages of pregnancy, to determine the pathogenesis of abortion, and to confirm the transplacental transmission by the polymerase chain reaction (PCR) through the presence of the parasite's DNA in the placenta and tissues from aborted fetuses.

2. Materials and methods

2.1 Design of the experimental groups

Twelve pregnant ewes with an approximate age of 24 months were used. The animals were housed in properly screened individual stalls at the premises of the Center for Studies and Research in Small Ruminants of the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

The study was approved by Ethics Committee of the Federal Rural University of the Semi-arid. Ethical procedures were based on the Brazilian law 6638 (May 8, 1979) “Normas para Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais” and “Ethical Principles for Use of Experimental Animals” from Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brazil, which are in accordance with the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, March 18, 1986).

Ultrasonographic exams were performed to identify the gestation period using a 3.5MHz abdominal transducer connected to a Logiq Pro 100 GE ultrasound. Fourteen days before the inoculation of *T. vivax*, the ewes were clinically evaluated; dewormed, and hematological exams were performed. Then, the animals were allocated into three experimental groups by random selection: Group 1(G1) was formed by four sheep infected with *T. vivax* in the first third of pregnancy (Ewes 1, 2, and 3); Group 2 (G2) consisted of four infected sheep evaluated in the final third of pregnancy (Ewes 4, 5, and 6); and the control group (G3) was composed by six non-infected ewes. All animals were submitted to identical

management conditions, fed with water and Tifton (*Cynodon* sp.) hay *ad libitum*, and supplemented with commercial concentrate (1.5% BW/day/ewe).

2.2 Inoculum preparation and experimental infection with *T. vivax*

The strain of *T. vivax* used for experimental infection of the ewes in this study was derived from a natural outbreak in sheep from the city of São João do Rio do Peixe, Paraíba, Northeastern Brazil. Blood samples were collected from sheep with parasitemia in 10% ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA) mixed with 8% glycerol, and frozen in liquid nitrogen (-196 °C). Immediately before inoculation, the strain sample was defrosted at room temperature. Each ewe from the experimental group was inoculated intravenously with 1 mL of blood containing 1.25×10^5 trypomastigotes of *T. vivax*, which had been estimated according to Batista et al. [13].

2.3 Determination of parasitemia

Parasitemia was determined daily by research of the trypanosome in the blood collected from small blood vessels located in the ear, using a blood smear between the slide and coverslip, according to the technique described by Batista et al. [13].

2.4 Clinical examination of the ewes, weight of the newborns and aborted fetuses

Experimental ewes were examined daily to assess rectal temperature, status of the mucous membrane, and external lymph nodes, and were checked for signs of labor or abortion. Body score was determined weekly using a scale of 0 (for very thin animals) to 5 (for fat animals) [22]. At the beginning of the experiment, all sheep were classified with the help of body condition scores ranging from 3.5 to 4. Immediately after delivery or abortion, newborns and fetuses were measured and weighed with an electronic digital scale.

2.5 Packed cell volume, serum biochemistry and Analysis of progesterone

Concomitant to the clinical examination and determination of parasitemia, 3 mL of blood was obtained by jugular vein puncture, and placed in sterile tubes containing 10% EDTA for the determination of packed cell volume (PCV). Serum biochemistry (albumin, total

protein, glucose, cholesterol, and urea) was determined using commercial kits (Katal, Belo Horizonte, MG) and an automatic analyzer SBA-2000 (Celm, Barueri, SP). Blood samples were collected at weekly intervals through jugular vein puncture, and placed in sterile Vacutainer tubes. Plasma progesterone was determined by microparticle enzyme immunoassay (Immulite 2000, PRG, Progesterona, Siemens Healthcare Diagnostics Products Limited).

2.6 Pathological and histopathological studies

Pathological examination of the aborted fetuses, stillborns, placenta, and umbilical cords was performed. Fragments from thoracic and abdominal organs, and central nervous system from the fetuses and stillborns were collected and fixed using 10% buffered formalin and then embedded in paraffin. Sections of 5.0 μm were cut using a microtome, and the tissue samples were stained using the classical hematoxylin–eosin method (HE).

2.7 Diagnose of *T. vivax* by PCR

Fragments of approximately 1 cm^3 of placentas, umbilical cords, stillborns, and aborted fetuses organs (heart, liver, kidneys, lungs, testicle, spleen, and cerebral cortex) were collected, preserved in 99% ethanol, and used for the DNA preparation [23]. A volume of 1 mL of amniotic fluid and blood from the heart of fetuses and newborn lambs was collected with the aid of sterile syringes, and added to a 99% ethanol solution. The DNA samples obtained from approximately 200 μL of blood or 0.3 cm^3 of tissue were subjected to a highly sensitive PCR assay (TviCatL-PCR) specific for *T. vivax*, which targets the repeated gene sequences that encode cysteine proteases (Cathepsin L-like enzyme) [23, 19]. A DNA sample of *T. vivax* (from Catolé do Rocha, Paraíba, Northeastern Brazil) was used as a positive control for PCR reactions; whereas DNA samples from amniotic fluid, blood, and tissues of the non-infected ewes (G3) were used as negative controls.

2.8 Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error, and analyzed by SAS statistical software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) version 9.0 and Minitab

(Minitab Inc. LEAD Technologies) version 16.1.1. Primarily, the data were assessed for normality by Lilliefors and homogeneity by Levene. Statistical difference between the values of the infected groups G1, G2, and their respective controls were calculated when normal by the independent t test, and when not normal by Mann-Whitney test. The relationship between the variables during the day was quantified using the analysis of regression. P values minor of 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Mean parasitemia

T. vivax was first detected in peripheral blood in the three days post-infection (dpi) in G1 and G2 (Figure 1). Parasitemia increased progressively, achieving the peak parasitemia in the 13 and 15 dpi in the ewes from G1 and G2, respectively. After this period, a discrete decrease was observed in the mean values for parasitemia, while remaining high during all the experiments in both groups.

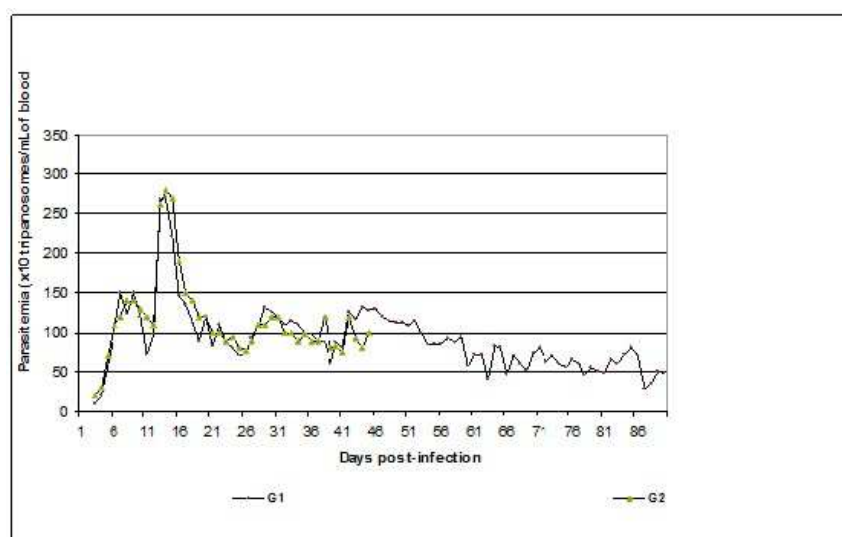


Figure 1: Mean values of parasitemia ($\times 10^5$ trypanosomes / mL blood) in sheep experimentally infected with *T. vivax* in the first trimester of pregnancy (G1), and the final trimester of gestation (G2).

3.2 Clinical signs and reproductive changes

The ewes from G1 and G2 showed the highest rectal temperature between 6 and 24 dpi with an average maximum of 41.5°C (Figure 2). The ewes from G1 presented increased mean values for rectal temperature at 45, 51, and 54 dpi. In the other periods, the rectal temperature remained within the normal parameters for the species and did not differ significantly when compared with G3 ($P > 0.05$).

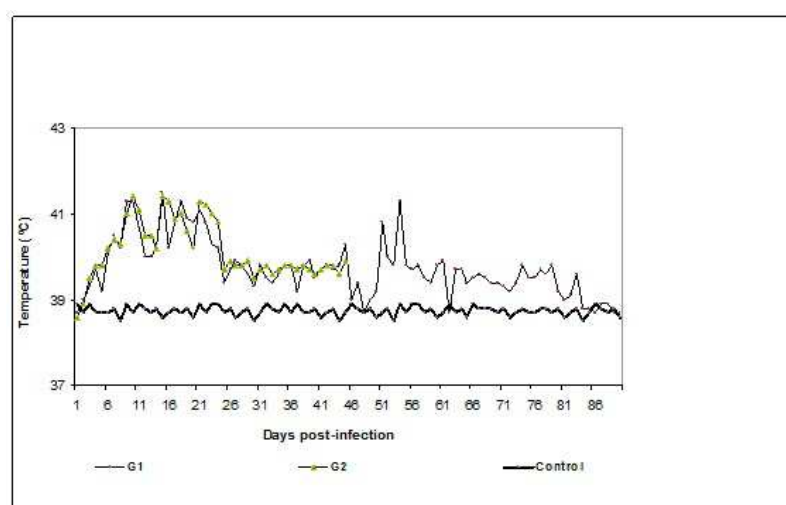


Figure 2: Mean values of rectal temperature (°C) in sheep experimentally infected with *T. vivax* in the first trimester of pregnancy (G1), the final trimester of gestation (G2), and the control group (G3).

Clinical signs were evident since 7 dpi, and included apathy, tachypnea, tachycardia, hyporexia, pale mucosae, and enlarged lymph nodes. Ewes 2 and 3 presented severe diarrhea between 7 and 18 dpi. From this period, the diarrheic status disappeared and reinitiated in the 50 dpi, persisting to the end of the experimental period. Ewes from the infected groups showed a progressive reduction in body score. Ewes 1 and 3 showed a body score of 1.5, whereas ewes 4, 5, and 6 showed a body score of 2. The ewes from G3 maintained the body score observed at the beginning of the experiment.

Ewes 1 and 3 presented a worsening of symptoms and showed prostration, weakness, lethargy, severe anemia (PCV minimum of 8.0%), anorexia, recumbence, a reluctance to

move, and after the clinical course of two days died. Ewes 2 and 4 delivered two weak offspring weighing 1.5 and 1.1 kg, respectively. These ewes had a poorly developed udder, agalactia; the lambs that were not fed colostrum died five days after birth. Approximately, on the 120th day of pregnancy, Ewe 5 aborted two lambs that were nearly 25cm in length. Ewe 6 also aborted a 23cm in length fetus with 130 days of gestation. After parturition, this ewe presented mucopurulent vaginal discharge.

3.3 Packed cell volume, serum biochemistry and analysis of progesterone

From the 7 dpi to the end of the experiment, ewes from G1 and G2 showed a significant reduction in the mean PCV compared with G3 ($P < 0.05$). The average PCV in the G3 remained within the normality parameters for the species during the all experimental period. The average value of serum glucose was below the normal parameters for the species from the 30 dpi in G1 and G2. Our data showed that mean values of serum glucose, total protein and cholesterol decreased significantly in G1 compared with G3 ($P < 0.05$). The serum levels of total protein, albumin, and globulin were below the threshold of normality for the species from 45 dpi. But just the serum albumin levels decreased significantly in both infected groups ($P < 0.05$). There was a gradual increase in serum urea and a significant difference in mean values of G1 and G2. In G2 there was a marked reduction in progesterone levels and a significant difference compared to G3 ($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1 – Mean values $\pm$ standard error for the infected and control groups according to the variables studied.

Variables	Period	Infected	Control	P value
Glucose (mg/dl)	G1	38,0 $\pm$ 7,71	71,42 $\pm$ 1,50	0,008*
	G2	49,25 $\pm$ 9,62	70,5 $\pm$ 2,10	0,14
Total protein (g/dl)	G1	5,15 $\pm$ 0,53	7,07 $\pm$ 0,08	0,02*
	G2	5,67 $\pm$ 0,75	7,12 $\pm$ 0,13	0,148
Albumin (g/dl)	G1	2,30 $\pm$ 0,19	3,51 $\pm$ 0,03	0,0017*

	G2	2,62 ± 0,38	3,52 ± 0,04	0,03*
Cholesterol (mg/dl)	G1	54,28 ± 5,26	72,42 ± 1,08	0,015*
	G2	61,5 ± 9,64	74,25 ± 0,94	0,24
Urea (mg-dl)	G1	53,42 ± 9,84	14,42 ± 0,94	0,01*
	G2	44,25 ± 13,3	13,5 ± 1,55	0,02*
Progesterone (ng/dl)	G1	12,99 ± 1,97	17,4 ± 0,69	0,10
	G2	9,56 ± 2,80	18,63 ± 0,29	0,007*

* Meaningful statistical difference (P<0,05)

3.4 Pathological and histological studies

Gross findings included enlarged, hemorrhagic, friable cotyledons and focal areas of chorionic epithelial cells necrosis in the placenta of Ewe 5 and 6. All aborted fetuses and neonates dead after birth showed a moderate amount of sero-bloody fluid in the abdominal and thoracic cavity, and pericardial sac. Subcutaneous edema, congestion of the liver, kidneys, lungs, and brain were also noted. At the heart of one of the aborted fetuses, petechial hemorrhages and suffusions in the epicardium were observed.

Histologically, the disappearance (or loss) of the placental chorionic epithelium of Ewe 5 and 6 was observed (Figure 3). In the liver of the aborted fetus (these sheep offspring), hepatitis was characterized by multifocal lymphocytic inflammatory infiltrates, and diffuse hepatocellular necrosis (Figure 4). In the aborted fetuses (from Ewe 5 and 6), pericarditis was characterized by the inflammatory infiltration of lymphocytes and plasma cells along the epicardium, and multifocal lymphocytic encephalitis located in the white matter of the brain (Figure 5).

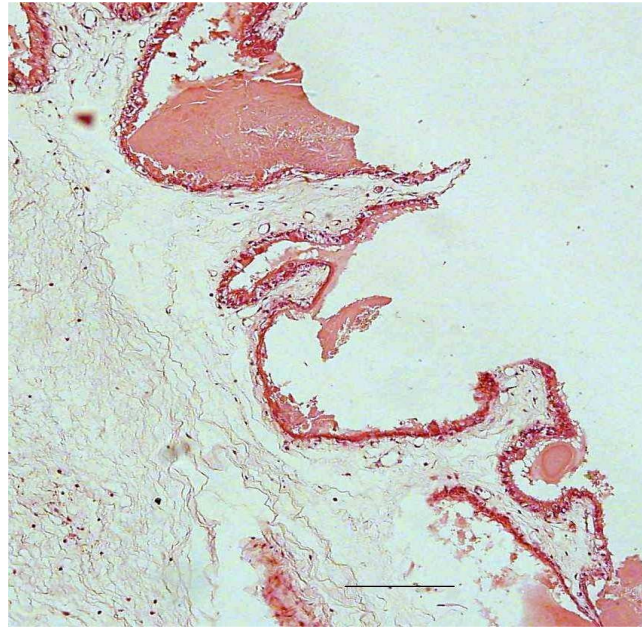


Figure 3: Necrosis and disappearance of the chorionic epithelium of the placenta of sheep experimentally infected with *T. vivax* in the final trimester of pregnancy. Hematoxylin-eosin, obj. 10×, scale bar 150 μ m.

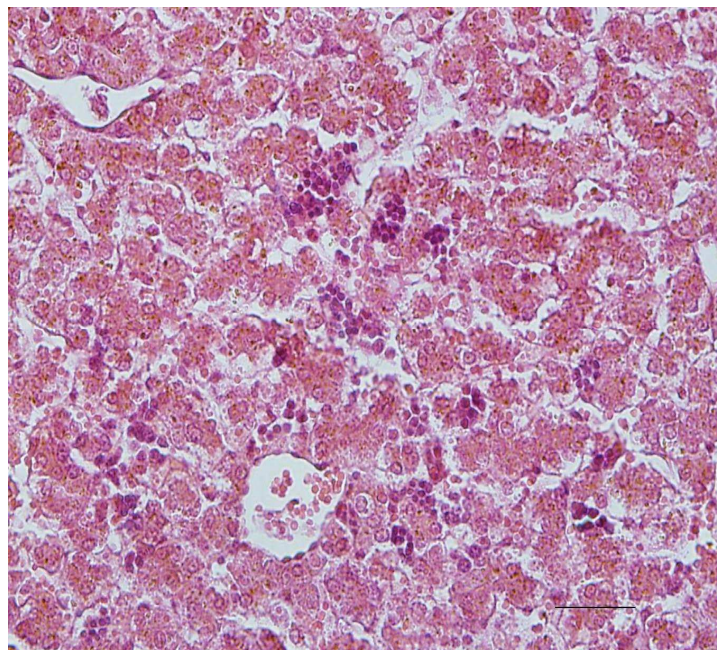


Figure 4: Hepatocellular necrosis and diffuse multifocal mononuclear hepatitis in an aborted fetus in the final trimester of gestation in sheep experimentally infected with *T. vivax*. Hematoxylin-eosin, obj. 40×, scale bar 99 μ m.

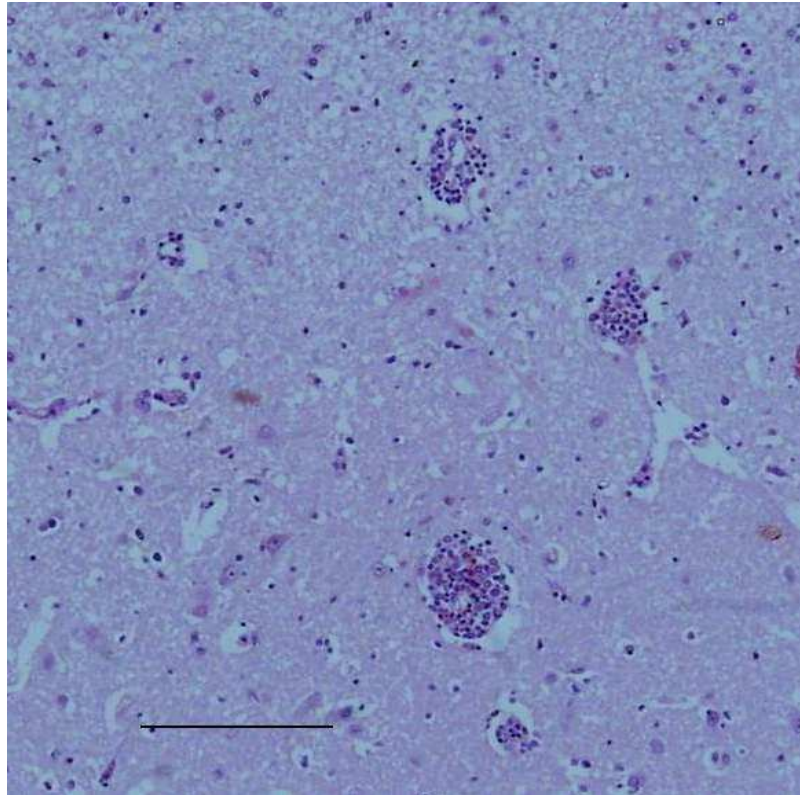


Figure 5: Mononuclear multifocal encephalitis in na aborted fetus in the final trimester of gestation in sheep experimentally infected with *T. vivax*. Hematoxylin-eosin, obj. 10×, scale bar 147 μ m

3.5 Detection of parasite's DNA in fetal tissue and placenta

PCR analysis for *T. vivax* (TviCatL-PCR) showed the amplification of a DNA fragment of approximately 177pb, specific of *T. vivax*, and retrieved from the cathalitic domain of the Catepsina L gene (visualized in 2% agarose gel). The samples resulted positive in the placentas of ewes 1, 2, 4, 5, and 6; amniotic fluid from ewe 4; central nervous system and heart of the fetus from ewe 1; blood from the newborn of ewe 2; and kidney, liver, and testicle of the fetus from ewe 5. However, PCR was negative for all samples of the control group (figure 6 and 7).

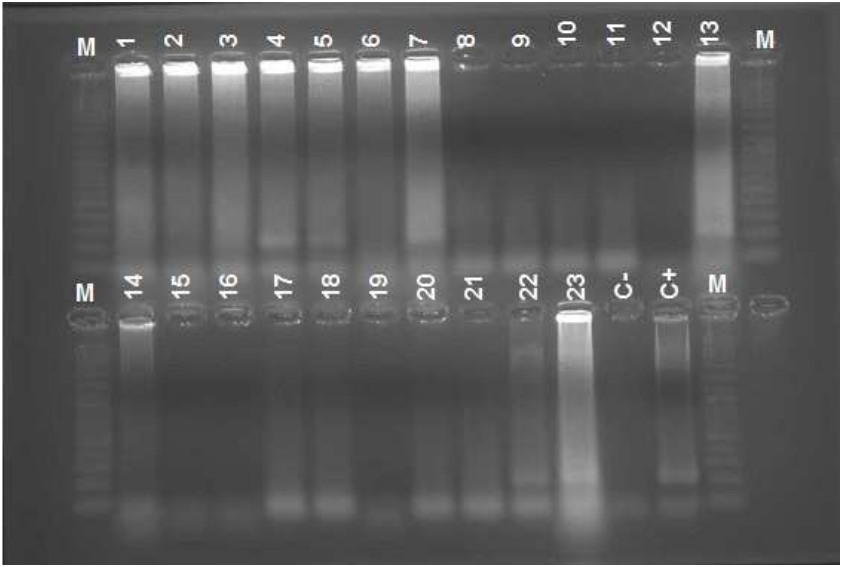


Figure 6: The samples resulted positive in the placentas of ewes 1, 2 and 3 (bands 7, 13 and 23); amniotic fluid from ewe 4 (bands 22); central nervous system and heart of the fetus from ewe 1 (bands 4 and 5).

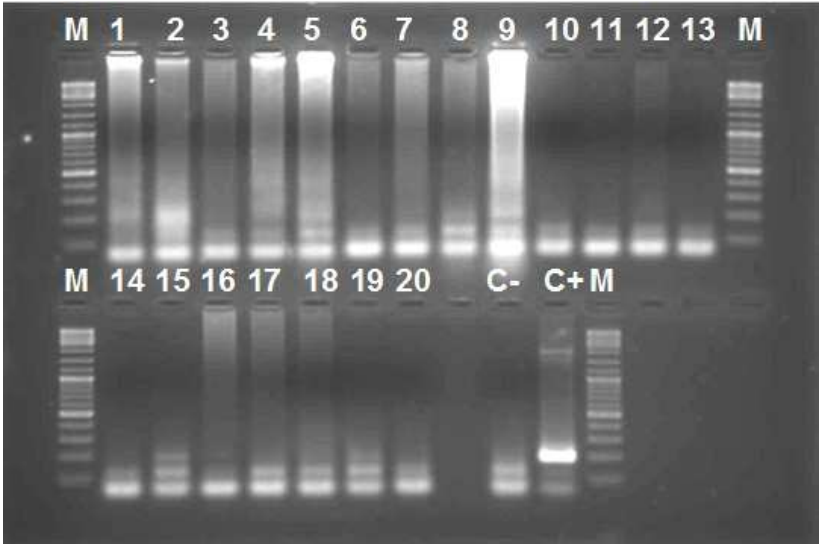


Figure 7: The samples resulted positive in the placentas of ewes 5 and 6 (bands 1 and 2); blood from the newborn of ewe 2 (bands 15); and kidney and testicle of the fetus from ewe 5 (bands 5 and 9).

4. Discussion

Our results indicate that pregnancy changed the clinical aspects of trypanosomiasis, as there was an exacerbation of the infection, manifested by high and persistent parasitemia followed by hyperthermia. Studies evaluating the clinical and pathological features of experimental infection in goats and sheep, with a *T. vivax* sample from outbreaks in cattle in Northeastern Brazil, showed high parasitemia and hyperthermia in the acute phase only, whereas in the chronic phase, parasitemia is either absent or of low intensity [24, 20].

The mean values of hematocrit showed the typical evolution of the infection by trypanosomes, with a progressive reduction in the values throughout the infection period. The evaluation of the degree of anemia by hematocrit determination has been frequently used in monitoring the evolution of the disease, as this hematological parameter is most often frequently changed in animals experimentally or naturally infected by *T. vivax* [25, 26, 24]. The hematocrit showed a dramatic decrease in the group of infected animals, reaching 8% (Ewe 1 and 3). Low hematocrit is associated with more severe stages of trypanosomiasis and may have contributed to the fatal course of disease in Sheep 1 and 3; as well as the reduced body weight of newborn lambs and aborted fetuses.

The pathological consequences of infection in pregnant females appear to be directly related to the gestational period in which it occurs. In the present study, two sheep infected in the first third of pregnancy presented serious infection and died within 35 days. However, the mortality of the sheep infected in the final third of pregnancy did not occur. Two of those ewes aborted, and another delivered a live lamb; but the weak offspring died shortly after birth. Experimental infection with *T. vivax* in pregnant ewes showed that of the three infected animals in the first third of pregnancy, two died without aborting, and one died after an abortion. All of those ewes also showed a uterine infection of the fetuses. In the case of the other three sheep infected in the final third of gestation, two died before aborting, one delivered prematurely. However, the lambs were affected by an intrauterine infection, and none of them were viable [27]. The negative effect of trypanosomiasis in pregnant females is probably a consequence of the transient immunity depression that is promoted by the gestation, and it increases the metabolic needs of the mother, which is associated with the fact that trypanosomes in the host promote anorexia, hematological, biochemical, and immunological changes [28, 29, 30]. In addition, however, in ewes, the placenta starts

secreting progesterone around day 55, which is sufficient to maintain pregnancy in most ewes when the corpus luteum is removed [31]. Therefore, the damage to the placenta that is caused by the protozoa may promote the insufficient placental secretion of progesterone and the consequent interruption of the pregnancy.

The evaluation of blood glucose concentration has been applied as an indicator of energy metabolic activity. Therefore, metabolism of pregnant ewes is characterized by high glucose requirements [32]. The effect of *T. vivax* on the energetic metabolism in goats promoted an increase of 25% in the energy requirements for maintenance. Hypoglycemia is a common finding in acute trypanosomiasis disease, which is attributed to energy expenditure caused by hyperthermia and blood glucose consumption by trypanosomes [33]. In this study, hypoglycemia is an important biochemical change that is observed in the groups of infected sheep. Thus, the combination of increased energy demands in pregnancy associated with a negative energy balance promoted by the infection is incompatible with the maintenance of vital functions and the health of infected pregnant ewes and fetal development. In addition, fetal fructose is produced by the placenta from glucose, and comprises about 70–80% of fetal blood sugar. The values of fetal fructose are correlated with the maternal glucose levels, and the maintenance of high concentrations can be viewed as an indicator of ideal fetal placental function [34]. Another important metabolic alteration in the infection is the increase in protein catabolism, which is evidenced by the decrease of serum total protein and increased urea [35]. A similar trend was observed in this study, in which low plasma levels of total protein and high levels of urea were observed in the infected groups.

Our experiment confirms the importance of *T. vivax* as a causative agent of abortion and perinatal mortality, as previously demonstrated in the outbreaks of infection in cattle, sheep, and goats in the Brazilian semiarid region [21, 14, 17, 18]. Our data suggest that *T. vivax* is able to cause abortions or perinatal mortality in different ways. In fact, the reproductive disturbances caused by the parasite may be multifactorial, as maternal systemic effects and injury of the placenta and fetus were observed. Both events are capable of promoting the disruption of pregnancy.

An important systemic alteration observed in infected pregnant ewes was the progressive loss of body condition, which was manifested by low body scores achieving the lower limit of 1.5 (Ewe 1 and 3). Whatever the cause, small ruminants with a body condition of 1.5 are nine times more prone to abort compared with those with a good body

condition [36]. Other systemic manifestations observed in this group, found in the literature as capable of promoting abortion, are hyperthermia and anemia [37, 38]. The reduction in serum progesterone is another cause of maternal systemic origin that can trigger abortion. In this study, it was observed that the serum levels of progesterone of infected sheep were significantly lower than those observed in the control group. It is known that the decrease in progesterone results can disrupt pregnancy and promote the expulsion of the dead fetus. Hormonal disorders in trypanosomiasis caused by *T. vivax* occur due to degeneration of the hypothalamus, pituitary, and gonads; which results in disruption in the secretions and plasma concentrations of hormones that are necessary for the reproductive processes [39]. Another hypothesis for the abortions consists of the occurrence of maternal hypoglycemia and, consequently, fetal hypoglycemia. This event is followed by the successive events of an increase of corticosteroids, estrogen, and prostaglandin, causing luteolysis and abortion [40].

The demonstration of parasite DNA by PCR in the placenta, blood, and tissue from aborted fetuses and dead neonates allows us to suggest that the protozoan traverses the maternal bloodstream. Thus, the infection invades the pregnant uterus, causes placental damage, and spreads into the blood and fetal tissues. Our histopathological results showed hepatitis and encephalitis, and is, therefore, classified as an infectious abortion, as lesions were found in some tissue or fetal attachment, consisting of mononuclear inflammatory cells and/or polymorphonuclear cells visualized by the method of hematoxylin and eosin [41].

The abortion or birth of weak offspring may also be explained by placental insufficiency. Reproductive failure due to chorionic epithelial damage may occur due to inadequate nutrition or fetal oxygenation. In such cases, the fetus suffers anoxia, releasing the adrenocorticotrophic hormone with the subsequent release of fetal cortisol, which stimulates estrogen and prostaglandin F₂ α production by the placenta. This event results in luteolysis, with a consequent decrease in progesterone [42]. The presence of the DNA of *T. vivax* in the placenta, diagnosed by PCR, associated with the presence of necrosis of the chorionic epithelium in experimentally infected ewes suggests that the parasite has an important role in the pathogenesis of placental dysfunction and abortion.

The detection of the DNA of *T. vivax* by PCR in the placenta, amniotic fluid, fetal blood, and tissues is an unprecedented event, and confirms the first diagnosis of the transplacental transmission of the parasite in Brazil. Although little investigated, transplacental

transmission was confirmed for the first time in 1972 by the finding of large numbers of trypanosomes in the blood four hours after the birth of lambs from experimentally inoculated sheep with *T. vivax* in the final trimester of gestation [43]. Later, there was the confirmation of the transplacental transmission of *T. vivax* in cattle by the detection of high parasitemia in a calf born from an infected cow in the same period of pregnancy [44]. In Venezuela, congenital transmission was also observed in a calf, in which parasitemia and anti-*T. vivax* antibodies were detected by indirect immunofluorescence [45]. Recently, in Brazil, the probable transplacental transmission was recognized in four three-day-old calves with high parasitemia and born from chronically infected cows [19]. These authors attribute the high prevalence of trypanosomiasis by *T. vivax* in Northeastern Brazil to the transplacental transmission, as the regional climate (hot and dry) does not favor the development of host insects during most of the year.

In naturally infected flocks and herds, the transplacental transmission of the parasite is not well known or underestimated by farmers and practitioners. This fact has not been adequately studied in experimental infection. The published cases of placental transmission by *T. vivax* do not describe lesions and parasitism of the placenta, and show no morphological evidence of the infection in the fetus. In this study, the occurrence of transplacental transmission in sheep was based on the identification of pathological lesions, suggesting protozoan infection, and also by the detection of the parasite's DNA in the placenta, amniotic fluid, blood, and tissues from aborted fetuses and recently dead neonates. The transplacental transmission of *T. vivax* is unquestionable, as well as its effects on fetuses and newborns, which may occur in the initial or final third of gestation. It is likely that this type of transmission contributes to the survival of the parasite and the spread of infection in herds, and is also associated with cases of abortion, premature births, low birth weight, and perinatal mortality. These facts are often reported during the outbreaks of *T. vivax* infection in the Brazilian semi-arid region.

5. References

1. Gardiner PR, Assoku RKG, Whitelaw DD, Murray M: **Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle.** *Vet Parasitol* 1989, **31**:187-197.

2. Dávila AMR, Silva RAMS: **Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, **916**:199-212.
3. Silva RAMS, Seidi A, Ramirez L, Dávila AMR: **Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax: biology, diagnosis and control.** *Embrapa Pantanal* 2002, **141**:137.
4. Leger M, Vienne M: **Epizootie a trypanosomes chez les bovines de la Guyane Française.** *Bulletin de la Societe Pathologie Exotique* 1919, **12**:258-266.
5. Zapata A: **La affection de los ganados llamada vulgarmente “huequera”, “secadera”, “cachohueco”.** *Revista Medicina Veterinaria* 1931, **3**:165-180.
6. Otte MJ, Abuabara JY, Wells EA: **Trypanosoma vivax in Colombia: epidemiology and production losses.** *Tropical Animal Health and Production* 1994, **26**:146-156.
7. Silva RAMS, Morales G, Eulert E, Montenegro RY: **Outbreaks of Trypanosomosis due to Trypanosoma vivax in the cattle in Bolivian.** *Veterinary Parasitology* 1998, **76**:153-157.
8. Serra Freire NM: **Oiapoque - outro foco de Trypanosoma vivax no Brasil.** *Rev Bras Med Vet* 1981, **4**:30-31.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. 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.
17. Galiza GJ, Garcia HA, Assis AC, Oliveira DM, Pimentel LA, Dantas AF, Simões SV, Teixeira MMG, Riet-Correa F: **High mortality and lesions of the central nervous system in *Trypanosomosis* by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep.** *Vet. Parasitol* 2011, **182**:359-363.
18. Pimentel DS, Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Borba ML, Faustino MAG, Alves LC: **First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil.** *Veterinary Parasitology* 2012, **185**:286-289.
19. 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.* 2012, **110**:73-80.
20. 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.
21. 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.
22. Freitas Júnior JE, Rocha Júnior VR, RennóFP MelloMTP, Carvalho AP, Caldeira LA: **Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês× Zebu.** *Rev Bras Zootec* 2008, **37**:116-121.
23. 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.
24. Batista JS, Correa FR, Barbosa RC, Guerra JL: **Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep.** *Pesq. Vet. Bras.* 2006, **26**:31-37.
25. 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.

26. 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**:412-420.
27. Elhassan E, Ikede BO, Adeyemo O: **Trypanosomosis and reproduction: II. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on pregnancy and post-partum cyclicity in ewes.** *Tropical Animal Health and Production* 1995, **27**: 9-14.
28. Stephen LE: *Trypanosomiasis: a veterinary perspectiva*. Pergamon Press: New York, 1986.
29. 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.
30. Ohaeri CC, Eluwa MC: **Abnormal biochemical and haematological indices in trypanosomiasis as a threat to herd production.** *Veterinary Parasitology* 2011, **177**:199-202.
31. Weems YS, Kim L, Tsuda V, Yin C, Weems CW: **What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? Prostaglandins & other Lipid Mediators** 2007, **84**:54-65.
32. Rook JS: **Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows.** *Veterinary clinics of North America. Food Animal and Practice* 2000, **16**:203-317.
33. Kadima KB, Gyang EO, Saror DI, Esievo KAN: **Serium biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion.** *Veterinarski Arhiv* 2000, **70**:67-74.
34. Jainudeen MR, Hafez ESE: **Gestação, Fisiologia Pré-Natal e Parto.** In: Hafez ESSE: *Reprodução animal*. Editora Manole, 2000.
35. Van dam JTP, Heide DV, et al. **The effect of *Trypanosoma vivax* infection energy and nitrogen metabolism and serum metabolites and hormones in West African Dwarf goats on different food intake levels.** *Journal Animal Science* 1996, **63**:111-121.
36. Mellado M, Valdez R, Lara LM, García JE: **Risk factors affecting conception, abortion and kidding rates of goats under extensive conditions.** *Small Ruminant Research* 2004, **55**:191-198.
37. Parkinson T: **Specific infectious diseases causing infertility and subfertility in cattle.** In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England, *Veterinary reproduction and obstetrics*. London: Saunders Elsevier, 2009.

38. Nascimento EF, Santos RL: *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003.
39. Sekoni VO: **Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A Review**. *Theriogenology* 1994, **42**:557-570.
40. Wentzel D: **Non-infection abortion in Angora goats**. In: *International Conference On Goat Production And Disease: 10-15 January of 1982*. University of Arizona. Tucson, Arizona, 1982.
41. Cabral AD, Camargo CN, Galletti NTC, Okuda LH, Pituco EM, Del Fava C: **Diagnosis of Neospora caninum in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR**. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2009, **18**: 14-19.
42. Dubey JP, Buxton D, Wouda W: **Pathogenesis of bovine neosporosis**. *Journal of Comparative Pathology* 2006, **134**:267-289.
43. Losos GJ, Ikede BO: **Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by Trypanosoma congulense, T. vivax, T. rhodesiense and T. gambiense**. *Veterinary Pathology* 1972, **9**:1-71.
44. 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.
45. Melendez DR, Forlano M, Figueroa W: **Perinatal infection with Trypanosoma vivax in a calf in Venezuela**. *The Journal of Parasitology* 1993, **79**:293-294.