UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

NICHOLAS MORAIS BEZERRA

VIAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Mossoró-RN
Fevereiro de 2017

Nicholas Morais Bezerra

VIAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Tese apresentada ao Doutorado em 16 de fevereiro de 2017 do Programa de Pós-Graduação em ciência animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em ciência animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade animal

Orientador: Jael Soares Batista, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2017

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

B574v Bezerra, Nicholas Morais.
VIAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISSÃO DO Trypanosoma vivax EM CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE / Nicholas Morais Bezerra. - 2017.
61 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2017.

1. Caprino. 2. Transmissão. 3. Trypanosoma vivax. I. Batista, Jael Soares, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC´s) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

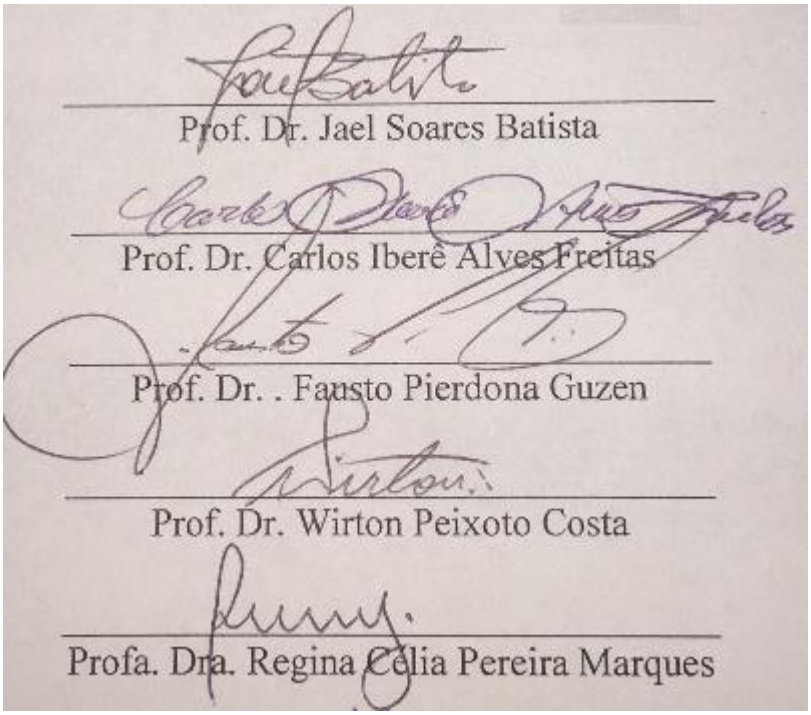
NICHOLAS MORAIS BEZERRA

VIAS ALTERNATIVAS DE TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma vivax* EM CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Tese apresentada ao Doutorado em 16 de fevereiro de 2017 do Programa de Pós-Graduação em ciência animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em ciência animal.

Defendida em: 16 / 02 / 2017.

BANCA EXAMINADORA



AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por ter estado sempre presente na minha formação em especial aos meus pais José Júnior Bezerra e Marlete Ramos de Lima Morais Bezerra

Agradeço ao meu orientador Jael Soares Batista por ter sido paciente com as minhas ausências do meu trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que souberam me confortar nos momentos de tristeza e desânimo com o excesso de tarefas.

Aos meus colegas de trabalho que sempre me incentivaram a permanecer no doutorado sempre dando dicas de como melhorar a pesquisa.

Aos meus amigos que me ajudaram em algum momento da pesquisa.

Ainda que eu tenha o dom de profecia e saiba
todos os mistérios e todo o conhecimento, e
tenha uma fé capaz de mover montanhas, mas
não tiver amor, nada serei.
1 Coríntios 13:2

RESUMO

Considerando que algumas espécies de tripanossomatídeos são capazes de serem transmitidas por via sexual e pelo colostro. Estas vias de transmissão ainda não foram comprovadas na tripanossomose provocado por *Trypanosoma vivax*, o presente estudo teve como objetivos, pesquisar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença do DNA do *T. vivax* no sêmen de caprinos infectados experimentalmente, no colostro de cabras infectadas no terço final da gestação, investigar a possibilidade da transmissão em caprinos do parasita pela via sexual do macho para a fêmea e das cabras infectadas para bezerros saudáveis através da amamentação. No experimento para testar a transmissão sexual foram utilizados seis caprinos machos, os quais foram infectadas por via intravenosa com 0,5 ml de sangue contendo aproximadamente $1{,}25 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. vivax* e seis caprinos machos que não foram infectados para serem um grupo controle. Foram coletadass de amostras de sêmen, para a pesquisa do DNA do *T. vivax* no sêmen através da realização do exame de reação em cadeia da polimerase (PCR). Seis cabras da raça saanen não infectadas por *T. vivax* foram acasaladas com os machos infectados. Para avaliar a transmissão do *T. vivax* pela via sexual, após o acasalamento as cabras foram submetidas a exames parasitológicos (esfregaço sanguíneo) e moleculares (PCR). No experimento para testar a transmissão pelo colostro foram usadas doze cabras da raça saanen, onde seis foram infectadas e seis foram usadas como controle, para observar a presença do DNA do parasita no colostro coletado após o parto, posteriormente o colostro foi ministrado para filhotes recém-nascidos de outras cabras saudáveis, depois os mesmos foram submetidos a exames parasitológicos e moleculares. A detecção do DNA de *T. vivax* (TviCatL-PCR) em amostras de sêmen pela técnica de PCR revelaram-se positivas em todos os animais e em todos períodos de observação. Também foi observado a presença do DNA do parasita em algumas amostras de colostro das cabras. Porém os resultados para as possibilidades da transmissão mostraram negativas tanto nas cabras cobertas do primeiro experimento como dos filhotes amamentados do segundo experimento. Apesar dos resultados negativos na transmissão, não podemos anular a possibilidade de transmissão sexual e pelo colostro já que outros fatores podem estar envolvidos..

Palavras-chave: Caprino. Transmissão. *Trypanosoma vivax.*

ABSTRACT

Whereas some species of trypanosomatids are capable of being transmitted by sexual intercourse and colostrum, these ways of transmission have not been proved yet through the trypanosomiasis caused by *trypanosoma vivax*. The actual study aimed to research trough the polymerase chain reaction (PCR) the presence of DNA of *T. vivax* on semen from goats infected by experiments and in the colostrum of infected goats at the last trimester of gestation. It also investigates the possibility of transmission in goats from the parasite through sexual intercourse between the male and female infected goats to those proles by breastfeeding six male goats were used in the experiment to test sexual transmission, which were intravenously infected with 0.5 ml of blood containing approximately 1.25×10^5 trypomastigotes of *T. vivax* and 6 male goats that were not infected for being a group control. It was collected some samples of semen to the *T. Vivax* DNA analysis through a polymerase chain reaction (PCR). Six not infected goats by *T. vivax*, the ones of the Saanen breed, were mated with infected males. In order to analyze the transmission of *T. vivax* through sexual intercourse, after mating, the goats were submitted to parasitological (blood smear) and molecular (PCR) tests. At the experiment to test the transmission by colostrum were used twelve goats of the Saanen breed were assessed at the trial transmission by colostrum. from this analysis, six goats were infected and the other six ones were analyzed as control to observe the presence of the parasite DNA in the colostrum collected after calving, and later, this colostrum was ministered to newborns from others healthy goats. Then, the same ones were submitted to parasitological and molecular tests. The detection of *T. vivax* DNA (TviCatL-PCR) on samples of semen by the PCR technique proved to be effective in all those animals and periods of observations. It was also observed the presence of the parasite DNA in some colostrum samples from goats. However, the results for the transmission trials on goats of the first experiment and on newborns breastfeed of the second experiment were negative. Despite the negatives results on transmission, we cannot eliminate the possibility of transmission by sexual intercourse and colostrum since others factors may be involved.

Keywords: Goat. Transmission. *Trypanosoma vivax*

Lista das figuras

Figura 1 – Principais organelas do tripanosoma. C: Cinetoplasto; N: Núcleo;F: Flagelo. (*T. vivax*)..... 18

Figura 2 – Anos das primeiras detecções do *T. vivax* nos estados brasileiros..... 20

Figura 3 – Valores médios da parasitemia e do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental..... 39

Figura 4 – Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em bodes do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental..... 40

Figura 5 – Valores médios do hematócrito em bodes do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental. 41

Figura 6 – Fragmentos de DNA com 177 pb, especifico para Trypanosoma vivax (TviCatL-PCR) e retirado do domínio do gene Catepsina L, em amostras de sêmen de caprinos do grupo infectado, visualizado em gel de agarose a 2%..... 42

Figura 7 – Valores médios da parasitemia de cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por Trypanosoma vivax e do grupo controle durante o período experimental..... 43

Figura 8 – Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por Trypanosoma vivax e do grupo controle durante o período experimental..... 44

Figura 9 – Valores médios do hematócrito em cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por Trypanosoma vivax e do grupo controle durante o período experimental..... 44

Figura 10 – Fragmentos de DNA com 177pb, especifico para Trypanosoma vivax (TviCatL-PCR) e retirado do domínio do gene Catepsina L, em amostras de colostro de caprinos sobreviventes do grupo. 45

Lista das tabelas

Tabela 1 – Resultado da presença do DNA de Trypanosoma vivax nas amostras de sêmen coletadas dos caprinos infectados.....…….....… 41

Tabela 2 – Resultados do PCR para o T. Vivax no Colostro de cabras contaminadas do grupo experimental…….....……..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T.	Trypanosoma
DPI	Dias pós-infecção
DPM	Dias pós-monta
PCR	Reação em Cadeira Polimerase
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Kg	Quilograma
BCT	giemsa-stained smears of leukocyte layers in the buffy coat technique
ºC	Graus Celsius
pb	Pares de base
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
µL	Microlitro
CatL-like	Cathepsin L-like
TviCatL - PCR	PCR específico para *T. vivax* visando sequências CatL-like

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO …… 14
2- REVISÃO DE LITERATURA..... 16
2.1 *Trypanossoma vivax* …… 16
2.2 Taxonomia de *Trypanosoma vivax*…… 17
2.3 Morfologia *Trypanosoma vivax* 17
2.4 Epidemiologia ……..18
2.5 Patogenia e sinais clínicos ……..22
2.6 Alterações hematológicas e bioquímicas……. 25
2.7 Alterações anatomopatológicas ……..25
2.8 Diagnóstico ……..27
2.9 Fisiologia da produção do sêmen ……..28
2.10 Desordens reprodutivas 29
2.11 Transmissão sexual de tripanossomatídeos ….. 30
2.12 Fisiologia da produção colostro 30
2.13 Alterações do colostro ……..31
3 OBJETIVOS…..... 32
3.1 Objetivos gerais..... 32
3.2 Objetivos específicos …… 32
4. METODOLOGIA ……..33
4.1 Comitê de ética ……..... 33
4.2 Instalações..... 33
4.3 Experimento I 33
4.3.1 Pesquisa do DNA do *T. Vivax* no sêmen ……33
4.3.2 Diagnóstico do DNA do *T. Vivax* pelo PCR ……34
4.3.3 Avaliação da transmissão do T. vivax pela via sexual do macho para a fêmea.....34
4.4 Experimento II.....35
4.4.1 Pesquisa do *T. vivax* no colostro 35
4.4.2 Transmissão do *T. Vivax* pelo colostro……...37
4.5 Estatística…….38

5. RESULTADOS……...…………….…..……………..…………….......………….............… 39
5.1 Experimento I …………………....................…….…..……….......………….........……39
5.1.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia 39
5.1.2 Pesquisa do DNA de *Trypanosoma vivax* no sêmen...41
5.1.3 Transmissão sexual do parasita..42
5.2 Experimento II………………………………......………….......................................… 43
5.2.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia 43
5.2.2 Pesquisa do Dna do parasita no sêmen..45
5.2.3Transmissão do parasita pelo colostro ………..…………………………..………….......…46
6. DISCUSSÃO.. …………………………..…………………………........…………….............47
6.1 Experimento I ………………………..……….................…......……………..........…... 47
6.2 Experimento II ……………………………..……..............………….......................... 49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....………………………………………......…………................. 52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……………………......…………...........….............. 53

1.**INTRODUÇÃO**

A tripanossomose por *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) é uma doença hemoparasitária que promove impacto negativo na saúde e produtividade em bovinos e pequenos ruminantes na África (GUTIERREZ et al., 2006). Nesse continente, a transmissão do parasita ocorre principalmente pelo vetor biológico, a mosca tsé-tsé, através da saliva. Na ausência do vetor natural, *T. vivax* se adaptou à transmissão mecânica por outros hematófagos, como tabanídeos e a mosca-de-estábulos, e com o deslocamento de animais provenientes de regiões endêmicas para não endêmicas, contribuiu para a expansão do *T. vivax* fora da África, como Américas Central e do Sul (SILVA et al., 2002). Além da transmissão por dípteros hematófagos, a transmissão mecânica de tripanosomas, pode ainda ocorrer de modo iatrogênico, através da utilização indevida de agulhas contaminadas com sangue infectado em vários animais durante a aplicação de medicamentos ou em vacinações (JONES; DÁVILA, 2001).

No semiárido do Nordeste brasileiro a transmissão transplacentária de *T. vivax* e a manifestação perinatal da tripanossomose parecem ser de relevância epidemiológica, uma vez que as altas temperaturas e baixa umidade do ar no período seco não favorecem o desenvolvimento da população de insetos vetores transmissores do parasita. Entretanto, se observa alta incidência da enfermidade, com elevadas taxas de mortalidade e letalidade, em bezerros e neonatos filhos de mães infectadas por *T. vivax* no período seco (BATISTA et al., 2012). Com isso, foram realizadas pesquisas para comprovar a transmissão transplacentária por *T. vivax*, com cepas isoladas durante surtos ocorridos no semiárido do Nordeste brasileiro, no qual se detectou DNA de *T. vivax* por Reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue e tecidos de fetos abortados e neonatos mortos, filhos de ovelhas infectadas experimentalmente com o parasita (SILVA et al., 2013).

Pesquisas demonstraram que algumas espécies de tripanossomatídeos são transmitidas por via sexual (DIAS et al., 2011; BITTAR et al., 2015). No entanto, não existem relatos que demonstrem essa via de transmissão por *T. vivax*. O primeiro relato de identificação de *T. vivax* no parênquima de órgãos reprodutivos foi feito por Bezerra et al. (2008), quando revelaram mediante a técnica da PCR, presença do DNA de *T. vivax* nos testículos de ovinos infectados experimentalmente. Os autores também observaram lesões histológicas caracterizadas por degeneração testicular, epididimite e hiperplasia epitelial epididimária nos mesmos animais e sugeriram a participação do parasita no mecanismo etiopatogênico de danos reprodutivos

frequentemente relatados em animais infectados.

Outros trabalhos mostram a transmissão de outros parasitas pelo leite materno (DIAS et al. 2011; HAMMER et al. 2016). Mas até hoje não foi verificada a presença do *T. vivax* no leite no colostro de animais, sendo assim uma possível via de transmissão ainda não estudada e uma forma de permanência do parasita no rebanho, diminuindo a produtividade.

Este projeto tem como objetivo verificar novas vias de transmissão do *Trypanosoma vivax*.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma vivax*

As espécies de trypanosomas de alta patogenicidade para animais domésticos são *Trypanosomacongolense, Trypanosoma vivax e Trypanosoma brucei* (ANOSA, 1983). Esses agentes são responsáveis por doenças em mamíferos de grande interesse econômico, especialmente bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos na África, Ásia, 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., 2007). Dentre essas espécies, acredita-se que *T. vivax* tenha sido introduzido na América do Sul em 1830, através de um carregamento de zebus oriundo do Senegal (DÁVILA; SILVA, 2000). Entretanto, o primeiro relato da enfermidade no Brasil foi registrado no Pará, onde o parasita foi identificado mediante esfregaço sanguíneo em um búfalo com sintomatologia de febre e perda de peso (SHAW; LAINSON, 1972). A tripanossomose bovina por *T. vivax*, recentemente, tem sido reportada em várias regiões do país.

A transmissão de *T. vivax* ocorre principalmente através das moscas tsé-tsé, que infestam 10 milhões de quilômetros quadrados e afetam 37 países, principalmente na África, onde é conhecida como nagana. A doença infecta várias espécies de mamíferos, mas, do ponto de vista econômico, a tripanossomose transmitida por essa espécie de mosca é particularmente importante em bovinos (RADOSTITIS et al., 2000).

A tripanossomose por *T. vivax* é uma enfermidade debilitante e comumente fatal nos animais domésticos. Acarreta perdas econômicas por provocar crescimento retardado, abortamento, infertilidade, orquite, anemia, perdas na produtividade, altos custos de tratamento e morte dos animais afetados (LOSOS, 1986; ANOSA, 1988; MARTINS et al., 2008).

A subfertilidade está presente em muitos dos rebanhos acometidos pela doença. Em fêmeas, *T. vivax* provoca abortamento, repetição de cio, queda na produção de leite, natimortos ou nascimento de crias fracas e anestro temporário ou permanente (BATISTA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2013). Em machos, patologias reprodutivas ocasionadas por *T. vivax* estão especialmente ligadas a lesões testiculares e epididimárias e à queda na qualidade do sêmen (BEZERRA et al., 2008). Nos casos crônicos da doença, infertilidade ou mesmo

esterilidade podem estar presentes (GUTIERREZ et al., 2006).

2.2 Taxonomia de *Trypanosoma vivax*

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

Esses trypanosomas são ciclicamente transmitidos pelas moscas tsé-tsé ou mecanicamente por diversas espécies de moscas hematófagas. Os trypanosomas patogênicos para ungulados pertencem à seção Salivaria, subgêneros Duttonella (*T. vivax*), Trypanozoon (*T. brucei, Trypanosoma evansi e Trypanosoma equiperdum*) e Nanomonas (*T. congolense e Trypanosoma 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 mosca tsé-tsé (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2007).

2.3 Morfologia *Trypanosoma vivax*

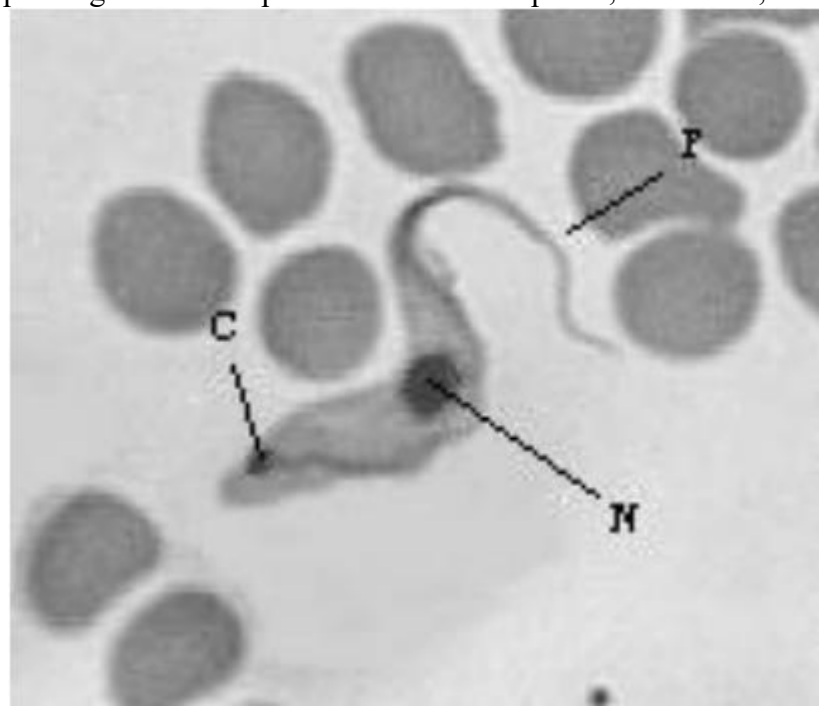
As diversas espécies de Trypanosoma podem diferir no tamanho, forma do corpo, na posição do núcleo e cinetoplasto, bem como no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (LEVINE, 1973).

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 (Figura 1) e comprimento que varia de 16 a 26μm (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 morfologicamente por apresentar comprimento entre 18 e 31μm, 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 et al. (2006) encontrou uma média de 19,42µm ±3,35, referente ao comprimento total dos trypanosomas encontrados em bovinos, que está próxima aos valores indicados por Fairbairn (1953) de 21,4 a 24,6µm para caracterizar as formas curtas de *T. vivax*, em contraste com as formas longas de 23,6 a 27,0µm.

Figura 1 – Principais organelas do tripanosoma. C: Cinetoplasto; N: Núcleo;F: Flagelo. (*T. vivax*)



Fonte: SILVA, 2002. p.25

2.4 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 tripanossomose nos animais é conhecida como nagana ou secadeira, termo genérico que abrange a infecção por *T. vivax*, *T. congolense e T. brucei* (GARDINER et al., 1989). Esse parasita causa a mais importante forma de tripanossomose em bovinos no Oeste da África e surtos agudos têm sido relatados no Leste da África (LOSOS; IKEDE, 1972).

A ampla dispersão geográfica de *T. vivax* 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, 1994). Esse parasita tem sido identificado na

América do Sul desde 1919 (LEGER; VIENNE, 1919), a teoria mais aceita é a que foi introduzido por um rebanho vindo do Senegal (África) em 1830, depois difundiu-se de um país a outro por meio de traslados de bovinos (CURRASON, 1943).

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., 2009). 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 *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 (SILVA, 2004).

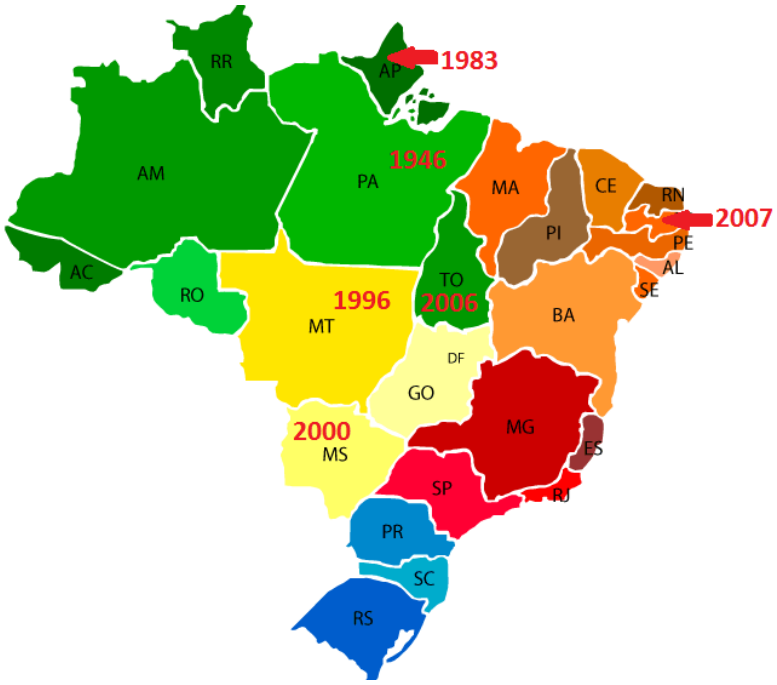
No Brasil, a ocorrência de *T. vivax* (figura 2) foi mencionada por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no estado do Pará. Posteriormente Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasita em um búfalo (*Bubalus bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram feitos também em ovinos e bovinos no Oiapoque, Amapá (SERRA FREIRE, 1981), em búfalos no Amapá (SERRA FREIRE, 1983), em bovinos do Pantanal e 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*, com diferentes índices de parasitemia, bem como relatos de casos de morte entre os animais. Por essa razão, o autor considerou como sendo patogênico o isolado encontrado. Em outros estudos no Amapá, foram descritas prevalências 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, sendo que na maior parte dos rebanhos havia animais importados dos estados do Mato Grosso e do Pará (SERRA FREIRE, 1981).

No Pantanal, estudos de Barros e Foil (1999) demonstraram que a época com mais tabanídeos ocorre na primeira metade da estação chuvosa, de setembro/outubro a 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.

Figura 2 – Anos das primeiras detecções do *T. vivax* nos estados brasileiros



Fonte: Acervo autor.

Originalmente, no Velho Mundo, *T. vivax* é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé, enquanto que no Novo Mundo conseguiu se manter 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 tripanossomose 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).

No Brasil, é importante ressaltar as diferenças das características epidemiológicas da

tripanossomose por *T. vivax* verificadas no pantanal e no semiárido nordestino. No pantanal, verifica-se o fato de que animais domésticos 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 endêmicas, 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).

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 está distribuído nessa região há muito tempo, não tendo sido previamente diagnosticado devido ao desenvolvimento, até este 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., 2009). 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 abortamento. Alguns animais que estavam na fase crônica por quatro ou seis meses apresentaram edemaciação e severa caquexia (SILVA et al., 1996).

Na Região Nordeste, o primeiro surto de tripanossomose 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).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da tripanossomose por *T. vivax* é associada a fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasita, como susceptibilidade do animal, 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).

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

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

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, abortamento, 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 é encontrado miocardite e os órgãos linfóides estão geralmente aumentados (SILVA et al., 2013).

Paiva et al. (2000) consideraram que, pelas características debilitantes da tripanossomose, 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 barbela, febre e palidez de mucosa. Embora a tripanossomose por *T. vivax* não apresente sintomatologia patognomômica, os sinais clínicos observados nos animais do rebanho foram compatíveis com o que consta na literatura referente às infecções naturais e experimentais (PAIVA et al., 2000; SCHENK et al., 2001).

Tanto machos quanto fêmeas acometidas pela tripanossomose 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 de *T. vivax* 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 existente no Brasil, sabe-se que está filogeneticamente mais relacionado com o isolado do Oeste africano do que com a existente no Leste desse país (CORTEZ et al., 2009). 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, anemia, leucopenia com linfocitose, ausência de ganho de peso e parasitemia baixa ou ausente (BATISTA et al., 2006).

Apesar da multiplicação de *T. vivax* ocorrer na corrente sanguínea, o período septicêmico é seguido pela migração extravascular do parasita (GARDINER et al., 1989), o que influi sobremaneira na fisiopatogenia das lesões inflamatórias e degenerativas descritas no coração (MASAKE, 1980) e sistema nervoso (WHITELAW et al., 1988), bem como nos órgãos reprodutivos de caprinos infectados experimentalmente por *T. vivax* (BEZERRA et al., 2008). Além disso, foram encontradas em bovinos, ovinos e caprinos alterações hematológicas e nervosas, que podem levar à morte, abortamentos e alterações na reprodução (SILVA et al., 1996; BATISTA et al., 2006, 2007, 2008).

O curso da infecção por *T. vivax* varia entre os isolados de parasitas, as espécies e raças de ruminantes hospedeiros (CORTEZ et al., 2009; 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 abortamentos (PAIVA et al., 2000). 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).

T. vivax pode provocar uma doença fatal associada a uma alta e persistente parasitemia, observando resposta imune reduzida, hemorragias e anemias em animais infectados (LOSOS; IKEDE, 1972; WHITELAW et al., 1979; ILRAD, 1984). 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 (SILVA, 2004).

Contudo, cada enfermidade pode ser controlada efetivamente com quimioterapêuticos ou quimioprofiláticos e através do controle dos artrópodes vetores (PEREGRINE, 1994).

2.6 Alterações hematológicas e bioquímicas

T. vivax é encontrado parasitando tecidos dos hospedeiros vertebrados e tem a capacidade de se multiplicar no sangue, onde encontra todos os elementos necessários para sobrevivência. Durante a infecção 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 tripanossomose por *T. vivax* (FACER et al., 1982; ANOSA, 1983; OLUBAYO; MUGERA, 1985). Gardiner et al. (1989) verificaram 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 (SAROR, 1980; GARDINER et al., 1989). A severa trombocitopenia decorre do consumo de plaquetas para a formação de microtrombos induzidos pelo parasita, sendo o principal fator responsável pela síndrome hemorrágica (OLUBAYO; MUGERA, 1985). 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).

Observa-se modificações importantes induzidas pela tripanossomose no nível sérico proteico, juntamente com a necessidade do aumento de energia para mantença após infecção, aumento sérico de ureia, excreção urinária de creatinina e perda de peso dos animais, além da elevação das proteínas plasmáticas totais (VERTEGEN et al., 1991; PAIVA et al., 2000).

2.7 Alterações anatomopatológicas

Das alterações anatomopatológicas mais comuns ocasionadas por *T. vivax* 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 pericárdico e aumento de volume dos gânglios linfáticos (STEPHEN, 1986). Importante referir que em infecções por *T. vivax* pode não ocorrer alterações anatomopatológicas, e quando ocorrem são geralmente inespecíficas (LOPES et al, 2016).

A distribuição e severidade das lesões provocadas por *T. vivax* em bovinos e caprinos são similares às de outras tripanossomoses, como, por exemplo, o comprometimento cardíaco é 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 (MASAKE, 1980). A severidade das lesões inflamatórias pode estar correlacionada com a localização extravascular do parasita (KIMETO et al., 1990).

A tripanossomose 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 alguns casos, 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; WHITELAW et al., 1988; CADIOLI, 2006; BATISTA et al., 2007, 2011b). Lesões semelhantes não têm sido descritas na tripanossomose por *T. vivax* em infecções naturais (LOPES et al., 2016). 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*.

Embora o sítio de multiplicação de *T. vivax* seja preferencialmente no sangue, ocasionalmente, o período septicêmico é seguido pela migração extravascular do parasita (GARDINER et al., 1989). Este fato tem grande importância na fisiopatogenia das lesões inflamatórias e degenerativas descritas no coração (MASAKE, 1980), sistema nervoso (WHITELAW 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 (ISOUN, 1975; MWONGELA et al., 1981; ANOSA, 1983; OLUBAYO; MUGERA, 1985; GARDINER et al., 1989). Em conjunto, essas características são as principais causas de morte dos animais (MURRAY et al., 1979).

A base histológica da lesão provocada por *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 pelo parasita.

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico de infecções causadas 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 (SILVA, 2013).

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 (HOPKINS et al., 1998). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são os métodos sorológicos mais comumente utilizados para o diagnóstico de tripanossomoses em seres humanos e animais, e apresentam sensibilidade variável que, na maioria das vezes, não identifica as diferentes espécies de trypanosomas (HOPKINS 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 de *T. vivax* com T. evansi e Trypanosoma theileri.

Recentemente, foi desenvolvido um ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (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 e do oeste e leste da África e na detecção do parasita em tecidos de animais infectados experimentalmente (CORTEZ et al., 2009; BATISTA et al., 2011a). Portanto, o diagnóstico deve contar com técnicas diretas que confirmem a presença de tripanosomas, como a

visualização microscópica ou com técnicas sorológicas indiretas e PCR (LOPES et al., 2016).

Clinicamente, a tripanossomose pode ser confundida com babesiose, anaplasmose, teileriose, haemonchosi, raiva ou intoxicações por plantas. O diagnóstico diferencial é orientado por observações clínicas, pela evolução e contexto epidemiológico, mas que se baseia essencialmente no diagnóstico laboratorial (SILVA, 2012).

O diagnóstico direto pode ser realizado pelos métodos do aspirado do linfonodo, da gota espessa, da lâmina delgada, pelo método do micro-hematócrito e da técnica de Woo, consistindo na observação direta das formas sanguíneas 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 das formas dos parasitas no sangue, uma vez que três espécies de trypanosomas podem ser encontradas com frequência em ruminantes no Brasil, muitas vezes em infecções mistas: *T. vivax, T. evansi e T. theileri* (LUCHEIS, 2014).

Outro fator bastante limitante no diagnóstico das 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; DÁVILA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2013; CORTEZ et al., 2009).

2.9 Fisiologia da produção do sêmen

Nos testículos, são observados dois compartimentos principais que diferem entre si, tanto anatomicamente quanto funcionalmente: o compartimento dos túbulos seminíferos e o espaço intersticial. O tecido intersticial é responsável pela função endócrina, onde estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo e uma população variável de outras células. A maior parte do parênquima testicular é composta por túbulos seminíferos, no caso de caprinos ele corresponde a cerca de 80% do total (THIBAULT; LEVASSEUR, 1992).

Nos túbulos seminíferos, constituindo o chamado epitélio seminífero, encontram-se as células germinativas em seus vários estágios de desenvolvimento e as células de suporte, denominadas de células de Sertoli. É no interior desses túbulos que ocorre a espermatogênese (CASTRO et al., 1997).

As células de Sertoli são interconectadas por tight junctions localizadas em regiões basais dos túbulos seminíferos, formando uma barreira hemato-testicular funcional, delimitando assim dois compartimentos anatômicos e funcionais nos túbulos seminíferos: um compartimento basal contendo gametas em estágios iniciais e um compartimento preenchido por gametas em estágios posteriores. Durante o processo de maturação, os gametas do compartimento basal deslocam-se para o compartimento central. (BANKS, 1992)

Segundo (CUNNINGHAM, 2014), o sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreção dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão que é formada na ejaculação é conhecida como plasma seminal.

2.10 Desordens reprodutivas

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

No Pantanal mato-grossense e na Bolívia, Silva et al. (2004) relataram abortamentos em bovinos e observaram que a anemia acompanhada de abortamentos no terço final da gestação é um sinal clínico característico da tripanossomose nessas regiões. Ovinos e caprinos também podem apresentar abortamentos e elevada mortalidade em cordeiros, quando infectados por *T. vivax* (OSAER et al., 1999). Em touros, *T. 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) estudaram os efeitos da infecção experimental por *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 *T. vivax*. Os animais foram orquiectomizados 30 dias após a infecção. Macroscopicamente os testículos apresentaram-se flácidos e pálidos. Na histologia,

observaram 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. Abortamentos, repetição de cio, natimortos ou nascimento de crias fracas e anestro temporário ou permanente são alterações relatadas com frequência (SILVA et al., 2004; BEZERRA et al., 2008; BATISTA et al., 2007, 2008). Além disso, Trypanosoma induz a morte fetal, distocia, abortamento, morte neonatal e outros efeitos patogênicos no feto e no recém-nascido (SEKONI, 1994).

2.11 Transmissão sexual de tripanossomatídeos

A questão da transmissão sexual de tripanossomatídeos é um assunto discutido desde sua descoberta, entretanto há poucos trabalhos publicados. O primeiro relato foi feito por Vianna (1911), quando observou que os testículos são afetados pelo *T. cruzi*, descrevendo diversas alterações histológicas.

A migração dos tripanossomatídeos para o fluido seminal pode ocorrer pela contração das células mióides, havendo a liberação de formas amastigotas para os ductos seminíferos (CARVALHO et al., 2009).

Em 2010, Hecht et al. demonstraram a presença de DNA nuclear do *T. cruzi* no sêmen de indivíduos infectados, fortalecendo a hipótese de transmissão via sexual do parasita.

2.12 Fisiologia da produção colostro

O colostro pode ser definido como uma forma de leite de baixo volume que começa a ser produzido nas últimas semanas de gestação e que será secretado nos primeiros dias da amamentação pós-parto. Entre outros fatores, o colostro representa a única fonte de água, anticorpos, proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas que o recém-nascido terá acesso durante seus primeiros dias de vida. O colostro contém ainda fatores precursores de enzimas que possuem alta capacidade de degradar proteínas, e um outro fator que impede a ação destas enzimas sobre os anticorpos, garantindo, dessa maneira, que as imunoglobulinas sejam absorvidas intactas,

preservando sua função biológica (SANTANA et al., 2003).

No entanto, para que as crias possam se beneficiar dos efeitos imunológicos do colostro o consumo deve ser realizado nas primeiras horas após o nascimento. Segundo Cunningham (2014), os neonatos têm um tempo limitado de 24 a 36 horas após o parto durante o qual as imunoglobulinas do colostro podem ser absorvidas através do intestino dos recém-nascidos. Passado esse período inicial ocorre o bloqueio da absorção intestinal, culminando com a falha na transferência de imunidade da mãe para os filhotes.

De uma forma geral, ovinos e caprinos devem receber de 5% a 15% do seu peso vivo de colostro fresco e de boa qualidade durante as primeiras 12 horas de vida. Como salientado anteriormente, a absorção de anticorpos se reduz drasticamente em função do tempo, sendo que provavelmente não ocorra uma transferência eficiente de imunoglobulinas quando a cria mama após 24 horas do nascimento (MOBINI et al., 2002).

2.13 Alterações do colostro

O primeiro relato da transmissão oral do *T. cruzi* em humanos foi descrito em 1936 por Mazza, depois outras pesquisas confirmaram a transmissão de tripanossomatídeos através do colostro e leite materno (AMATO NETO et al., 1992; DIAS et al., 2011; CAMPIGOTTO et al., 2015). No entanto, não existem relatos que demonstrem presença de tripomastigotas de T. vivax no colostro de animais infectados ou que comprovem a transmissão de infecção através do colostro. A possibilidade da transmissão oral de *T. vivax* foi demonstrada em 1971 por Diaz-Ungria. Nesse estudo, sangue contendo *Trypanosoma vivax* foi administrado via oral a algumas cabras, as quais ficaram infectadas e chegaram a óbito. Dessa forma, o risco do lactente adquirir a infecção por esta via, precisa ser investigada.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

-Verificar novas vias de transmissões do *Trypanosoma vivax* na espécie caprina.

3.2 Específicos

-Identificar através da técnica Reação em Cadeia de Polimarase (PCR) a presença do DNA do *Trypanosoma vivax* no sêmen de caprinos infectados.

-Investigar a possibilidade da transmissão *do T. vivax* pela via sexual do macho para a fêmea de caprinos durante a cópula.

-Identificar através da técnica Reação em (PCR) a presença do DNA do *T. vivax* no colostro de cabras infectadas.

-Investigar a possibilidade da transmissão do *T. vivax* em neonatos amamentados com colostro de cabras infectadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Comitê de ética

Este estudo foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) - número 41/2011 e respeitou todos os princípios éticos de proteção animal, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Auroca Lei N °. 11.794.

4.2 Instalações

O experimento foi realizado no Núcleo de Pesquisas de Ovinocaprinos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró/RN. As fases do experimento foram divididas de acordo com os objetivos específicos traçados, conforme adiante.

4.3 Experimento I

4.3.1 Pesquisa do DNA do *T. vivax* no sêmen

Foram utilizados 12 caprinos machos, sem raça definida, com idade aproximada de um ano. Os animais foram mantidos em baias do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Por 14 dias antes da inoculação do *T. vivax*, os caprinos foram avaliados através de exames clínicos e hematológicos e dosificados com anti-helmínticos. Os animais foram sorteados aleatoriamente para a composição dos grupos experimentais, assim caracterizados: grupo experimental, formado por seis caprinos infectados experimentalmente por *T. vivax*, com 1ml de sangue, por via intravenosa, contendo aproximadamente $1,25x10^5$ tripomastigotas de *T.vivax*. O grupo controle foi composto por seis caprinos não infectados.

Todos os animais foram submetidos a condições de manejo idênticas, alimentados com água à vontade, feno de capim tifton e ainda suplementados com ração comercial na quantidade de 1,5% de peso do animal por dia.

Nos caprinos dos grupos experimental e controle foram realizados diariamente a

determinação da parasitemia de acordo com o método de Brener (1961), bem como exames clínicos para avaliar a temperatura retal, aspectos das mucosas aparentes e análise dos linfonodos periféricos. Concomitante aos exames clínicos foi colhido sangue através de punção da veia jugular, acondicionados em tubos esterilizados contendo 1mg/ml de EDTA para determinação do hematócrito.

Antes da infecção (para confirmação do estado sanitário dos animais) e nos dias 7 º, 14 º e 21º dias após a infecção (DPI) foram realizados nos animais dos dois grupos coletas de amostras de sêmen, pelo método artificial, com o uso de um eletroejaculador (Eletrojet®, Eletrovet, São Paulo, SP, Brasil), conectado a uma fonte de 12V, promovendo-se três ciclos sucessivos de estimulação, com 5min de intervalo entre ciclos. 1,0ml do ejaculado de cada animal foi transferido para tubos Eppendorf estéreis misturados a 1ml de álcool a 99% para a pesquisa do DNA do *T. vivax* no sêmen através da realização do exame de reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.3.2 Diagnóstico do DNA do *T. vivax* pelo PCR

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 baseia-se em sequências repetidas do gene que codifica a cisteína proteases (catepsina L) e foi realizado usando os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5 'GCCATCGCCAAGTACGCCCTCAG 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3 ') como primers. O diagnóstico foi confirmado através do PCR, amplificando um fragmento de DNA de aproximadamente 177 pb (pares de base), que também é observado no DNA de *T. vivax* (isolado do Pantanal), que foi utilizado como controle positivo. Para controle negativo foram selecionados previamente amostras de DNA do sangue de cabras não infectadas (CORTEZ et al., 2009).

Uma alíquota de 25µl de cada amostra amplificada foi examinada em gel de agarose a 2,0%, corado com Brometo de Etídio e fotografado usando um sistema de documentação de gel sob luz ultra-violeta. Foi usado como marcador do peso molecular 100pb DNA-ladder.

4.3.3 Avaliação da transmissão do *T. vivax* pela via sexual do macho para a fêmea

Foram utilizadas 6 cabras da raça Saanen, com idade média de 24 meses e peso médio de

52,4 Kg, sorologicamente negativas para o anti-*T. vivax* (IFAT) e com ausência de patologias reprodutivas comprovadas por exames ginecológicos. Para confirmar a transmissão de *T. vivax* pela via sexual, os animais foram distribuídos em 3 grupos sendo duas fêmeas colocadas para acasalar com dois machos infectados experimentalmente, o primeiro grupo no 8º DPI, o segundo 15º DPI e o terceiro no 22º DPI.

As cabras foram submetidas ao tratamento hormonal clássico para a indução e sincronização de estro, utilizando esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de progesterona sintética (acetato de medroxiprogesterona), conforme descrito por Castilho et al. (2013). Depois da retirada dos dispositivos intravaginais e detectados sinais evidentes de estro, as cabras foram transportadas para as baias contendo os machos, para a realização da cobertura pelo reprodutor, com intervalo de aproximadamente 12 horas, durante dois dias, afim de aumentar as possibilidades de ejaculações.

O comportamento sexual dos machos infectados por *T. vivax* foi avaliado individualmente no momento da cópula, sendo verificados os seguintes parâmetros: cheirada da região urogenital da fêmea, reflexo de Flehmen, exposição de pênis, tentativa de monta e monta completa. Posteriormente, cada animal recebia de acordo com suas atitudes, escores que variaram de 0 a 5, em que 0 corresponde a nenhum interesse pela fêmea e 5 a monta completa, de acordo com a metodologia proposta por Almeida et al. (2010).

Para diagnosticar a infecção das cabras, após o acasalamento foram coletadas diariamente, por um período de 21 dias, amostras de sangue da veia jugular e realizado giemsa-stained smears of leukocyte layers in the buffy coat technique (BCT). Realizou-se também, pesquisa do DNA de *T. vivax* no sangue das cabras coletadas no 21º dia pós monta (DPM) using a *T. vivax*-specific PCR assay as described before (CORTEZ et al., 2009).

4.4 Experimento II

4.4.1 Pesquisa do *T. vivax* no colostro

Foram utilizadas 12 cabras, no terço final da gestação, SRD, com idade aproximada de 24 meses. Os animais foram alojados em duas baias, sendo uma baia destinada aos caprinos do grupo infectado experimentalmente, devidamente telada, e outra destinada ao grupo controle. Foram

realizados exames ultrassonográficos para verificação da gestação.

O diagnóstico do período de gestação foi realizado através de exames ultrassonográficos com equipamento de ultrasson GE Logiq Pro 100 (GE Medical System, Wisconsin, USA) acoplado a um transdutor convexo de 3.5 MHz, ressaltando-se que as cabras selecionadas se apresentavam entre 100 e 120 dias de gestação.

Aproximadamente 15 dias antes da inoculação do *T. Vivax*, todos os animais foram submetidos a exames clínicos, hematológicos, parasitológico e testados com ELISA para detecção por anticorpos anti-igG por ensaio indireto de imunofluoroscência (IFA) de acordo com a metodologia de Silva er al. (2002). As cabras comprovadas clinicamente saudáveis e sorologicamente saudáveis para a pesquisa anti-*T.vivax*, foram distribuídas randomicamente em dois grupos: o grupo das cabras infectadas (cabras 1 a 6) e o controle de cabras não infectadas (cabras 7 a 12). Todos os animais foram submetidos a condições de manejo idênticas, água e sal mineral ad libidum, alimentados com capim tifton (Cynodon spp.) e suplementados com ração comercial na quantidade de 1,5% de peso do animal, por dia.

O isolado de *T. vivax* que foi empregado na infecção experimental das cabras prenhas é proveniente de um surto de infecção natural, no município de Catolé do Rocha, 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 do grupo infectado foi inoculado por via intravenosa 0,5ml de sangue contendo aproximadamente 1,25 x 10^5 tripomastigotas de *T. vivax*, estimados de acordo com o método de Batista et al. (2007).

Diariamente foram realizados nos animais dos grupos controle e infectado exames clínicos, sendo avaliados temperatura retal, aspecto das mucosas aparentes e volume dos linfonodos externos à palpação. Concomitante aos exames clínicos, foi determinado pesquisa do tripanosoma no sangue coletado de pequenas veias localizadas no pavilhão auricular, usando uma gota espessa de sangue entre a lâmina e lamínula, de acordo com a técnica descrita por Batista et al. (2007).

O colostro das cabras do grupo infectado por *T. vivax* foi coletado entre 12, 24 e 48 horas após o parto, acondicionado em tubos estéreis, devidamente rotulados e identificados com o número do animal.

Para averiguação da presença de *T. vivax* no colostro, realizou-se uma alíquota de 5µ de colostro disperso em lâmina de microscopia, sob lamínula de 22 x 22 mm e pesquisado formas tripomastigotas em 100 campos microscópicos, sob objetiva de 40x, conforme descrito por Brener (1961). Também se realizou o preenchimento de um tubo capilar com a amostra do colostro de cada cabra, os quais foram centrifugados a 10.000 rotações por minuto por cinco minutos e realizada a leitura em microscópio de luz para visualização dos parasitos, na interfase entre a parte líquida e sólida do colostro.

Foi coletado 1,0ml de colostro de cada animal, posteriormente acondicionados em microtúbulos estéreis misturados a 1,0 ml de álcool a 99%, para a pesquisa do DNA de *T. vivax* através da realização da PCR.

As preparações de DNA foram submetidas a um ensaio altamente específico para *T. vivax* que foi descrito por Cortez et al. (2009). A PCR foi usada para amplificar uma região de 177 pb (pares de bases) no domínio catalítico do gene da Catepsina L, específica para *T. vivax* e conservada entre diferentes amostras do parasita, através dos primers Tvi2 (forward) e DTO156 (reverse). As PCRs foram realizadas de acordo com o método previamente descrito por Ventura et al. (2001).

4.4.2 Transmissão do *T. Vivax* pelo colostro

Foram utilizados seis caprinos neonatos, SRD, filhos de cabras do grupo controle, sorologicamente negativo para anti-*T. vivax* (IFA). Este procedimento teve por finalidade medir possível infecção do feto por *T. vivax* por via hematogênica através da placenta.

Os cabritos foram alimentados por via oral, através de mamadeiras contendo colostro obtido das cabras do grupo infectado por *T. vivax*. Todos os cabritos foram alimentados nas primeiras horas após o nascimento, administraram-se para cada animal a quantidade de 20% de seu peso vivo. No total, cada cabrito recebeu quatro mamadeiras de colostro, com três horas de intervalo entre elas, sempre das mesmas doadoras. Após o período de alimentação com colostro, as crias receberam um sucedâneo lácteo para cabritos.

Para confirmação da infecção dos cabritos via colostro, foram coletadas diariamente por um período de 30 dias amostras de sangue por meio da veia jugular, cada animal foi diagnosticado por exame de esfregaço manchados com giemsa de camadas leucocitárias na técnica de revestimento leucocitário (BCT). O diagnóstico parasitológico dos animais foi confirmado usando

a *T. vivax*- especifico PCR o ensaio foi descrito por (CORTEZ et al., 2009).

4.5 Estatística

Os dados foram submetidos a estatística descritiva sendo expressos em média ±, desvio padrão bem como frequência, valores mínimos e máximos avaliados pelo programa estatístico Statistical Package for Social Science (SPSS), versão 22.0 (SPSS. Inc, Chicago, IL, EUA).

Diferenças estatísticas quanto a presença de Tripanossoma no sêmen, colostro, entre o grupo experimental e controle foi feito pelo teste exato de Fisher. Para análise do perfil do sêmen, os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk e homocedasticidade por Levene

Sempre quando necessário foi utilizado transformação logarítmica para garantir os pressupostos paramétricos.

5 RESULTADOS

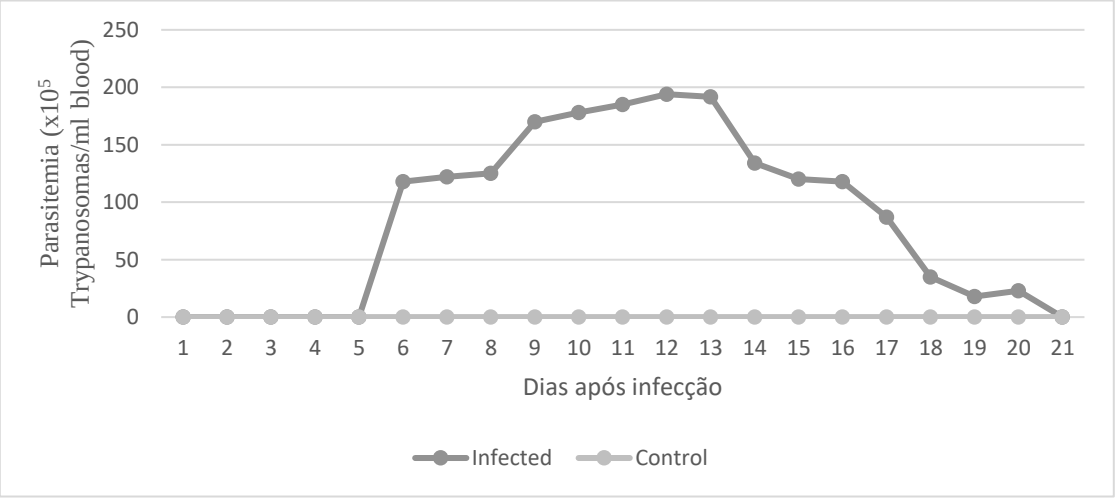
5.1 Experimento I

5.1.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia

Todos os caprinos do grupo G1 apresentaram do 09º DPI até o final do período experimental: anorexia, palidez das mucosas, hipertrofia dos linfonodos e perda progressiva de peso. Um caprino pertencente a este grupo apresentou agravamento do quadro clínico sendo observado prostração, fraqueza, letargia, anemia severa e posteriormente veio a óbito no 17º DPI.

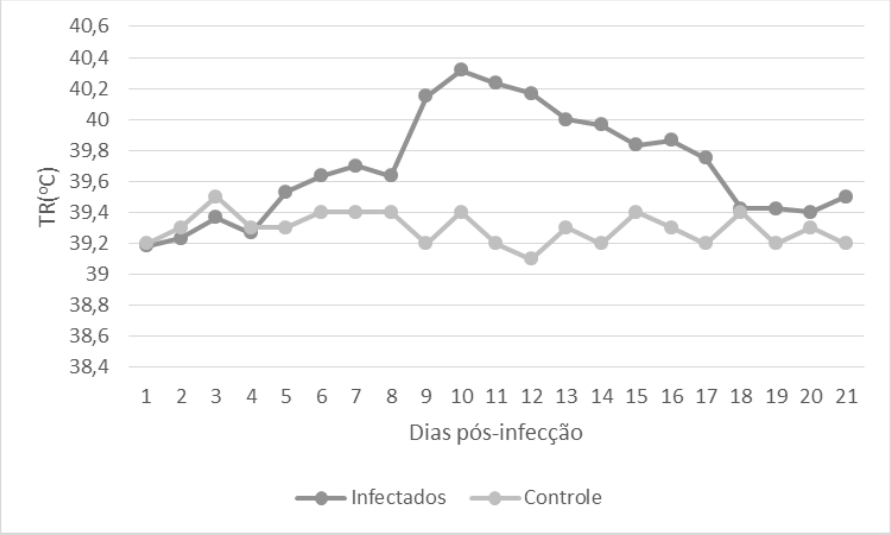
A presença de trypanosomas no sangue periférico foi observada em todos os animais do grupo experimental, a partir do 06º dia pós infecção (DPI). Os maiores picos parasitêmicos foram observados entre o 09º e 13º DPI. No 17º houve uma diminuição da parasitemia. A partir desse período, houve redução drástica da parasitemia, tornando-se de baixa intensidade com redução gradual, de modo que a partir do 21º DPI não foi detectado parasitemia em nenhum dos animais do referido grupo (Figura 3).

Figura 3 –Valores médios da parasitemia e do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental.



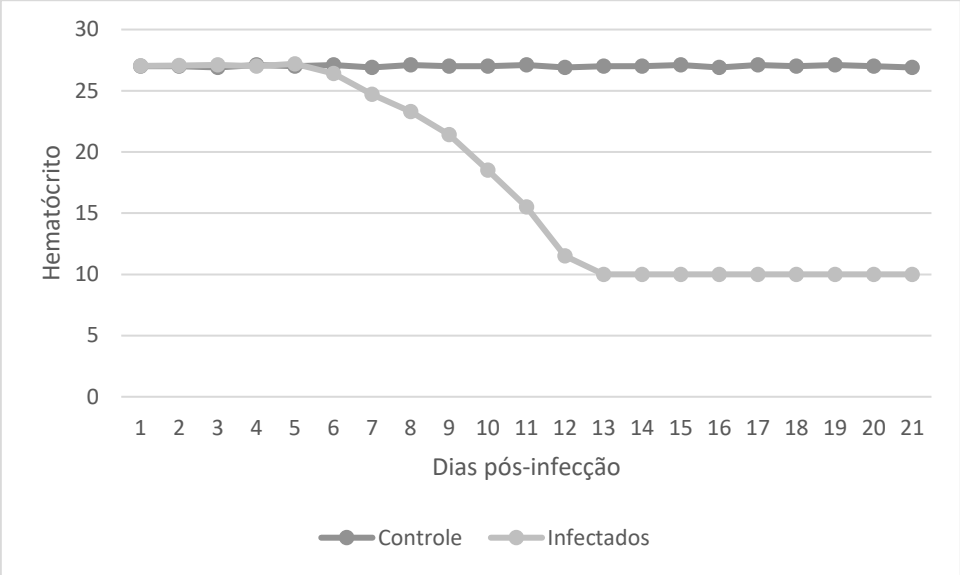
Os caprinos do G1 apresentaram aumento significativo (P<0,05) da temperatura retal em relação ao grupo controle (G2) entre o 09º e o 17º DPI. Nos outros períodos, a temperatura retal manteve-se dentro dos parâmetros normais para a espécie e não diferiu significativamente quando comparado com o grupo G2 (P>0,05) (Figura 04). A partir 05º DPI, os caprinos do grupo experimental apresentaram redução significativa dos valores médios de hematócrito, que persistiu até o final do período experimental. Os valores do hematócrito nos animais do grupo G2 permaneceram dentro da normalidade para a espécie durante o período experimental (Figura 5).

Figura 4 – Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em bodes do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental



Dois caprinos do grupo experimental (animal n. 5 e 6) apresentaram respectivamente, a partir 13º e 12º DPI anemia severa (hematócrito de 10,0%), além de prostração, fraqueza, letargia, permanência em decúbito e relutância em caminhar. Houve agravamento do quadro clínico, sendo que um dos animais morreu no 15º DPI (animal n. 6) e o outro no 17º DPI (animal n. 5).

Figura 5 – Valores médios do hematócrito em bodes do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental.



5.1.2 Pesquisa do DNA de *Trypanosoma vivax* no sêmen

A detecção do DNA de *Trypanosoma vivax* (TviCatL-PCR) em amostras de sêmen pela técnica de PCR revelaram-se positivas em todos os caprinos sobreviventes do grupo G1 (tabela 1) no 21º DPI, ou seja, fragmentos de DNA com 177pb, específico para *T. vivax*, e retirado do domínio do gene Catepsina L, foram visualizado em gel de agarose a 2% (Figura 6).

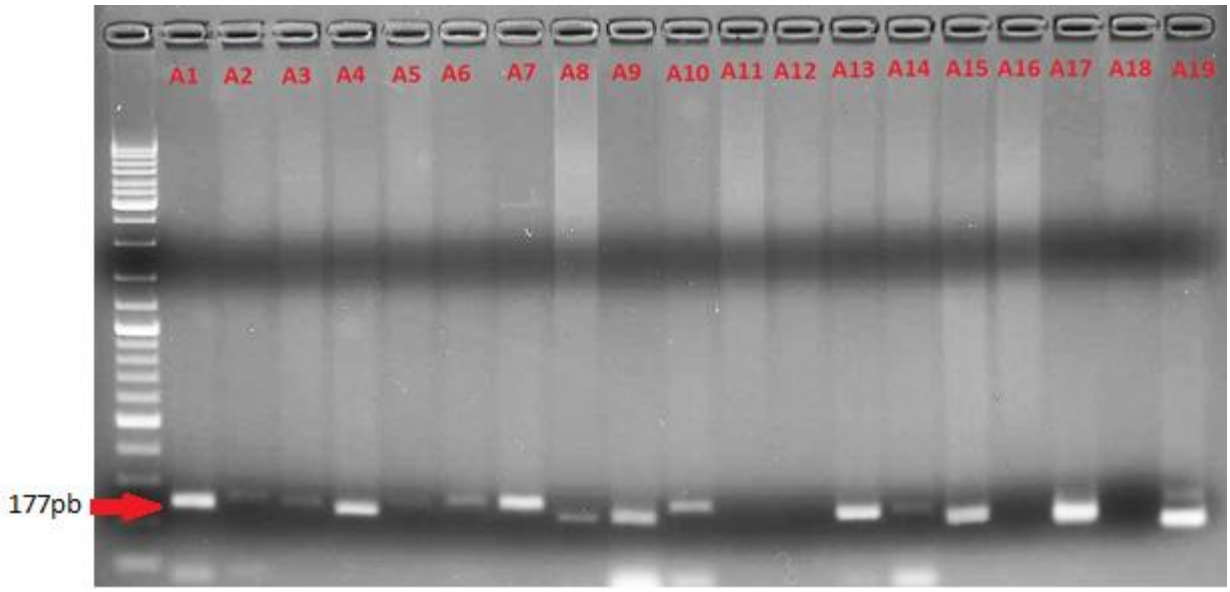
Tabela 1 - Resultado da presença do DNA de *Trypanosoma vivax* nas amostras de sêmen coletadas dos caprinos infectados

Animais	Dia 00	Dia 07	Dia 14	Dia 21
01	-	+	+	+
02	-	+	+	+
03	-	+	+	+
04	-	+	+	+
05	-	+	+	x

- = Caprinos negativos na PCR para *T. vivax* . + = Caprinos positivo na PCR para *T. vivax* . x = Óbito de caprinos.

Enquanto os animais do G2 todos apresentaram resultados negativos no PCR, confirmando a ausência de sinais clínicos mencionados anteriormente

Figura 6 – Fragmentos de DNA com 177 pb, especifico para *Trypanosoma vivax* (TviCatL-PCR) e retirado do domínio do gene Catepsina L, em amostras de sêmen de caprinos do grupo infectado, visualizado em gel de agarose a 2%.



Fonte: Acervo autor. Amostras de coletas do dia 00 estão marcadas com as setas A5 = animal 1, A11 = animal 2 , A12 = animal 3, A16 = animal 4 e A18 = animal 5. Amostras de coletas do dia 07 estão marcadas com as setas A4 = animal 1, A10 = animal 2, A1 = animal 3, A2 = animal 4 e A3 = animal 5. Amostras de coletas do dia 14 estão marcadas com as setas A6 = animal 1, A7 = animal 2, A8 = animal 3, A9 = animal 4 e A13 = animal 5. Amostras de coletas do dia 21 estão marcadas com as setas A14 = animal 1, A15 = animal 2, A17 = animal 3 e A19 = animal 4.

5.1.3 Transmissão sexual de *Trypanosoma vivax*

Três caprinos pertencentes ao grupo experimental (animais n. 1, 2, 4) apresentaram escore 5, quando expostos à presença da fêmea em cio, ou seja, os animais demonstraram interesse pelas fêmeas, indicando reconhecimento das fêmeas no estro, tentativa de monta e monta completa. Dois caprinos do referido grupo (animais 3 e 5), apresentaram escore 0, pois não demonstraram interesse pela fêmea, com ausência de montas.

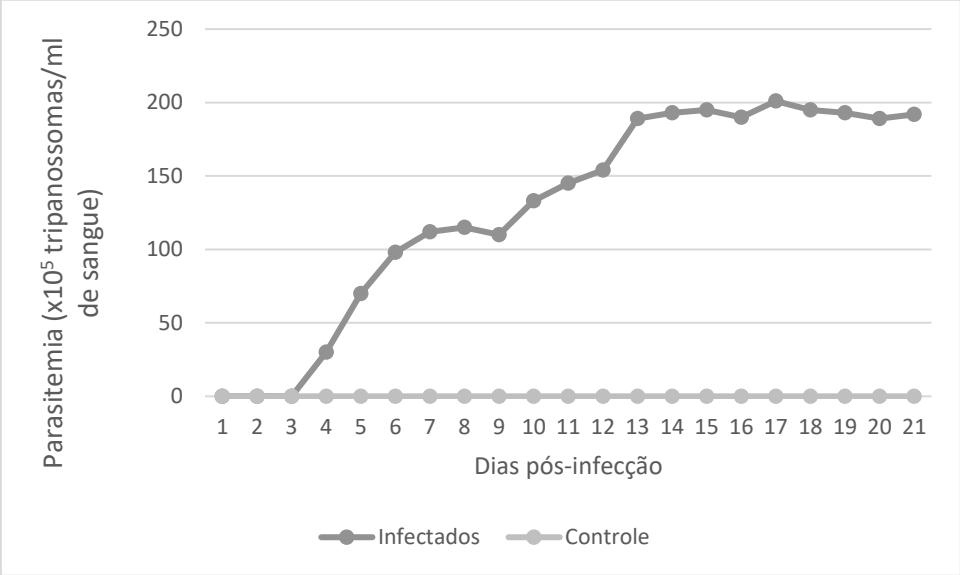
Na pesquisa diária para detectar *T. vivax* no sangue das cabras que foram cobertas pelos machos infectados experimentalmente, verificou-se que *T. vivax* estava ausente nos esfregaços da camada leucocitária coradas com giemsa. Resultados da PCR no sangue dos referidos animais também se revelaram negativas.

5.2 Experimento II

5.2.1 Exames clínicos e determinação da parasitemia

A presença de trypanosomas no sangue periférico foi observada em todos os animais do grupo infectado a partir do 4º DPI. A parasitemia aumentou progressivamente, alcançando picos no 13° e 21° DPI (figura 7).

Figura 7 –Valores médios da parasitemia de cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental.



As cabras do referido grupo apresentaram hipertermia ciclicamente interrompida por períodos de temperatura normal (figura 8), além de redução do escore corporal e mucosas hipocoradas, com diagnóstico da anemia confirmado com a centrifugação (figura 9). Três cabras pariram cabritos pequenos e fracos, sendo que dois morreram nos primeiros dias de vida. As cabras do grupo controle apresentaram temperatura retal dentro da normalidade para a espécie e não manifestaram os sinais clínicos descritos para as cabras do grupo infectado.

Figura 8 – Valores médios das temperaturas retais (TR) em °C em cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental

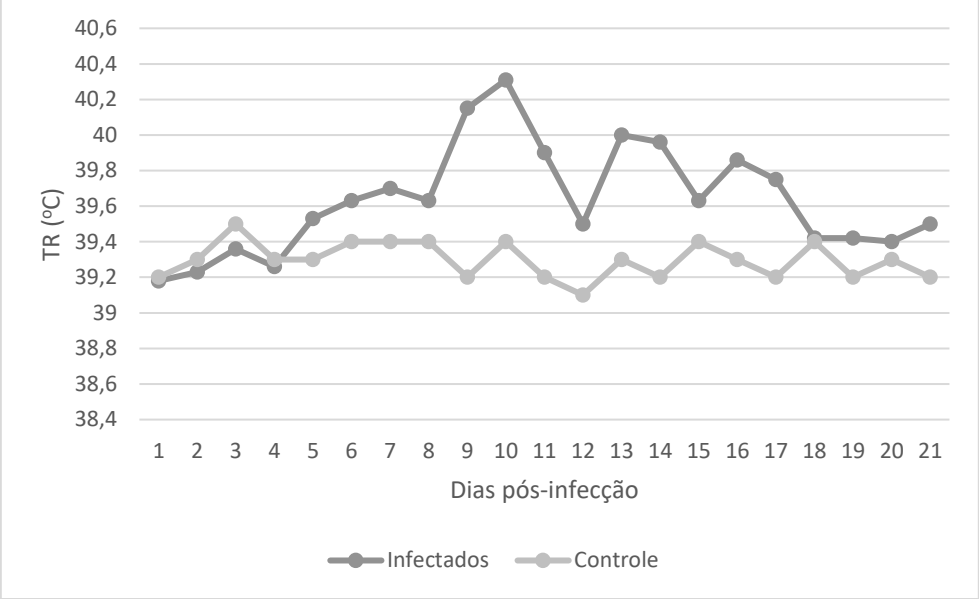
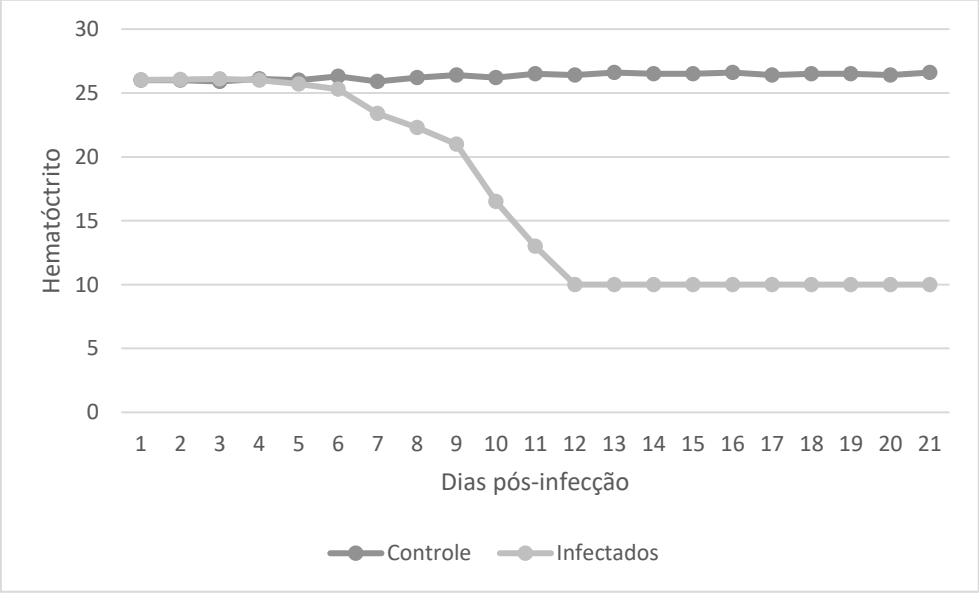


Figura 9 – Valores médios do hematócrito em cabras do experimento II do grupo experimentalmente infectado por *Trypanosoma vivax* e do grupo controle durante o período experimental.

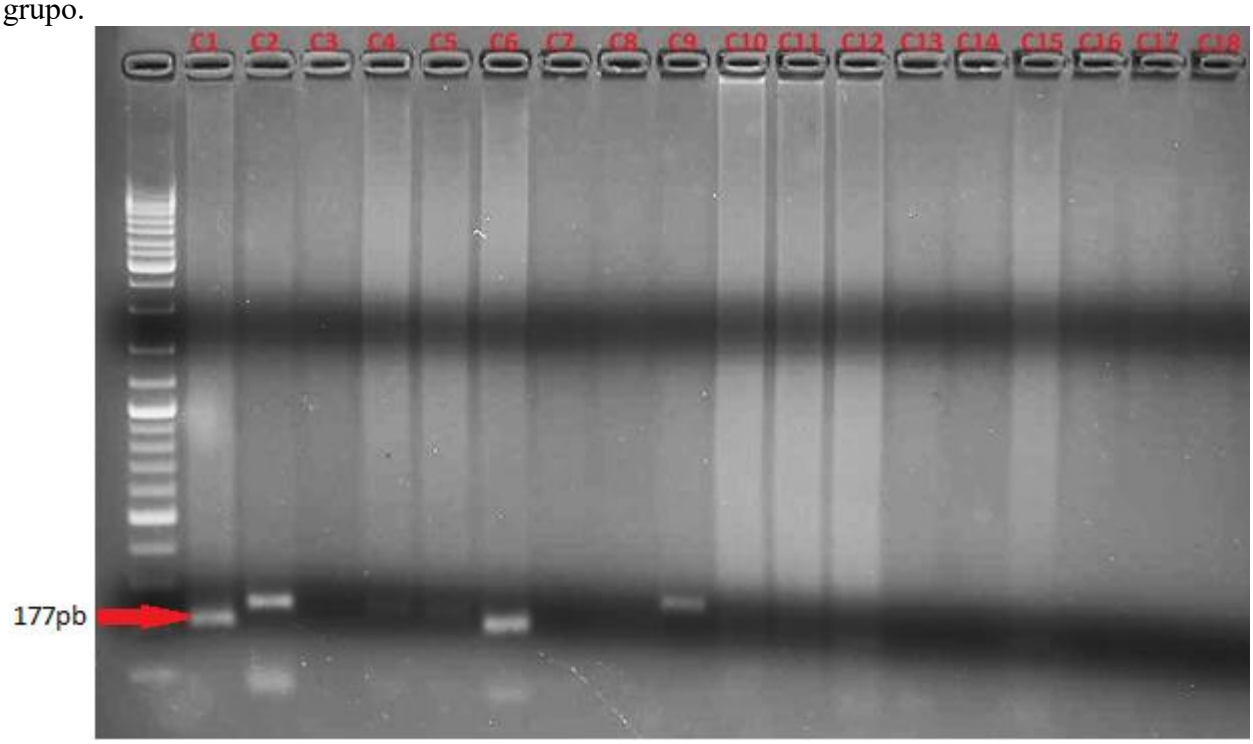


5.2.2 Pesquisa de *Trypanosoma vivax* no colostro

Não se observou no exame parasitológico direto presença de tripomastigotas em amostras do colostro, montado entre lâmina e lamínulas, bem como não se visualizou o parasita na interfase da parte líquida e sólida do colostro após centrifugação em tubos de microhematócrito e observação em microscopia ótica.

A detecção do DNA de *T. vivax* (TviCatL-PCR) das amostras de colostro pela técnica de PCR revelaram-se positivas em todas as cabras, ou seja, fragmentos de DNA de 177pb, específico para *T. vivax* e retirado do domínio do gene Catepsina L, foram visualizados em gel de agarose a 2% (figura 10).

Figura 10 – Fragmentos de DNA com 177pb, especifico para *Trypanosoma vivax* (TviCatL-PCR) e retirado do domínio do gene Catepsina L, em amostras de colostro de caprinos sobreviventes do grupo.



Fonte: Acervo autor. Amostras de coletas do colostro de 12h estão marcadas com as setas C1 = cabra 1, C2= cabra 2, C3 = cabra 3, C4 = cabra 4, C5 = cabra 5 e C6 = cabra 6. Amostras de coletas do colostro de 24h estão marcadas com as setas C7= cabra 1, C8= cabra 2, C9 = cabra 3, C10 = cabra 4, C11 = cabra 5 e C12 = cabra 6. Amostras de coletas do colostro de 48h estão marcadas com as setas C13 = cabra 1, C14 = cabra 2, C15 = cabra 3, C16 = cabra 4, C17 = cabra 5 e C18 = cabra 6

O colostro de cinco animais que foram coletados 12h após o parto revelou-se positivo. Nos colostros coletados 24h após o parto, uma cabra apresentou resultado positivo sendo que o referido animal apresentou PCR negativo na avaliação anterior. Quanto às amostras analisadas com 48h todas se revelaram negativas (Tabela 02).

Tabela 02 - Resultados do PCR para o *T. Vivax* no Colostro de cabras contaminadas do grupo experimental

Cabra	Colostro 12h	Colostro 24h	Colostro 48h
1	+	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-

+ = positivo, - = negativo

5.2.3Transmissão de *Trypanosoma vivax* através do colostro

Na avaliação diária realizada no decorrer de 30 dias nos cabritos que mamaram o colostro de doadoras infectadas, verificou-se que *T. vivax* estava ausente nos esfregaços da camada leucocitária coradas com giemsa. Resultados da PCR realizada no sangue dos referidos animais também se revelaram negativas

6 DISCUSSÃO

6.1 Experimento I

Estudos recentes descreveram importantes aspectos clínicos patológicos e epidemiológicos da infecção natural por *Trypanosoma vivax*, ainda não relatados em surtos na América do Sul (BATISTA et al. 2007). Uma característica importante da tripanossomose por *T. vivax* que vem sendo observada refere-se ao fato de que animais domésticos das regiões endêmicas possuem um alto nível de proteção contra infecção aguda. Essa proteção determina a ausência de sinais clínicos ou uma doença muito branda, que não representa risco importante na saúde animal, embora possa ter repercussões na produtividade do rebanho. A exposição prévia e constante ao parasita parece ser responsável por conferir esse nível de proteção (DESQUESNES et al, 2004). Uma situação diferente tem sido descrita em regiões não endêmicas como no semiárido do Nordeste do Brasil, onde com frequência são relatados surtos de infecções agudas, animais manifestam doença clínica severa durante uma infecção primária com sinais clínicos e elevadas morbidade e mortalidade (RIET-CORREA et al. 2003).

No presente estudo, as alterações clínicas observadas nos caprinos infectados experimentalmente por *T. vivax*, proveniente de cepas isoladas do sangue de bovinos durante um surto de infecção natural no semiárido do Nordeste brasileiro, confirmam a patogenicidade do isolado. Neste contexto, o estudo revelou que o progresso da infecção no modelo experimental adotado foi bem característico e, portanto, semelhante aos relatados na maioria das pesquisas com *T. vivax*, nas quais a fase aguda da infecção foi caracterizada por altas parasitemias, anorexia e hipertermia, seguido pela fase crônica, caracterizada por parasitemia de baixa intensidade ou ausência (MORAES 2001, PELLÍN et al. 2003, BATISTA et al. 2006, ALMEIDA et al. 2010).

Os eventos do comportamento sexual do caprino macho infectado por *T. vivax* perante cabras no estro foram considerados no presente trabalho. O desinteresse dos machos pelas fêmeas e a ausência de montas foram observados em dois animais do grupo experimental. Os referidos animais também exibiram anemia severa, fraqueza, letargia e prostração. Os resultados obtidos permitem sugerir que em algumas ocasiões, as quais variam em função das características individuais dos hospedeiros, a tripanossomose é capaz de influenciar na expressão dos eventos relacionados ao comportamento sexual. Pesquisas com performance reprodutiva de animais acometidos por doenças parasitárias são raras na literatura, e até o momento uma avaliação mais

detalhada da interferência da tripanossomose no comportamento sexual não foi realizada.

Em touros, *T. vivax* produz lesões de vários graus no sistema reprodutor, especialmente no testículo e epidídimo, sendo que em casos crônicos leva à séria infertilidade, podendo culminar com esterilidade (ADAMU et al., 2007). Sekoni et al. (2004) estudaram os efeitos da infecção experimental com *T. vivax* sobre as características do sêmen de bovinos 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. Adamu et al. (2007) realizaram infecção experimental em zebuínos com *T. vivax* e constataram que os danos ao testículo e ao epidídimo são progressivos, agravando-se com o decorrer da infecção. Os autores descreveram uma drástica redução do número de células espermatogênicas, destruição do tecido intersticial com túbulos seminíferos hipoplásicos, desaparecimento das células de sertoli e comprometimento do parênquima epididimário com áreas de necrose e depleção da reserva espermática.

Na África, a tripanossomose em bovinos causa consideráveis perdas econômicas devido à redução da fertilidade do rebanho (GUTIERREZ et al., 2006). Segundo Sekoni (1994), as desordens reprodutivas observadas na tripanossomose são provocadas por degeneração do hipotálamo, das glândulas pituitárias e das gônadas, com consequentes alterações nas concentrações plasmáticas e nas secreções dos hormônios necessários para a reprodução em ambos os sexos. No Brasil, Batista et al. (2008), após constatarem altas prevalências de abortamento, anestro, repetição de cio e mortalidade perinatal, observados em animais em que o parasita foi identificado em esfregaços da capa leucocitária, sugerem que *T. vivax* deve ser considerado como mais um agente etiológico de alterações reprodutivas no semiárido nordestino.

A presença do DNA de *T. vivax* no sêmen por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em caprinos experimentalmente infectados comprova a capacidade de infecção do sêmen pelo parasita, o qual ainda não tinha sido identificado no sêmen em outros estudos. É importante ressaltar a presença do DNA de *T. vivax* em todas as amostras de sêmen analisadas, inclusive no 7º DPI. Esse fato sugere a invasão precoce do parasita nos órgãos reprodutivos e eliminação contínua no sêmen. Outro dado importante deste estudo é a presença do DNA do *T. vivax* no sêmen dos caprinos que apresentavam parasitemia de baixa intensidade ou ausente, indicando que a presença do *T. vivax* no sêmen não está diretamente relacionada à parasitemia.

A detecção do material genético de *T. vivax* no sêmen pode apontar para a possibilidade do

parasita ser transmitido pela via sexual e ainda ter implicações na disseminação e controle da doença. Além disso, o resultado obtido pode contribuir para a constatação de outras possíveis formas de transmissão do parasita, uma vez que estudos de rotas alternativas para a infecção pelo *T. vivax* são escassos. Exames parasitológicos (esfregaço sanguíneo) e moleculares (PCR) foram utilizados para avaliar a transmissão do *T. vivax* pela via sexual em cabras não infectadas acasaladas com caprinos machos infectados experimentalmente. Os resultados mostraram que embora tenha sido possível a constatação do DNA do *T. vivax* no sêmen, não foram observados tripomastigotas no sangue, bem como não foi identificado DNA do parasita por PCR em nenhuma das cabras analisadas, indicando que não ocorreu a transmissão sexual.

A transmissão sexual por microrganismos está relacionada a interações complexas de diversos fatores que podem contribuir para aumentar ou reduzir o risco de transmissão (LJUBOJEVIĆ et al., 2013; NARDIS et al., 2013). Uma vez que o risco de transmissão venérea de microrganismos pelo sêmen está relacionado à sua concentração circulante (UHRIG et al., 2013; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2015). é provável que a ausência da infecção pelo *T. vivax* verificado no presente estudo, possa estar relacionada à baixa carga de parasitas no sêmen, a qual foi detectada por método molecular de alta sensibilidade para a detecção do *T. vivax*. A ausência da transmissão sexual pode também estar relacionada à ausência de formas viáveis do parasita no sêmen. Sobre esse fato Cevallos e Hernández (2014) afirmam que o DNA de microrganismos diagnosticado por métodos moleculares não indica, necessariamente, infecção ativa, uma vez que não prova que os parasitos são viáveis. Outro fator importante a ser considerado refere-se à integridade ou não da mucosa genital (NARDIS et al., 2013). As formas infectantes do *T. vivax* que poderiam estar presentes no sêmen podem não conseguir vencer as barreiras das mucosas genitais da fêmea, e assim a infectividade só ocorrer quando houver microtraumas promovidos pela cópula.

6.2 Experimento II

A transmissão vetorial é considerada a via de transmissão de maior relevância epidemiológica da tripanossomose (PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2012). No entanto, considerando que alguns agentes infecciosos podem ser transmitidos pelo colostro, sugere-se que a transmissão lactogênica de *T. vivax* pode ocorrer. No presente estudo, focou-se, principalmente, na averiguação da presença de formas tripomastigotas de *T. vivax* no colostro de cabras infectadas

experimentalmente e na avaliação da transmissão de *T. vivax* através do aleitamento. O estudo revelou que as cabras infectadas no final da gestação apresentaram evolução clínica semelhante à observada por Silva et al. (2013). Ao estudar a patogênese das falhas reprodutivas em ovelhas infectadas experimentalmente em diferentes fases da gestação, esses autores constataram que a prenhez mudou os aspectos clínicos da tripanossomose por *T. vivax*, uma vez que houve exacerbação da infecção, manifestada por parasitemia elevada e persistente, acompanhada de hipertermia, além de mortalidade das ovelhas.

O exame direto entre lâminas realizado na presente pesquisa mostrou-se negativo mesmo quando submetido à centrifugação prévia do colostro em tubos de microhematócrito, na tentativa de concentrar os hemoflagelados. A esse respeito, diversos estudos têm demonstrado que exames parasitológicos diretos, quando negativos, são insuficientes para assegurar a ausência de parasitas (HOPKINS et al., 1998; PAIVA et al., 2000; BASTOS et al., 2015; BITTAR et al., 2015). É possível que a metodologia da pesquisa tenha influenciado na negatividade destes resultados, uma vez que pela técnica de PCR o colostro de cinco animais, que foi coletado 12h após o parto, revelou-se positivo, e das amostras coletadas 24h após o parto, uma cabra apresentou resultado positivo. A utilização de método molecular revelou-se uma boa alternativa para complementar ou estabelecer o diagnóstico da presença do DNA de *T. vivax* no colostro.

A presença do DNA de *T. vivax* no colostro por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em cabras experimentalmente infectadas comprova a capacidade de infecção do colostro pelo parasita, o que ainda não havia sido relatado. Dessa forma, tais dados assumem importância valiosa, uma vez que a detecção do material genético de *T. vivax* pode apontar para a possibilidade da transmissão do parasita em neonatos amamentados com colostro de animais infectados. A transmissão oral de *T. vivax* ainda não foi confirmada e esse campo de pesquisa ainda não foi explorado de forma sistemática.

Embora tenha sido possível a constatação da infecção do colostro pelo parasita, bem como amostras de sangue dos cabritos tenham sido examinadas exaustivamente por técnicas parasitológicas, acrescentando-se PCR, não foram observados tripomastigotas no sangue de nenhum dos filhotes, indicando que não houve transmissão da infecção pelo colostro.

A ausência da transmissão de infecção por *T. vivax* através do colostro pode estar relacionada ao baixo número de formas tripomastigotas presentes no colostro, as quais só foram possíveis detectar por métodos moleculares de diagnóstico. Outros fatores importantes já estudados

em trabalhos de avaliação da transmissão de Trypanosoma cruzi pelo colostro, nos quais também foram obtidos resultados negativos, podem ser válidos para explicar a ausência de contaminação dos cabritos verificado no presente estudo. Segundo Araújo e Chiari (1996), um fator importante é a transferência de anticorpos anti-T. cruzi das mães para os filhos pelo colostro, estes anticorpos conferem uma proteção parcial e temporária contra a doença aos recém-nascidos. Tais resultados também podem ser explicados pelas barreiras de proteção presentes no estômago. As formas tripomastigotas presentes no colostro podem não conseguir resistir à digestão ácido-proteásica do estômago, e, assim, a infectividade não ocorrer (DIAS, 1997).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia empregada na realização deste experimento permitiu identificar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) o DNA de *Trypanosoma vivax* no colostro de cabras experimentalmente infectados e no sêmen de bodes também infectados experimentalmente.

Apesar de encontrar o DNA do parasita no sêmen e no colostro, não foi possível verificar experimentalmente a transmissão sexual do macho para a fêmea, como também a transmissão da mãe para o filhote através do colostro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMU S., et al. Sequential testicular and tpididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Vet. Parasitol. 143 (1):29-34. 2007.

ALMEIDA, K. S et al. Alterações Clínicas, Histopatológicas e Enzimáticas em Ovinos Infectados Experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. Ciência Animal Brasileira, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.

AMATO NETO, V., et al. Trypanosoma Cruzi in the milk of women with chronic chagas disease. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo. 47, 1–10. 1992

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.

ARAÚJO, S.M., CHIARI, E., Trypanosoma cruzi infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 9, 211–216. 1996.

AZEEDO D.M.M.R et al. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. PUBVET, v.2, n.6, 2008.

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. Manole, New York, p. 425-462, 1992.

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

BARRY, D. J.; MCCULLOCH, R. Antigenic variation in Trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. Advances in Parasitology, v. 49, p.1-70, 2001.

BASTOS, T.S.A., et al.. Detecção de *Trypanosoma vivax* por diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico realizadas à campo. Ars Vet. 31, 40. 2015

BATISTA, J. S. et al. Experimental Infection by *Trypanosoma vivax* in Sheep. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2006.

BATISTA, J. S.; et al 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.; et al 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. et al. 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, n. 2, p. 131-135, 2009.

BATISTA, J. S.; et al. 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.; et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. Parasitology Research; in print. 2011b.

BATISTA, J. S. et al. Highly Debilitating Natural *Trypanosoma vivax* Infections in Brazilian Calves: Epidemiology, Pathology, and Probable Transplacental Transmission. Parasitology Research, v. 110, n. 1, p. 73-80, 2012.

BEZERRA F.S.B, et al*: Trypanosoma vivax* in testicular and epidydimal tissues of experimentally infected sheep. Pesq Vet Bras, 28:575-582, 2008.

BITTAR J.F.F., et al. Evaluation of parameters related to libido and semen quality in zebu bulls naturally infected with *Trypanosoma vivax*. BMC Vet. Res. 11:261-268. 2015.

BOULHOSA, J. Informação científica. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, p.21-26. 1946.

BRENER Z. 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese de Doutorado. Disponível em <https://science.report/pub/36797551> Acesso em 10 jan. 2017.

CADIOLI, F. A., et al. Experimental Trypanosoma evansi infection in donkeys: hematological, biochemical and histopathological changes. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.5, p.749-756, 2006.

CAMPIGOTTO, G., et al. Experimental infection by Trypanosoma evansi in sheep: occurrence of transplacental transmission and mice infection by parasite presentin the colostrum and milk of infected ewes. Vet. Parasitol. 212, 123–129, 2015.

CARLOS GUTIERREZ, J. A. et al. Trypanosomosis in Goats. Volume 1081, Impact of Emerging Zoonotic Diseases on Animal Health: 8th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine, Pages 300–310, 2006

CARVALHO, L. O.; et al. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. Int J Exp Pathol, 90(1): 52-57. 2009

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e sua aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 21, n. 1, p.25-34, 1997.

CASTILHO, C. et al. Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. Ciência Animal

Brasileira, Goiânia, v.14, n.1, p. 91-97, jan./mar. 2013

CEVALLOS, A.M; HERNÁNDEZ, R. CHAGAS' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission. BioMed Research International, 2014, 10. 2014.

CORDOVES, et al. *Trypanosoma Vivax*. Lista de transmisores mecanicos en Cuba. Rev Cub de Cien Vet, v. 13, p. 219-221, 1982.

CORTEZ AP, et al.: Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterisation, relationships and diagnostic implications. Mol Cell Probes, 23:44-51, 2009.

CUGLOVICI, D. A.; et al.. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 169, p. 320-326, 2010.

CUNNINGHAM. Tratado de fisiologia veterinária / Bradley G. Klein. - 5. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2014.

CURRASON, L. Traité de protozoologie vétérinaireet comparée. Paris: Vigot Frétes, 1943

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. Ann. N. Y. Acad. Sci. v. 916, p.199-212, 2000.

DÁVILA, A. M. R.; et al.. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 117, p. 1-13, 2003.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de lasensibilité de la PCR pourla détection de I'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation desé chantillons sanguins. Revue D'Elevageet de Medicine Veterinaire des Pays Tropicaux, Paris, v. 49, p. 322-327, 1996.

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

DIAS, J.C.P., AMATO NETO, V., LUNA, E.J.A., Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 1–5. 2011.

DIAS, J.C.P. et al. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44(3):375-379, mai-jun, 2011

DIAS-UNGRIA, C. Transmision buccal del *Trypanossoma vivax* en cabras, en condiciones experimentales. Separata del Boletin de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. Nos 119-

120, 1971.

DUFFY, C. W. et al. Trypanosoma vivax displays a clonal population structure. International Journal for Parasitology, v. 39, p. 13, p. 1475 -1483, 2009.

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

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.

FAIRBAIRN, H. Studies on Trypanosoma vivax. IX Morphological differences in strains and their relation to pathogenicity. Annals of Tropical Medicine Parasitology, v.47, p.394-405, 1953.

GARCÍA, H.; et al.. Trypanosomiais in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. Annals of TropicaI Medicine and Parasitology, v. 100, p. 297–305, 2006.

GARDINER, P. R.; et al.. Haemorragic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. Veterinary Parasitology, v. 3-4, n. 31, p. 187-197, 1989.

GÓMEZ-MARTÍN A., et al Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp capri in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. Theriogenology. 83 (2015):911–919, 2015.

GONZALES, J. L.; et al. 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. 114, 2003.

GUERRA, R. M. S. N. C.; et al.. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. Ciência Rural, v. 38, p. 833-835, 2008.

GUTIERREZ, C.; et al. Trypanosomosis in goats: current status. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1081, p. 300–310, 2006.

HAMILTON, P.B.; et al. 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.

HAMMER, J. D.; et al. Mechanical transfer of Theileria orientalis: possible roles of biting arthropods, colostrum and husbandry practices in disease transmission. Parasites & Vectors, 9:34, 2016.

HECHT, M. M.; et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. PLoS One, 5(2): e9181. 2010.

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

HOPKINS, J.S. Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomosis in cattle. Preventive Veterinary Medicine Volume 37, Issues 1–4, 1, Pages 91–99, 1998

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

ISOUN, 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, 415 p. 2000.

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

KADIMA KB, et al.: Serium biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. Veterinarski Arhiv, 70:67-74, 2000.

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.

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

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

LINHARES, G. F. C.; et al.. 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, 9:1-71, 1972.

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

LOPES, F.C. et al. Lactation curve and milk quality of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Experimental Parasitology Volume 167, August 2016, Pages 17–24, 2016

LJUBOJEVIĆ S., et al.. Manifestations of sexually transmitted diseases on oral mucous membranes. Acta Med. Croatica. 67 (5):439-46, 2013.

MADRUGA, C. R.; et al.. 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.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. Belo Horizonte, CBRA, 1998.

MARTINS, C. F.; et al. *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.; et al.. Sensitive and specific of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. Experimental Parasitology, v. 85, p. 193-205, 1997.

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

MAZZA, S; et al. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. Mepra, 28: 41-46. 1936.

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

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

MOBINI, S.; HEATH, A.M.; PUGH, D.G. Theriogenology of Sheep and Goats. In:___. Sheep and Goats Medicine. 1.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. v.1, p. 129-186, 2002.

MORAES M.A.V. 2001. Trypanosoma vivax: infecção experimental em bovinos (Bos indicus). Dissertação de Mestrado. Disponível em <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/61283/trypanosoma-vivax-infeccao-experimental-em-bovinos-bos-indicus/> Acesso em 10 jan. 2017.

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.

MURRAY, P.K.; et al. 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.

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

NARDIS C., et al.. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. Ann Ig. 443-56, 2013.

NEVES, J. P.; et al.. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D., et al.. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 395 p, 2008.

NJIOKOU, F.; et al. 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

OLIVEIRA, J. B.; et al.. 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. Patogénesis of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* in cattle. I. Disseminated intravascular coagulation. Bulletin of Animal Health an Production in Africa, v. 33, n. 3, p. 211-217, 1985

OSAER, S.; et al. Veterinary Parasitology, v. 82, n. 2, p. 1001-119, 1999.

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

PAIVA, F.; et al.. *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 Veteterinária, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2000.

PELLÍN CES, et al.: Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico em ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. Vet Tropical, 28:79-92, 2003.

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

PINCHBECK, G. L.; et al. 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

RODRIGUES, C. M. F.; et al.. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. Veterinary Parasitology, Canada, v. 191, n. 2, p. 146-153, ago. 2013.

SALVIANO, M. B., SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. Rev. Bras. Reprod. Anim., v. 12, n. 3, p. 159-167, 2008.

SEKONI V.O. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiases: A Review. Theriogenology 42:557-570, 1994.

RADOSTITS, O.M. et al. Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabanra Koogan, 2000.

RIET-CORREA F., et al. 2003. Doenças de ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. Semi-

árido em Foco. 1: 49-52. 2003

SANTANA, A.F. et al. Transferência de imunidade passiva. In: Congresso Pernanbucano de Medicina Veterinária, 5, 2003. Recife. Anais Palestra.Recife: Pernambuco, P.389-390, 2003.

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. et al. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 21, n. 4, p. 157-161, 2001.

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. Tick paralysis in Brazil. Tropical Animal Health and Production, v. 15, n. 2, p. 124-126, 1983

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

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. Tripanossomose bovina por Trypanosoma vixax no Brasil e Bolívia: Sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP, 1997.

SILVA, R. A. M. S. et al. Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, 1998.

SILVA R.A.M.S, et al. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*: biology, diagnosis and control. Embrapa Pantanal 141:137, 2002.

SILVA R.A.M.S , et al. Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia Corumbá, MS. Embrapa Pantanal, 2004.

SILVA A.S. et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, 39:2550-2554, 2009.

SILVA, T. M. F. et al. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. Veterinary Research, France, v. 44, n. 1, p. 1-9, jan. 2013.

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

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

STEVENS, J.R. et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. Advances Parasitology, v. 48, p. 1-56, 2001.

THIBAULT, C. LEVASSEUR, M.C. La reproduction chez les mammifers e et lhomme. Ed. Ellipses: INRA, 720 p, 1992.

UHRIG S.R. et al. Evaluation of transmission of *Brucella abortus* strain 19 in bison by intravaginal, intrauterine, and intraconjunctival inoculation. Journal of Wildlife Diseases. 49 (3):522-526, 2013.

VENTURA, R. M. et al. 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. et al. Effect of Trypanosoma vivax infection on the energy and nitrogen metabolism of West African Dwarf Gotas. Journal Animal Science, v. 69, p. 1667-1677, 1991.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas".Mem Inst Oswaldo Cruz, 3: 276-294. 1911.

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.

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.