

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**Caracterização molecular e avaliação bioquímica de
Trypanosoma vivax e *Trypanosoma theileri* no estado do
Rio de Janeiro baseado nos genes *18S rDNA* e *Cathepsina
L-like***

Ana Paula Martinez de Abreu

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO
BIOQUÍMICA DE *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO BASEADO NOS GENES *18S*
rDNA E *CATHEPSINA L-LIKE***

ANA PAULA MARTINEZ DE ABREU

Sob a orientação do professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação dos professores
Huarrisson Azevedo Santos
Maristela Peckle Peixoto

Tese submetida como requisito
para obtenção do grau de
Doutora em Ciências, no
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2020

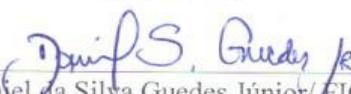
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANA PAULA MARTINEZ DE ABREU

Defesa de tese submetida como requisito para obtenção do grau de Doutora em
Ciências no Programa de na Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

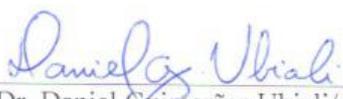
TESE APROVADA EM 11 / 03 / 2020


Dr. Carlos Luiz Massard/UFRRJ
(Orientador)


Dr. Daniel da Silva Guedes Júnior/FIOCRUZ


Dra. Erica Cristina Rocha Roier/ UV


Dra. Bruna de Azevedo Baeta/ UV


Dr. Daniel Guimarães Ubiali/ UFRRJ


Dra. Claudia Bezerra da Silva/ UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À Deus e toda espiritualidade bendita que faz do meu caminho aprendizado e força.

À minha família querida, que acredita muito em mim e sempre me amparou em todas as decisões e consequências.

À meu marido, meu companheiro de todas as horas, que me diz verdades quando o mundo se cala e me dá força quando o mundo se afasta.

Ao prof. Dr. Carlos Luiz Massard, meu orientador, que me ensinou o sentido da palavra humildade dentro de um mundo de pessoas soberbas, e que não se importa em compartilhar conhecimento nos pequenos e grandes detalhes da vida acadêmica e cotidiana.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos, obrigada por me ensinar um pouco do mundo chamado biologia molecular e por estar presente em momento decisivos desta minha caminhada.

À minha co-orientadora, profa. Dra. Maristela Peckle Peixoto, por toda disponibilidade, ajuda e por me ensinar a valorizar ainda mais este trabalho.

À equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (LHV/DPA/IV-UFRRJ), Renata Costa, Gabriela Vitari, Claudinha, Marquinho, Fabricio, Rodrigo Gredilha e Patricia Paulino, obrigada por todas as horas de amizade, companhia, solidariedade, confiança e ensinamentos.

Agradeço também as meninas e meninos que compõe a equipe do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE/DESP/UFRRJ), orientadas pelo professor Huarrisson Azevedo Santos, por compartilhar espaço e dedicação.

Obrigada à Renata Vitória e Profa. Marilene Brito, pela parceria na busca incansável dos tripanosomas de bovinos, durante muitas coletas e análises.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que me recebeu mais uma vez depois de muito tempo.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Caracterização molecular e avaliação bioquímica de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no estado do Rio de Janeiro baseado no gene *18S rDNA* e *Cathepsina L-like***. 2020. 113p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Este estudo teve como objetivos realizar a caracterização molecular de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* através dos genes *18S* e *catl*, bem como analisar o perfil bioquímico relacionado à infecção para *Trypanosoma vivax* em bovinos do estado do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas, por meio de venopunção da veia coccígea de 389 bovinos, sendo o sangue total coletado acondicionado em tubos contendo ácido etileno-amino-tetracético à 10% para análise molecular e tubos sem anticoagulante para bioquímica, sendo posteriormente enviadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde foram realizadas as análises. As amostras de DNA foram extraídas seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (Promega®) e posteriormente armazenadas em freezer -20 °C até o momento das análises moleculares. O soro para análise bioquímica foi obtido pela centrifugação em centrífuga clínica à 3.000 rpm por 5 minutos e posteriormente foi enviado ao Laboratório de Análises Clínicas do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV/ UFRRJ), onde os níveis séricos de Gama Glutamiltransferase (GGT), Proteína Sérica Total (PTS), Albumina (ALB), Bilirrubina Total (BT) e Direta (BD), Creatinina (CR), Uréia (UR), Fosfatase Alcalina (FAL), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP) foram determinados usando o analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®) e kits de reagentes comerciais de acordo com o equipamento utilizado. A análise molecular foi realizada através dos genes *18S* para identificação de *Trypanosoma* sp, e *catl-like* (*Cathepsina L-like*) para identificação *Trypanosoma vivax* e *T. theileri*. Após análise de frequência, algumas amostras de cada município foram selecionadas para análise filogenética e comparação da identidade das sequências do presente estudo com outras sequências encontradas no GenBank. Dentre as amostras analisadas 4,6% (18/389) apresentaram-se positivas para *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo, não sendo visualizadas amostras positivas para *Trypanosoma theileri*. Para o gene *18S*, 15,4% (60/389) foram positivas para *Trypanosomasp*, já para o gene *catl*, 12,8% (50/389) foram positivos para *T. vivax* enquanto para *T. theileri* houve 3,6% (14/389) de animais positivos. A análise filogenética para *T. vivax* mostrou 2 *clusters* definidos para o gene *18S rDNA* e 4 para o gene *catl*, já para *T. theileri*, observamos 1 *clusters* definidos para o gene *18S rDNA* e 4 para o gene *catl*, com 15 genótipos distintos. O presente estudo teve por finalidade relatar a primeira caracterização molecular de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro, bem como o primeiro relato da linhagem IB e IF de *T. theileri* baseado no gene *catl*. Além disso, este também foi o primeiro relato de análise bioquímica dos animais infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro, onde foi possível verificar que a LDH foi a única análise significativamente alterada representando aproximadamente sete vezes mais chance dos bovinos serem positivos para *T. vivax* quando esta enzima está aumentada.

Palavras-chave: *Trypanosoma vivax*; bovinos; diagnóstico molecular; bioquímica; filogenia; *Trypanosoma theileri*.

GENERAL ABSTRACT

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Molecular characterization and biochemical evaluation of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma theileri* in the state of Rio de Janeiro based on the *18S rDNA* and *Cathepsin L-like* gene.** 2020. 66p. Tesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

This study aimed to perform the molecular characterization of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma theileri* through the *18S* and *catl* genes, as well as to analyze the biochemical profile related to infection for *Trypanosoma vivax* in cattle from the state of Rio de Janeiro. The samples were collected by means of venocuncture of the coccygeal vein of 389 cattle, and the whole blood collected was placed in tubes containing 10% ethylene-amino-tetracetic acid for molecular analysis and tubes without anticoagulant for biochemistry, being subsequently sent to the Hemoparasites and vectors from the Federal Rural University of Rio de Janeiro where the analyzes were performed. The DNA samples were extracted following the protocol recommended by the manufacturer (Promega®) and subsequently stored in a -20 ° C freezer until the moment of molecular analysis. The serum for biochemical analysis was obtained by centrifugation in a clinical centrifuge at 3,000 rpm for 5 minutes and was later sent to the Clinical Analysis Laboratory of the Experimental Chemotherapy Laboratory in Veterinary Parasitology (LQEPV / UFRRJ), where the serum levels of Glutamyltransferase (GGTT), Total Serum Protein (PTS), Albumin (ALB), Total Bilirubin (BT) and Direct (BD), Creatinine (CR), Urea (UR), Alkaline Phosphatase (FAL), Lactate Dehydrogenase (LDH), Aspartate Aminotransferase (AST / TGO) and Alanine Aminotransferase (ALT / TGP) were determined using the automated biochemical analyzer A15 (Biosystems®) and commercial reagent kits according to the equipment used. Molecular analysis was performed using the *18S* genes to identify *Trypanosoma* sp, and *catl-like* to identify *Trypanosoma vivax* and *T. theileri*. After frequency analysis, some samples from each municipality were selected for phylogenetic analysis and comparison of the identity of the sequences of the present study with other sequences found in GenBank. Among the analyzed samples 4.6% (18/389) were positive for *Trypanosoma vivax* in a blood smear, with no positive samples for *Trypanosoma theileri* being seen. For the *18S* gene, 15.4% (60/389) were positive for *Trypanosoma* sp, while for the *catl* gene, 12.8% (50/389) were positive for *T. vivax* while for *T. theileri* there was 3.6 % (14/389) of positive animals. Phylogenetic analysis for *T. vivax* showed 2 clusters defined for the *18S rDNA* gene and 4 for the *catl* gene, whereas for *T. theileri*, we observed 1 clusters defined for the *18S rDNA* gene and 4 for the *catl* gene, with 15 distinct genotypes. This study aimed to report the first molecular characterization of *T. vivax* and *T. theileri* in the state of Rio de Janeiro, as well as the first report of the IB and IF lineage of *T. theileri* based on the *catl* gene. In addition, this was also the first report of biochemical analysis of animals naturally infected with *Trypanosoma vivax* in the state of Rio de Janeiro, where it was possible to verify that LDH was the only significantly altered analysis representing approximately seven times more chance of cattle being positive for *T. vivax* when this enzyme is increased.

Keywords: *Trypanosoma vivax*; cattle; molecular diagnosis; PCR; phylogeny; *Trypanosoma theileri*.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

catl: gene *Cathepsina L-like*

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etileno-amino-tetracético

EUA: Estados Unidos da América

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LHV / E.E.P.P. W.O. Neitz: Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O.Neitz

N: número de bovinos

P: p-valor

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pb: pares de base

rDNA: ácido desoxirribonucleico ribossomal

°C: Celsius

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

GGT: Gama glutamiltransferase

PTS: Proteína total do soro

ALB: Albumina

CRE: Creatinina

BT: Bilirrubina total

BD: Bilirrubina direta

FAL: Fosfatase alcalina

LDH: Lactato desidrogenase

UR: Uréia

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Lista de primers usado na caracterização molecular.....	40
Tabela 2. Espécies, origem geográfica dos tripanossomatídeos empregados na análise de sequências gênicas do gene <i>18S rDNA</i> e da <i>catl</i> e genotipagem.....	42
Tabela 3. Análise da discordância entre esfregaços de sangue e PCR, comparando os resultados obtidos quando amostras de bovinos foram submetidas ao diagnóstico de <i>Trypanosoma vivax</i> neste estudo.....	47
Tabela 4. Análise da discordância entre esfregaços de sangue e PCR, comparando resultados obtidos quando amostras de bovinos foram submetidas ao diagnóstico de <i>Trypanosoma theileri</i> neste estudo.....	47
Tabela 5. Prevalência de tripanossomose nas áreas de estudo e resultados da caracterização molecular de espécies de tripanossomas que infectam bovinos domésticos (n = 389).....	49
Tabela 6. Distância entre os grupos de <i>Trypanosoma vivax</i> com o gene <i>catl</i>	52
Tabela 7. Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência dentro dos grupos de <i>Trypanosoma vivax</i> com o gene <i>catl</i>	53
Tabela 8. Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência dentro de grupos de <i>Trypanosoma theileri</i> com gene <i>catl</i>	56
Tabela 9. Distância genética de <i>Trypanosoma theileri</i> entre as regiões através do gene <i>catl</i>	57

CAPÍTULO II

Tabela 1. Primers utilizados no diagnóstico diferencial de <i>Trypanosoma vivax</i>	91
Tabela 2. Frequência de bovinos infectados e não infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> e os agentes da Tristeza Parasitária Bovina por PCR convencional (n=242).....	96
Tabela 3. Frequência de alterações bioquímicas nos bovinos deste estudo (n=242).....	96
Tabela 4. Análise bivariada e multivariada dos parâmetros bioquímicos e sua associação com a positividade para <i>Trypanosoma vivax</i> nos bovinos através da técnica da PCR	97

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Formas tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino. Fonte: ARQUIVO PESSOAL (2016)..... 23
- Figura 2.** Ciclo de vida das Tripanosomoses Africanas nas *Glossina* sp (JACKSON et al., 2015)..... 24
- Figuras 3A e 3B.** Bovinos positivos para *T. vivax* com emagrecimento e fraqueza (COSTA et al., 2016a)..... 27
- Figura 4.** Mapa do estado do Rio de Janeiro com origens geográficas de sequências de *Trypanosoma vivax* (bolinha) e *T. theileri* (triângulo) caracterizados neste estudo em cidades com suspeita de infecção por *T. vivax*..... 37
- Figura 5.** Fluxograma do delineamento do estudo..... 45
- Figura 6.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 780pb do gene *18S rDNA* para o gênero *Trypanosoma* sp. Poço: 1- Peso Molecular (*100bp PlusDNA LadderTM*); 2- Controle positivo de *T. vivax*; 3- Controle negativo; 5, 7, 8 - amostras consideradas positivas para *Trypanosoma* sp; 6, 9, 10: amostras consideradas negativas para *Trypanosoma* sp..... 44
- Figura 7.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 500pb do gene *catl-like* para específico para *Trypanosoma vivax*. Poço: 1- Peso Molecular (*1Kb PlusDNA LadderTM*); 2- Controle negativo (água dentro); 3- Controle negativo (água fora); 4- Controle positivo; 5, 6, 10 - amostras consideradas positivas para *Trypanosoma vivax*; 7, 8, 9, 11, 12: amostras consideradas negativas para *T. vivax*..... 46
- Figura 8.** Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 290pb do gene *catl-like* para específico para *Trypanosoma theileri*. Poço: 1- Peso Molecular (*100bp PlusDNA LadderTM*); 2- amostra positiva para *T. theileri*; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – amostras consideradas negativas para *T. vivax*; 11- Controle negativo (água dentro); 12- Controle negativo (água fora); 13- Controle positivo de *T. theileri*..... 47
- Figura 9.** Dendograma baseado nas seqüências do gene *18S rDNA* do *Trypanosoma vivax* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência (KUMAR et al., 2016)..... 48
- Figura 10.** Dendograma baseado nas seqüências do gene *catl* do *Trypanosoma vivax* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência..... 51
- Figura 11.** Dendograma baseada nas seqüências do gene *18S rDNA* de *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2

parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de sequência (KUMAR et al., 2016)..... 54

Figura 12. Dendograma baseado nas seqüências do gene *catl* do *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de sequência(KUMAR et al., 2016)..... 55

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema do metabolismo da bilirrubina (MARTELLI, 2012)..... 80

Figura 2. Mapa do estado do Rio de Janeiro com origens geográficas de cidades com suspeita de infecção por *T. vivax*, onde foram coletadas amostras para análise bioquímica..... 89

Figura 3. Organograma da catergorização dos dados bioquímicos à serem analisados..... 92

Figura 4. Fluxograma do delineamento do estudo..... 94

SUMÁRIO

CAPITULO I - Caracterização molecular de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no estado do Rio de Janeiro baseado nos genes *18S rDNA* e *Cathepsina L-like*

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Breve histórico sobre o <i>Trypanosoma vivax</i> e <i>Trypanosoma theileri</i> no Brasil e no mundo.....	20
2.2 Posição Taxonômica de <i>Trypanosoma</i> sp.....	22
2.3 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão.....	22
2.4 Manifestações Clínicas.....	26
2.5 Distribuição mundial.....	28
2.6 Diagnóstico Laboratorial.....	29
2.6.1 Parasitológico.....	30
2.6.2 Imunológico.....	30
2.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
2.6.4 Outros exames.....	34
2.7 Tratamento e controle.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Descrição dos Locais de Estudo.....	37
3.2. Amostragem.....	38
3.3. Avaliação do esfregaço sanguíneo	38
3.4. Extração do DNA total.....	38
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional.....	39
3.6. Purificação do Produto da PCR.....	40
3.7. Sequenciamento de nucleotídeos.....	41
3.8. Análise do Sequenciamento.....	41
3.9. Análise estatística.....	44
3.10. Considerações éticas.....	44
3.11. Fluxograma Metodológico.....	45
4 RESULTADOS	46
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

CAPITULO II - Avaliação Bioquímica de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro

1 INTRODUÇÃO	74
2 REVISÃO DE LITERATURA	75
2.1. Agentes Etiológicos.....	75
2.2. Sinais clínicos.....	75

2.3. Patogenia.....	76
2.4. Diagnóstico Laboratorial.....	77
2.4.1 Hemograma.....	77
2.4.2 Bioquímica.....	78
2.5. Diagnóstico Diferencial.....	85
2.6. Tratamento.....	85
2.7. Controle e profilaxia.....	87
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
3.1. Descrição dos Locais de Estudo.....	89
3.2. Amostragem e Processamento das amostras.....	90
3.3. Extração do DNAtotal.....	90
3.4. Obtenção dos controles positivos.....	90
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase Convencional.....	90
3.6. Diagnóstico Diferencial.....	91
3.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	91
3.8. Mensuração dos parâmetros bioquímicos do soro.....	92
3.9. Análise estatística.....	92
3.10.Considerações éticas.....	93
3.11. Fluxograma Metodológico.....	93
4 RESULTADOS.....	95
5 DISCUSSÃO.....	99
6 CONCLUSÃO.....	102
7 REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....	103
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	108
ANEXOS.....	109
Anexo I - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	109
Anexo II - Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de usoanimal.....	110
Anexo III – Planilha dos dados utilizados na análise estatística.....	111

INTRODUÇÃO GERAL

Os tripanosomas são seres unicelulares que pertencem ao Reino Protista, Filo Euglenozoa, Subfilo Sarcomastigophora, Superclasse Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, o qual se subdivide em seção salivária (transmissão inoculativa) e estercorária (transmissão contaminativa). Os tripanosomas de seção salivária patogênicos apresentam como subgêneros: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* e *Pycnomonas* (HOARE, 1972; RADWANSKA et al., 2018) e como exemplo de seção estercorária apatogênicos destacamos o subgênero *Megatrypanum*.

Trypanosoma (Duttonella) vivax Ziemann, 1905 é um dos agentes da Tripanosomiase Animal Africana (sinonímia Nagana), juntamente com o *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma brucei*, que causa doença principalmente em ruminantes de pequeno e grande porte, produzindo um grande prejuízo à pecuária mundial (HOARE, 1972; PAIVA et al., 2000). A transmissão de *T. vivax*, na África, ocorre através da inoculação de formas infectantes presentes na glândula salivar da mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.), porém nas Américas devido a ausência deste hospedeiro intermediário, é comum a transmissão mecânica através de fômites (agulhas) e dípteros hematófagos, principalmente Tabanídeos e *Stomoxys* sp (MAGONA et al., 2008; BATISTA et al., 2012).

Trypanosoma (Megatrypanum) theileri foi identificado pela primeira vez em 1902 por Theiler, Laveran e Bruce (HOARE, 1972) e é considerado o maior tripanosoma presente em sangue de mamíferos, podendo acometer bovinos, búfalos e cervídeos, e ser transmitidos por Tabanídeos. Este agente é cosmopolita e apresenta cinetoplasto junto ao núcleo quando na forma tripomastigota. Além disso, sua prevalência pode variar de 10 à 90% de acordo com cada país (LEE et al., 2010), sendo o aumento da parasitemia relacionada a presença de doenças concomitantes que podem comprometer o sistema imune (TOWNSEND e DUFFUS, 1982). Esta espécie se multiplica na corrente sanguínea por fissão binária sob a forma epimastigota que dificilmente é encontrada, sugerindo uma ativação de sua virulência na presença de estresse, gestação e estado nutricional (RODRIGUES et al., 2006).

No Brasil, *T. vivax* foi a primeira vez observado por Floch e Lajudie (1944), e depois de quase 30 anos foi observado em búfalos no Pará por Shaw e Lainson (GALIZA et al., 2011). Recentemente, a presença de *T. vivax* já foi observada no estado do Rio de Janeiro (COSTA et al., 2016a; COSTA et al., 2016b) em surto em bovinos da raça Holandesa, nos municípios de Pirai, Vassouras e Areal, o que ocasionou prejuízos econômicos nas fazendas

devido a perda na produção leiteira e óbito de alguns animais. Nestas áreas, a transmissão foi relacionada principalmente a via mecânica de disseminação do agente através de agulhas utilizadas para aplicação de ocitocina e vacinação. Já *T. theileri*, é transmitido ciclicamente por invertebrados hematófagos (tabanídeos e carrapatos) e é contaminante. A transmissão pode ocorrer pela ingestão dos invertebrados infectados ou através da contaminação em feridas na pele do hospedeiro bovino com fezes do vetor contendo tripomastigotas metacíclicos (RODRIGUES et al., 2003).

Trypanosoma theileri já foi relatado em todos os continentes inclusive na América do Sul com trabalhos realizados na Argentina, Colômbia, Uruguai e Brasil, porém vem sendo esporadicamente relatado apresentando maior prevalência em áreas tropicais e neotropicais (RODRIGUES et al., 2003; RODRIGUES et al., 2006).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade superior ao exame parasitológico (ZARLENGA; HIGGINS, 2001). A análise da sequência de DNA amplificado pela PCR fornece informação para identificação genética, e permite que novos tripanosomas sejam organizados dentro de uma árvore filogenética, para que enfim sejam comparados com outras sequências, auxiliando na taxonomia destes parasitos. Para isso, os genes *18S rDNA* vem sendo amplamente utilizados para *T. vivax*, já que apresentam domínios alternativos e variáveis, permitindo que sejam amplificados por primers nas regiões conservadas (ADAMS et al., 2010). Além disso, a subunidade menor (SSU) do gene *18S*, fragmento de DNA ribossomal, foi utilizado no estudo de Rodrigues et al. (2008), onde observou-se que cepas de *T. vivax* da Tanzânia e Moçambique diferiram das sequências do Leste e Oeste Africano na árvore filogenética, definindo a partir deste momento a existência de três clados deste parasito.

Os genes que expressam a cisteino-protease (*catl*) participam do metabolismo de proteínas da família Trypanosomatidae, hidrolisando ligações peptídicas, e também de funções regulatórias como: a evasão do sistema imune, invasão de células, apoptose, virulência e patogenicidade. No entanto, o papel desta enzima em tripanosomas apatogênicos continua desconhecido (SAJID; McKERROW, 2002; ORTIZ et al., 2009). Segundo Cortez et al. (2006), as cepas de *T. vivax* da África Ocidental, são mais patogênicas quando comparadas com as do leste Africano, sendo a primeira mais próxima das cepas observadas na América do Sul. Nakayima et al. (2013) utilizaram o gene *catl* para confirmar a relação existente entre amostras oriundas da África Ocidental com sequências da América do Sul, bem como comparar sua patogenicidade.

O perfil bioquímico de animais infectados por *T. vivax* geralmente é normal (SCHENK et al., 2001; ALMEIDA et al., 2010), porém pode ser influenciado por causas multifatoriais, como nutrição, manejo, e a genética dos animais avaliados, além de estar diretamente relacionadas com o estágio de evolução da doença (fase aguda ou crônica) e ainda estar ligada a adaptabilidade dos animais a ação do parasito (relação parasito/hospedeiro) (MOURA et al., 2009; BAKARI et al., 2017).

Sendo considerado pouco patogênico, *Trypanosoma theileri* é bem tolerado por bovinos o que tem como resultado os níveis semelhantes de parâmetros bioquímicos séricos observados em bovinos infectados e não infectados, principalmente na fase crônica da infecção. Porém apesar de ser comensal, esse causa inflamação tecidual, na fase aguda da doença o que leva as alterações bioquímicas conforme descrito por BAKARI et al. (2017).

O presente estudo teve como objetivos (i) caracterizar molecularmente *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* através dos genes *18S rDNA* e *catl-like* em bovinos naturalmente infectados (ii) avaliar a distribuição destes agentes no estado do Rio de Janeiro, (iii) realizara filogenia de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro e (iv) avaliar a patogenia a partir do perfil bioquímico de animais infectados naturalmente por *T. vivax*.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO BASEADO NOS GENES *18S rDNA* E *catl-like*

RESUMO

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Caracterização molecular de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no estado do Rio de Janeiro baseado nos genes *18S rDNA* e *catl***. 2020. 51p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Os objetivos deste estudo foram caracterizar molecularmente *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* através dos genes *18S* e *catl-like* em bovinos naturalmente infectados, avaliar a distribuição destes agentes em 15 municípios no estado do Rio de Janeiro e realizar a filogenia de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas, por meio de venopunção da veia coccígea de 389 bovinos. Em seguida as amostras foram acondicionadas em tubos contendo ácido etileno-amino-tetracético à 10% e enviadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde foram realizadas as análises. A partir do sangue total foi realizado esfregaço sanguíneo em lâmina de microscopia, a qual foi fixada em metanol 100% e corada por Giemsa, posteriormente foi realizada a pesquisa de hemoparasitos em microscopia óptica em objetiva de imersão. As amostras de DNA foram obtidas, seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (Promega®) e posteriormente armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares. A análise gênica foi realizada através dos genes *18S rDNA* para identificação de *Trypanosoma* sp, e *catl-like* (*Cathepsina L-like*) para identificação *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri*. Após análise de prevalência, algumas amostras de cada município foram selecionadas para análise filogenética e comparação da identidade das sequências do presente estudo com outras sequências encontrados no GenBank. Dentre as amostras analisadas 4,6% (n=18/389) apresentaram-se positivas para *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo corado, não sendo visualizadas amostras positivas para *Trypanosoma theileri*. Para o gene *18S*, 15,4% (n=60/389) foram positivas para *Trypanosoma* sp, já para o gene *catl*, 12,8% (n=50/389) foram positivos para *T. vivax* enquanto para *T. theileri* houve 3,6% (n=14/389) de animais positivos. A análise filogenética para *T. vivax* mostrou 2 clados definidos para o gene *18S rDNA* e 4 para o gene *catl*, já para *T. theileri*, observamos 1 clado definido para o gene *18S rDNA* e 4 para o gene *catl*, com 15 genótipos distintos neste último. O presente estudo teve por finalidade relatar a primeira caracterização molecular de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro, bem como o primeiro relato da linhagem IB e IF de *T. theileri* baseado no gene *catl*, neste estado.

Palavras-chave: Trypanosomatidae; bovinos; diagnóstico molecular; PCR; filogenia

ABSTRACT

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Molecular characterization of *Trypanosoma* sp. from cattle from the State of Rio de Janeiro based on *18S rDNA* and *cathepsin L-like* gene.**2020. 51p. Tesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The objectives of this study were to characterize *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma theileri* molecularly through the *18S* and *catl-like* genes in naturally infected cattle, to evaluate the distribution of these agents in 15 municipalities in the state of Rio de Janeiro and to carry out the phylogeny of *T. vivax* and *T. theileri* in the state of Rio de Janeiro. Samples were collected by venipuncture of the coccygeal vein of 389 cattle. Then the samples were placed in tubes containing 10% ethylene-amino-tetracetic acid and sent to the Hemoparasites and Vectors Laboratory of the Federal Rural University of Rio de Janeiro where the analyzes were carried out. From the whole blood, a blood smear was performed on a microscopic slide, which was fixed in 100% methanol and stained by Giemsa. Subsequently, hemoparasites were investigated using optical microscopy in an immersion objective. DNA samples were obtained following the recommended protocol by the manufacturer (Promega®) and later stored in a -20 ° C freezer until molecular analysis. Gene analysis was performed using the *18S rDNA* genes to identify *Trypanosoma* sp, and *catl-like* (*Cathepsina L-like*) to identify *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma theileri*. After prevalence analysis, some samples from each municipality were selected for phylogenetic analysis, genetic variability and comparison of the sequence identities of the present study with other sequences found in GenBank. Among the samples analyzed 4.6% (n=18/389) were positive for *Trypanosoma vivax* in a blood smear, with no positive samples for *Trypanosoma theileri* being seen. For the *18S* gene, 15.4% (n=60/389) were positive for *Trypanosoma* sp, while for the *catl* gene, 12.8% (n=50/389) were positive for *T. vivax* while for *T. theileri* there was 3.6 % (n=14/389) of positive animals. Phylogenetic analysis for *T. vivax* showed 2 clusters defined for the *18S rDNA* gene and 4 for the *catl* gene, whereas for *T. theileri*, we observed 1 clusters defined for the *18S rDNA* gene and 4 for the *catl* gene, with 15 distinct genotypes. This study aimed to report the first molecular characterization of *T. vivax* and *T. theileri* in the state of Rio de Janeiro, as well as the first report of the IB and IF lineage of *T. theileri* based on the *catl* gene, this state.

Keywords: *Trypanosoma vivax*; cattle; molecular diagnosis; PCR; phylogeny; *Trypanosoma theileri*.

1 INTRODUÇÃO

A análise da sequência de DNA amplificado pela PCR fornece informação para identificação genética, e permite que novos tripanosomas sejam organizados dentro de uma árvore filogenética, para que enfim sejam comparados com outras sequências de todo o mundo, auxiliando na taxonomia destes parasitos (ADAMS et al., 2010). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade superior ao exame parasitológico (ZARLENGA, HIGGINS, 2001).

Para isso, o gene *18S rDNA* vem sendo amplamente utilizado na caracterização de *T. vivax*, já que apresenta domínios alternativos e variáveis, permitindo que seja amplificado por primers nas regiões conservadas (ADAMS et al., 2010). Além disso, a subunidade menor (SSU) do gene *18S*, fragmento de DNA ribossomal, foi utilizado no estudo de Rodrigues et al. (2008), onde observou-se que cepas de *T. vivax* da Tanzânia e Moçambique diferiram das sequências do Leste e Oeste Africano na árvore filogenética, definindo a partir deste momento a existência de três clados deste parasito.

Os genes que expressam a cisteino-protease (*catl*) participam do metabolismo de proteínas da família Trypanosomatidae, hidrolisando ligações peptídicas, e também de funções regulatórias como: a evasão do sistema imune, invasão de células, apoptose, virulência e patogenicidade. No entanto, o papel desta enzima em tripanosomas apatogênicos continua desconhecido (SAJID; McKERROW, 2002; ORTIZ et al., 2009). Segundo Cortez et al. (2006), as cepas de *T. vivax* da África Ocidental, são mais patogênicas quando comparadas com as do Leste Africano, sendo a primeira mais próxima das cepas observadas na América do Sul. Nakayima et al. (2013) utilizaram o gene de *cathepsin L-like* para confirmar a relação existente entre amostras oriundas da África Ocidental com sequências da América do Sul, bem como comparar sua patogenicidade. Em relação ao *T. theileri*, o gene *catl*, revelou em todo o mundo duas linhagens filogenéticas e 14 genótipos distintos validados no total, usando dois marcadores moleculares diferentes (SSU e ITS), TthI (IA / IB / IC / Thai Ia / Thai Ib) e TthII (IIA / IIB / IIC / Thai IIa) (GARCIA et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivos (i) caracterizar molecularmente *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* através dos genes *18S* e *catl-like* em bovinos naturalmente infectados (ii) avaliar a distribuição destes agentes no estado do Rio de Janeiro e (iii) realizara filogenia de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico sobre *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no Brasil e no mundo

A Tripanossomose Africana em Animais (sinonímia = Nagana) é composta por três espécies de *Trypanosoma*: *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Broden, 1904, *Trypanosoma (Duttonella) vivax* Ziemann, 1905, e *Trypanosoma (Trypanosoon) brucei brucei* Pilmer e Bradford, 1899 (HOARE, 1972; PAIVA et al., 2000; TRUC et al., 2013). O primeiro é a espécie mais importante causando infecção em ruminantes de pequeno e grande porte. Além disso, causa grandes prejuízos à pecuária mundial (PAIVA et al., 2000).

O *Trypanosoma (Duttonella) vivax* foi descrito a primeira vez por Ziemman em 1905, em ruminantes domésticos em Camarões, após esta data outros pesquisadores nomearam o mesmo parasita como: *T. cazalboui* (CAZALBOU, 1904) e *T. lewisi* (WENION, 1926), *T. bovis* e *T. caprae*, em bovinos e caprinos, respectivamente, foram descritos por Kleine (1910), *T. angolense* (BRODEN e RODHAIN, 1910), *T. guyanense* (LEGER e VIENNE, 1919) em bovinos na Guiana Francesa. Porém, após meio século, priorizaram o nome deste parasito como *Trypanosoma vivax vivax*, como Ziemman havia descrito, para as Tripanosomoses Africanas e o parasito que surgiu na América foi dado o nome de *Trypanosoma vivax viennei*, uma vez que a transmissão no novo mundo é mecânica, já que não existe o vetor (*Glossina*) responsável por esta (HOARE, 1972; CORTEZ et al., 2006).

Depois da primeira descrição na Guiana Francesa em 1919, este parasito aparece sequencialmente na Venezuela (1920), Guadalupe (1926), Martinica (1929). Zapata em 1931 descreveu o agente a primeira vez na Colômbia. Suriname (1938), Panamá (1941), Guiana (1952) e finalmente em 1972, é descrito no Brasil; em 1977, foi detectado em El Salvador, Costa Rica, Equador, Peru e Paraguai através de detecção de anticorpos em bovinos. Recentemente foi observado mais ao sul do Brasil e na Bolívia (JONES; D'AVILA, 2001).

T. vivax foi provavelmente introduzido nas Américas em 1830 com a importação de um gado zebuino pela Guiana Francesa, porém apenas em 1993, Desquesme, faz o primeiro relato deste parasito na Guiana Francesa (OLIVEIRA et al., 2009), . Há ainda diversos autores que citam a infecção por este parasito em outros países das Américas, como: Colômbia (OTTE et al., 1994), Bolívia (SILVA et al., 1998), Peru (QUISPE et al., 2003), Venezuela (GARCIA et al., 2006; GARCIA et al., 2016; RAMÍREZ-IGLESIAS et al., 2017) e Costa Rica (OLIVEIRA et al., 2009).

No Brasil, *T. vivax* foi observado pela primeira vez em búfalos no Pará por Shaw e Lainson (GALIZA et al., 2011). Em 1981, Serra-Freire, trabalhou realizando diagnóstico de bubalinos, bovinos e ovinos do Pará e Amapá com infecção por este protozoário. Em 1995, Silva e colaboradores fizeram o primeiro relato deste agente fora da região norte do país, desta vez em Poconé, cidade do Mato Grosso do Sul. Em 1997, Dávila e colaboradores, e Paiva e colaboradores, relataram este protozoário causando doença em animais do Pantanal e Bolívia, e Mato Grosso do Sul, respectivamente. Em 2000, Paiva e colaboradores, realizaram um acompanhamento clínico, hematológico e anatomopatológico em bovinos infectados naturalmente por *T. vivax*. Depois disso, outros pesquisadores relataram a presença deste protozoário em outras regiões do país, como: Mato Grosso do Sul (BARBOSA et al., 2001; MARTINS et al., 2008); Pantanal (DÁVILA et al., 2003; GONZALES et al., 2007); Maranhão (FEITOSA et al., 2004; GUERRA et al., 2008); Paraíba (BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; GAZILA et al., 2011); Tocantins (LINHARES et al., 2006); Pará (GUEDES JR et al., 2008); Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010); São Paulo (CORTEZ et al., 2008; CADIOLE et al., 2012; FIDELIS JR et al., 2016); Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009); Pernambuco (PIMENTEL et al., 2012); Goiás (BASTOS et al., 2015; BASTOS et al., 2017); Rio Grande do Norte (RODRIGUES et al., 2015); Rio de Janeiro (COSTA et al., 2016a; COSTA et al., 2016b); Sergipe (VIEIRA et al., 2017).

Trypanosoma (Megatrypanum) theileri é um protozoário flagelado não-patogênico ou fracamente patogênico de bovinos, cosmopolita, sendo descrito pela primeira vez na África do Sul em 1902 por Theiler, Laveran e Bruce (HOARE, 1972; CALZOLARI et al., 2018). Já foi relatado na Europa (Alemanha, Bélgica, Escócia, Espanha, França, Inglaterra, Irlanda, Polônia e Itália), América do Norte (Canadá e EUA), América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela) e Ásia (Bangladesh, Coreia, Sri Lanka, Vietnã, Filipinas, Japão, Tailândia) (AMATO et al., 2019; GARCIA et al., 2006; GARCIA et al., 2011; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017).

No Brasil, já foi relatado no Rio Grande do Sul presente na hemolinfa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MARTINS et al., 2008), Rondônia, Amazônia, Mato Grosso do Sul, Pantanal, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (RODRIGUES et al., 2006; PACHECO et al., 2018) e em Santa Maria Madalena/Rio de Janeiro (GONÇALVES et al., 1998).

2.3. Posição Taxonômica de *Trypanosoma* sp.

As espécies *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* estão inseridas nas seguintes posições sistemáticas (HOARE, 1972):

Império: EUCARIOTA Chatton, 1925
Reino: Protista Haeckel, 1866
Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
Classe: Kinetoplastidea Honigberg, 1963
Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880
Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901
Gênero: *Trypanosoma* Bettencourt, 1907

Seção: Salivária

Espécie: *Trypanosoma (Duttonella) vivax* Ziemann, 1905

Seção: Estercorária

Espécie: *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* Theiler, 1902

2.2 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão

Na África, as formas encontradas no hospedeiro pertencentes ao subgênero *Duttonella*, apresentam certo grau de dimorfismo, podendo estar em formato com porção posterior arredondada e se afinar em direção à extremidade anterior, e há formas durante a fase aguda da parasitemia, onde aumenta bruscamente o número de parasitos, e o formato destes passam a ser mais delgados. A membrana ondulante da forma tripomastigota, tem um nível médio de desenvolvimento (mais do que em *T. congolense* e menor que em *T. brucei*), e o flagelo está presente e é livre. Neste subgênero, o cinetoplasto é arredondado, variando de forma circular a elíptica, e geralmente é observado em posição terminal. Em algumas formas, no entanto, pode ser subterminal ou marginal. O grande cinetoplasto de *T. vivax* é, por si só, uma característica diagnóstica valiosa, pois facilita a identificação em esfregaços de sangue (Figura 1) (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008).

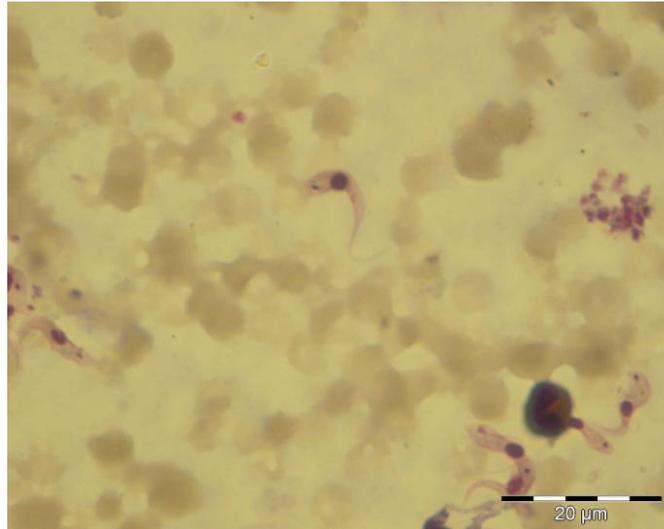


Figura 1. Formas tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino observados sob microscopia ótica (aumento de 1000X). Fonte: Arquivo Pessoal (2016).

A forma infectante de *T. vivax* (tripomastigota) apresenta extremidade posterior arredondada, membrana ondulante fracamente desenvolvida, núcleo central e cinetoplasto terminal (CARVALHO et al., 2008).

Segundo Hoare (1972), as formas amastigotas (arredondadas ou alongada e sem flagelo livre), e a forma epimastigota (estruturas alongadas com cinetoplasto justanuclear, flagelo próximo ao cinetoplasto e membrana ondulante), podem ser encontradas no hospedeiro invertebrado (*Glossina* sp.). Porém, como no Brasil não há a participação comprovada de dípteros hematófagos, até o momento, apenas a forma tripomastigota foi encontrada no ciclo deste parasito.

Nos mamíferos (bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos e equinos), o ciclo se inicia pela introdução de formas tripomastigotas de *T. vivax* pelo inseto, hospedeiro invertebrado, ou ativamente pela introdução do aparelho bucal de dípteros hematófagos ou agulha (MAGONA et al., 2008). A reprodução ocorre por fissão binária no estágio tripomastigota, podendo ao final da divisão permanecer na circulação sanguínea ou invadir outros tecidos do hospedeiro vertebrado, onde podemos encontrar o parasito na forma amastigota e outros estágios (HOARE, 1972).

A forma tripomastigota de *T. theileri* é relativamente grande, medindo geralmente de 60 a 70 mm de comprimento, mas pode variar de 25 a 120 mm. Essa espécie tem uma extremidade posterior longa e pontiaguda, a membrana ondulante é proeminente e apresenta um flagelo livre. Considerada uma das maiores espécies de tripanosomas de sangue de mamíferos, tem o cinetoplasto situado perto do núcleo (LEE et al., 2010).

Em 1972, Hoare reclassificou os tripanossomas de bovinos e búfalos como *T. theileri*, e sugeriu que todos os outros da subespécie *Megatrypanum* seqüências de cervídeos, antílopes e caprinos deveriam ser classificados como *T. theileri-like* (LEE et al., 2010). Porém, formas tripomastigotas semelhantes a *T. theileri* foram descritas em búfalos, ovinos, caprinos e ruminantes selvagens (GARCIA et al., 2011).

Trypanosoma vivax encontrado na América do Sul tem sido transmitido mecanicamente, porém na África, ele é transmitido ciclicamente pelas moscas tse-tse, que ingere as formas tripomastigotas do hospedeiro infectado, localizadas no esôfago e faringe, onde se transformam em formas epimastigotas, passada 24 horas estas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam intensivamente e se localizam nas paredes do labro. Depois migram em direção à hipofaringe onde se transformam em formas tripomastigotas, que se tornam infectantes, também chamadas “metatripanossomas” (HOARE, 1972), fato este que também ocorre com a *T. brucei* e *T. congolense*, conforme observado abaixo (Figura 2).

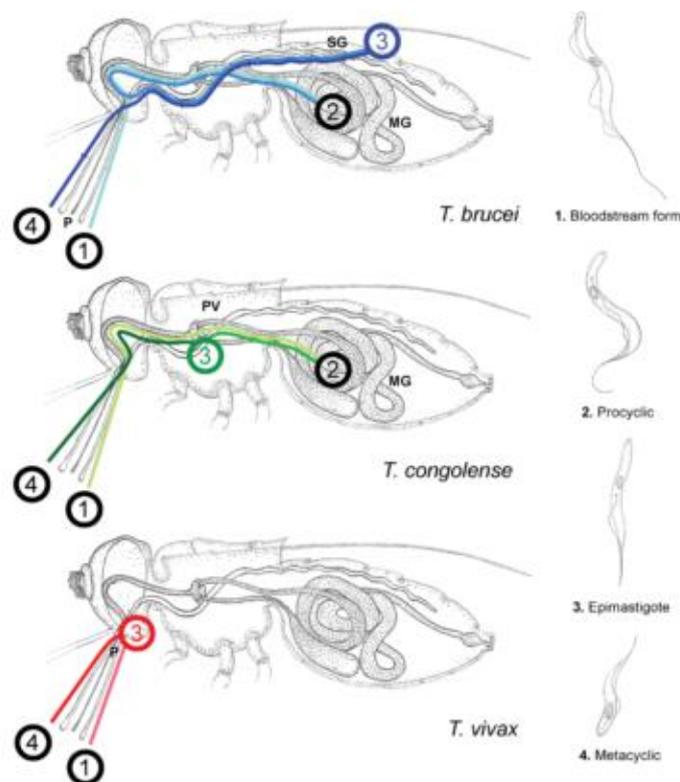


Figura 2. Ciclo de vida dos agente etiológicos das Tripanosomoses Africanas nas *Glossina* sp. (JACKSON et al., 2015).

Segundo Jackson et al. (2015), *T. vivax* nas Américas, pela ausência do hospedeiro

invertebrado, terá uma transmissão mecânica com auxílio de dípteros hematófagos, logo, as formas tripomastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo do inseto e permanecerão na probóscida até que sejam inoculadas em outros hospedeiros vertebrados, as formas infectantes, ou seja, não ocorrerá o ciclo biológico no organismo do vetor mecânico, permitindo uma maior velocidade no ciclo.

Na África, o ciclo biológico de *T. vivax* ocorre exclusivamente na probóscida e se degenera quando ingerido com uma refeição de sangue até o intestino médio (NGOMTCHO et al., 2017), logo, ela se diferencia da forma tripomastigota para epimastigota e depois tripomastigota metacíclica na probóscida da *Glossina*, conforme exposto na Figura 2. A ausência desses vetores na América do Sul limitou o número de espécies de tripanosoma envolvidos na doença dos ruminantes domésticos, onde apenas *T. vivax*, *T. evansi* e *T. theileri* foram encontrados, sendo transmitidos por *Haematobia irritans*, tabanídeos, *Stomoxys* sp. ou fômites contaminados com sangue (OTTE; ABUABARA, 1991; SUMBA et al., 1998; DESQUESNES, 2004).

A transmissão de *T. theileri* ocorre ciclicamente por insetos hematófagos, principalmente tabanídeos, porém há relatos da transmissão por contaminação através de formas tripomastigotas metacíclicas presentes em conteúdo intestinal de tabanídeos infectados (SUGANUMA et al., 2019) e carrapatos como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Hyalomma anatolicum anatolicum* (LATIF et al., 2004; MARTINS et al., 2008; PAOLETTA et al., 2017), outras formas de transmissão, como a transmissão vertical, foram hipotetizadas (AMATO ET AL., 2019). Segundo Martins, Leite e Dole (2008), formas flageladas de um *Trypanosomasp.* mostrando cinetoplasto perto ou na frente do núcleo, uma membrana curta ondulante e flagelo livre foram encontrados em uma cepa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, no Rio Grande do Sul/ Brasil. Citaram também que na Argentina, o *Rhipicephalus (B.) microplus* já foi incriminado por transmitir *T. theileri* em bovinos, esta diversidade de vetores pode ser fundamental para a sobrevivência deste protozoário. Além disso, este protozoário não tem como hospedeiros vertebrados apenas os bovinos (*Bos taurus*), mas outros bovídeos, como bisontes e búfalos (CALZOLARI et al., 2018).

No Brasil, a extensa área geográfica utilizada para a pecuária e o intenso fluxo interno de animais favorecem o contato e transmissão de *T. theileri* e permite eventos genéticos que aumentam a diversidade de parasitos (HOARE, 1972; GARCIA et al., 2011).

Na América do Sul, através de estudo de vigilância longitudinal, foi determinado que a Tripanossomose animal ocorre de forma subclínica com surtos epizoóticos periódicos,

relacionados com a sazonalidade de vetores mecânicos e eventualmente modulados por fatores dos hospedeiros, como idade, raça, presença de estresse, bem como através de condições ambientais (clima e altitude) e características dos parasitos (linhagem e variabilidade genética), fato este comprovado por estudos epidemiológicos que apontaram os tabanídeos como principais vetores mecânicos para as tripanossomoses. A infecção do gado por *T. theileri* é mais provavelmente mediada pela ingestão de moscas infectadas e também pela transmissão vertical (GARCIA et al., 2014; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017).

2.3 Manifestações Clínicas

Trypanosoma vivax apresenta diferentes níveis de virulência e patogenicidade, sendo o quadro agudo em bovinos caracterizado com perda de peso (Figura 3A), redução da produção leiteira, aborto e mortalidade, as principais alterações encontradas. Porém, em regiões endêmicas na África, é possível observar quadros clínicos crônicos nos animais infectados. Na África Oriental, contrariando os demais relatos é possível encontrar o *T. vivax* causando doença hemorrágica por produção de autoanticorpos e a doença não hemorrágica (MAGONA, WALUBENGO, ODIMIN, 2008).

Nas áreas endêmicas no Brasil, os animais normalmente são assintomáticos (CORTEZ et al., 2006). Entretanto, alterações hematológicas e nervosas, que podem levar a morte, além de abortos e alterações na reprodução, foram descritas em bovinos, ovinos e caprinos infectados por *T. vivax* (SILVA et al., 2009).

O curso da infecção por *T. vivax* varia entre as cepas de parasitos isolados, bem como as espécies e raças de ruminantes hospedeiros (BATISTA et al., 2008).

De acordo com Batista et al. (2012), doença em recém-nascidos, mortalidade e aborto são as principais causas para os prejuízos econômicos na pecuária quando temos um rebanho infectado por *T. vivax*. Na África, fala-se muito sobre raças de bovinos tripanotolerantes, os quais vão apresentar a infecção para este parasita, porém a gestação e o parto ocorrem normalmente. Além disso, a possibilidade de transmissão transplacentária foi comprovada pela presença do agente em fetos e neonatos. Bezerros oriundos destas gestações nascem fracos, com pouco peso e podem apresentar morte prematura.

Os bovinos infectados com *T. vivax* podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como: perda de apetite, febre, fraqueza (Figura 3B), diarreia, aborto e sinais clínicos

neurológicos. A evolução do quadro clínico pode ocasionar o óbito do animal. Anemia e hipoproteinemia são comumente observados nos animais infectados (CADIOLI et al., 2015).

Segundo Batista et al. (2007) anemia, leucopenia, lacrimejamento e fraqueza progressiva, marcada por perda de peso e abortos são comumente vistos nos animais infectados por *T. vivax*. Estes autores também relatam o primeiro surto no Nordeste do Brasil em gado leiteiro, os quais apresentaram febre, anemia e perda de peso. Além disso, todos os bovinos com sinais neurológicos morreram, e outros abortaram ou os bezerros nascidos morreram após nascimento.

Paiva et al. (2000) relata em seu estudo que a diferença entre as manifestações clínicas entre as cepas africanas e americanas de *T. vivax*, está diretamente relacionada com a adaptação à transmissão não cíclica pois ela reduz a variação antigênica do parasito, restringindo-a ao organismo do hospedeiro vertebrado.



Figuras 3A e 3B. Bovinos positivos para *T. vivax* com emagrecimento e fraqueza (COSTA et al., 2016a).

As infecções por *T. theileri* normalmente são subclínicas, porém os sinais clínicos mais encontrados em bovinos são anemia e aborto, com taxa de até 47% (LEE et al., 2013; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017). Além disso, existe a evidência de transmissão vertical através do diagnóstico em fetos e recém-nascidos de bovídeos. As patologias encontradas neste agente normalmente estão associadas a condições inflamatórias, como peritonite e edema submandibular (FISHER et al., 2013).

A baixa patogenicidade de *T. theileri* em ruminantes sadios tem sido geralmente atribuída à baixa parasitemia, porém a doença clínica pode estar relacionada a animais imunocomprometidos, grávidas ou infectados com o vírus da leucemia bovina (MATSUMOTO et al., 2011; SUGANUMA et al., 2019), bem como co-infecção com outros hemoparasitos, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* e *Theileria* sp. (YOKOYAMA et al., 2015; GUNASEKARA et al., 2019).

A baixa parasitemia permite que o parasito persista por longo tempo circulante no organismo do hospedeiro, o que demonstra a evasão do sistema imune de forma eficaz. Isto permite que os animais não sejam tratados antes de contaminar novos vetores, disseminando para o rebanho rapidamente, principalmente se houver animais imunocomprometidos, doentes ou estressados. Com isso, *T. theileri* pode estar presente em mais de 80% do gado, mas em parasitemias muito baixas no sangue e em tecidos de animais infectados (MOTT et al., 2011).

Lee et al. (2013) relataram que além de raramente as formas tripomastigotas de *T. theileri* serem encontradas na corrente sanguínea, é possível visualizar em bovinos infectados, o parasito associado com linfócitos, em líquido cefalorraquidiano, e possivelmente poderia infectar transplacentariamente via vasos sanguíneos os fetos de animais infectados. Além disso, órgãos vitais como gânglios linfáticos, cérebro, fígado, baço e rins podem ser invadidos por estas formas na tentativa de se evadir do sistema imune (RODRIGUES et al., 2010; BAKARI et al., 2017), isto permite alterações fisiológicas como mudança de pH do sangue, hormônios, nutrientes e níveis metabólicos (colesterol e creatinina) em diversos animais. Este fato pode ser observado através dos aumentos significativos de enzimas séricas como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) durante infecções experimentais. Logo, os perfis bioquímicos e hematológicos são índices importantes para o diagnóstico e prognóstico da doença (BAKARI et al., 2017).

2.4 Distribuição Mundial

Em áreas endêmicas para *T. vivax* da América Latina, a presença de sinais clínicos é esporádica, e ainda se desconhece os fatores de risco associados a estes episódios (OTTE et al., 1994). Segundo Paiva et al. (2000), condições nutricionais associadas a uma alimentação de melhor qualidade durante o período de chuvas permite que os animais controlem o desenvolvimento de parasitemia de *T. vivax* impedindo que estas ocasionem anemia, ou seja, ocorre o abrandamento da doença clínica, tornando-se assintomática.

Otte e Abuabara (1991) verificaram que em bovinos mantidos em áreas com diversos tabanídeos, principalmente *Tabanus importunus*, poderia haver a transmissão mecânica de *T. vivax*. Além disso, Otte e colaboradores em 1994 em seu estudo afirmaram que a presença de áreas pantanosas e insetos hematófagos, são fatores essenciais para a transmissão deste parasito na América Latina, inclusive o Brasil.

Na Paraíba, através do estudo de Batista et al. (2009), foi possível verificar a existência de bovinos, ovinos e caprinos com real prevalência de *T. vivax* em propriedades rurais como portadores crônicos, ou seja, animais infectados porém com parasitemia não detectável em exames laboratoriais. Esta condição permite que os animais sejam difusores do parasito para outras áreas ou até estarem sujeitos a novos surtos quando na presença de fatores predisponentes.

Atualmente, a presença do *T. vivax* já foi observado no estado do Rio de Janeiro (COSTA et al., 2016a; COSTA et al., 2016b) com surto de bovinos da raça Holandesa, nos municípios de Piraí, Vassouras e Areal, o que ocasionou prejuízos econômicos às fazendas devido a perda na produção leiteira e óbito de alguns animais. Nestas áreas, a transmissão foi relacionada principalmente à via mecânica de disseminação do agente através de agulhas utilizadas para aplicação de ocitocina e vacinação.

Como hospedeiros de *T. vivax*, no Brasil, podemos citar a ocorrência da infecção em bovinos, ruminantes silvestres (JONES; DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008), búfalos (SHAW; LAINSON, 1972), caprinos e ovinos (BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2009) e equinos (DA SILVA et al., 2011).

A prevalência de *T. theileri* varia consideravelmente em diferentes países, de 10% a 90% (LEE et al., 2010). Está presente em todos os continentes com exceção da Antártica, ocorrendo na Europa (Alemanha, Bélgica, Escócia, Espanha, França, Inglaterra, Irlanda, Polônia e Itália), América do Norte (Canadá e EUA), América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela) e Ásia (Bangladesh, Coreia, Sri Lanka, Vietnã, Filipinas, Japão, Tailândia) (AMATO et al., 2019; GARCIA et al., 2006; GARCIA et al., 2011; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2017). No Brasil, já foi encontrado no Rio Grande do Sul (MARTINS, LEITE, DOYLE, 2008), Rondônia, Amazônia, Mato Grosso do Sul, Pantanal, São Paulo, Pará, Paraná e Rio Grande do Sul (RODRIGUES et al., 2006; MARTINS et al., 2008; PACHECO et al., 2018) e Santa Maria Madalena/Rio de Janeiro (GONÇALVES et al., 1998).

2.5 Diagnóstico Laboratorial

Segundo Boulangé et al. (2017), as técnicas de diagnóstico da Tripanossomose Animal Africana (TAA) podem ser divididas em duas categorias: detecção do próprio parasita ou de seus constituintes (antígenos, DNA) e anticorpos. O primeiro permite a detecção de uma infecção atual, enquanto o último geralmente não consegue diferenciar entre infecções atuais e infecções curadas recentemente, devido a persistência de anticorpos na corrente sanguínea na ausência de uma infecção ativa.

2.5.1. Parasitológico

A pesquisa em capa leucocitária é realizada a partir da centrifugação do sangue total coletado em tubo com anticoagulante EDTA à 10%, inserido em tubo de microhematócrito (BASTOS et al., 2015), com centrifugação em microcentrifuga com rotação de 11.500 rpm, durante 5 a 10 minutos. A porção entre o plasma e papa de hemácias, é chamada de capa leucocitária, que é depositada em lâmina de microscopia óptica onde se realiza um esfregaço sanguíneo com esta capa leucocitária. Após seco o esfregaço, o mesmo é corado com corante de Romanowsky e pode-se observar formas tripomastigotas em objetiva de 100 vezes (DA SILVA et al., 2011).

Os métodos de detecção de parasitos incluem a técnica de centrifugação microhematócrita, considerada padrão ouro, pois é rápido e fácil de executar, porém apresenta baixa sensibilidade quando comparado a análise molecular, a qual requer equipamentos caros e expertise de mão de obra (BOULANGÉ et al., 2017), fato que corrobora com Cadioli et al. (2015) e Fidelis Jr et al. (2019) quando relataram que estes métodos apresentam baixa sensibilidade principalmente quando os animais infectados por *T. vivax* tem baixa parasitemia ou estão em períodos aparasitêmicos (infecções crônicas), ou normalmente como ocorre com os protozoários do subgênero *Megatrypanum* que são de difícil observação no sangue dos hospedeiros vertebrados, e mesmo o isolamento em cultura não é uma ferramenta fácil para sua identificação (CALZOLARI et al., 2018).

2.5.2. Imunológico

As técnicas sorológicas de ELISA (Imunoensaio Enzimático) e IFI (Imunofluorescência Indireta), são efetivas para detectar animais infectados cronicamente (SAMPAIO et al., 2015), porém, como os níveis de anticorpos (IgG) permanecem por um longo período, não é possível diferenciar animais com infecção ativa dos que foram tratados

ou curados, gerando um custo adicional para o tratamento dos rebanhos. Para isso, a técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) passa a ser mais eficiente (CADIOLE et al., 2015).

O ELISA sanduíche tem o benefício de permitir a triagem de alto rendimento, e requer equipamento mais barato que o PCR. Já o teste de Imunofluorescência Indireta utiliza parasitos fixados em lâmina, sendo considerado o padrão-ouro para detecção de anticorpos no TAA, porém necessita de lisado de tripanossoma como alvo (cultivo celular), o que limita a utilização desta técnica, além deste lisado possibilitar a reação cruzada entre os tripanosomas. O uso de antígenos recombinantes traz a promessa de resolver estas limitações, no entanto, todos esses métodos exigem custos relativamente altos (BOULANGÉ et al., 2017).

Segundo Osório et al. (2008), as técnicas sorológicas de IFI e ELISA, podem ser utilizadas para o diagnóstico direto e indireto pois são importantes para realizar investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação da distribuição de *T. vivax*. O maior problema dos testes sorológicos está relacionado à especificidade devido a reação cruzada com outros parasitos do mesmo gênero, principalmente em áreas endêmicas onde ocorrem infecções por *T. evansi*.

Uma outra ferramenta de diagnóstico é o teste de imunoadsorção enzimática indireta com antígeno solúvel de isolado de *T. vivax*, como foi feito na região de Poconé do Estado de Mato Grosso por Madruga et al. (2003), os quais afirmam que essa prova sorológica permite realizar uma triagem e avaliar a distribuição desse hemoprotozoário quando se pretende realizar um estudo epidemiológico com um N populacional grande.

Testes sorológicos, incluindo anticorpo imunofluorescente indireto teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) e teste de diagnóstico rápido por imunocromatografia (RDT), são as ferramentas de escolha para estudo epidemiológico ou como método de triagem, mas não indicam se a infecção está ativa ou se o animal respondeu ao tratamento (CADIOLE et al., 2012; FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

2.5.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade superior ao exame parasitológico (ZARLENGA; HIGGINS, 2001). Por isso, várias técnicas de PCR para o diagnóstico de *T. vivax* foram desenvolvidas e avaliadas nos últimos anos (MASAKE et al. 1997; GEYSEN et al., 2003). Quando comparada uma PCR convencional com uma Nested

PCR, a última apresenta uma sensibilidade superior às demais já que ocorre a depuração do DNA estudado (MADRUGA et al., 2003). Existem diversos autores no Brasil (DÁVILA et al., 2003; CORTEZ et al., 2009; SILVA et al., 2009; CUGLOVICI et al., 2010; SILVEIRA et al., 2013; CADIOLE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015) e no mundo, que vem utilizando a PCR como forma de diagnóstico para este hemoparasito.

As técnicas de diagnóstico molecular, tais como a PCR, têm geralmente sido ferramentas muito específicas e sensíveis, capazes de detectar parasitemias tão baixas quanto um tripanossoma por mililitro de sangue. Além disso, a PCR tem sido capaz de detectar o agente mesmo após 3-4 dias de administração de tripamidium (SAMPAIO et al., 2015).

A LAMP, é uma técnica de amplificação isotérmica, relativamente rápida e simples), usada principalmente em laboratórios com poucos recursos, além disso, ela é capaz de diagnosticar amostras de sangue com inibidores, fato que a PCR convencional não faz e pode ser usada como uma ferramenta estratégica para detectar amostras positivas para *T. vivax* (CADIOLE et al., 2015).

Estudos moleculares para *T. theileri* são limitados pelos baixos níveis de parasitemia nos hospedeiros vertebrados (RODRIGUES et al., 2003, 2010), porém pode ser diferenciado de outros tripanossomas por amplificação por PCR de sequências dos marcadores genéticos de *ITS* de *rDNA*, *SL* e *catl* (GARCIA et al., 2011), além destes, é possível utilizar as sequências de genes da região V7V8 do *SSU rDNA* (MAIA DA SILVA et al., 2004) e glicossomal desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (*gGAPDH*) (PACHECO et al., 2018).

Além da baixa parasitemia, a infecção concomitante com outros tripanossomas pode atrapalhar o diagnóstico de *T. theileri*, para isso, faz-se necessário a utilização de marcadores moleculares para um diagnóstico sensível e específico deste tripanossoma em vertebrados e hospedeiros invertebrados (RODRIGUES et al., 2010). Apesar disto, a PCR continua sendo a melhor forma de diagnóstico para *T. theileri*, uma vez que a detecção de anticorpos através do método de ELISA não consegue diferenciar infecção ativa e curada (GEYSEN et al., 2003).

Segundo Sampaio et al. (2015) a sensibilidade do diagnóstico molecular é tamanha, que atualmente é capaz de detectar um tripanossoma por mililitro de sangue ou até mesmo detectar o agente após 3 a 4 dias após administração de tripamidium.

2.6.2.1. Análise filogenética dos tripanossomatídeos com enfoque em *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri*

A) Marcador molecular do gene ribossomal 18S

A análise da sequência do gene ribossomal tem sido empregada na identificação genética, e permite que novos tripanosomas sejam organizados dentro de uma árvore filogenética e comparados com outras sequências, auxiliando na taxonomia destes parasitos. Para isso, o gene *18S* vem sendo amplamente utilizados para *T. vivax*, já que apresenta domínio alternativo e variável, permitindo que seja amplificado por primers nas regiões conservada e específicas (GEYSEN et al., 2003; ADAMS et al., 2010). Além disso, a subunidade menor (SSU) do gene *18S*, fragmento de DNA ribossomal, foi utilizado no estudo de Rodrigues et al. (2008), onde observou-se que cepas de *T. vivax* da Tanzânia e Moçambique diferiram das sequências do Leste e Oeste Africano na árvore filogenética, definindo a partir deste momento a existência de três clados deste parasito.

B) Marcador molecular do gene cisteino-protease (*Catepsina L-like*)

Os genes que expressam a cisteino-protease (*catl*) participam do metabolismo de proteínas da família Trypanosomatidae, hidrolisando ligações peptídicas, e também de funções regulatórias como: a evasão do sistema imune, invasão de células, apoptose, virulência e patogenicidade (SAJID; McKERROW, 2002).

Garcia et al. (2011) relataram que o gene *catl* dos tripanossomatídeos são codificados por uma família multigene organizada como várias cópias repetidas em tandem expandida por duplicações gênicas, isto ocorre porque estes genes são aparentemente submetidos a uma evolução concertada, o que permite que sejam usados nos estudos evolutivos de cinetoplastídeos apoiando as filogenias com base nos genes *SSR rDNA* e *gGAPDH*.

Segundo Cortez et al. (2006) ao estudar sequências da África e América do Sul através do gene *catl-like*, as cepas de *T. vivax* da África Ocidental, apresentaram-se mais patogênicas quando comparadas com as do Leste Africano, sendo a primeira mais próxima das cepas observadas na América do Sul. Nakayima et al. (2013) também utilizaram o gene de *catl-like* para confirmar a relação existente entre amostras oriundas da África Ocidental com sequências da América do Sul, bem como comparar sua patogenicidade.

Através da análise filogenética de sequências de *T. theileri* é possível verificar que o clado é formado por um grupo complexo de parasitos separados em duas linhagens (TthI e TthII) que abrigam 14 genótipos distintos utilizando dois marcadores moleculares diferentes (SSU e ITS), TthI (IA / IB / IC / Tailandês Ia / Thai Ib) e TthII (IIA / IIB / IIC / Tailandês IIa) (GARCIA et al., 2011; CALZOLARI et al., 2018). Na América do Sul, o genótipo ThIA foi encontrado exclusivamente em búfalos e, no Brasil, apenas os genótipos TthIIA / B foram

encontrados. Segundo Pacheco et al. (2018), a extensa região geográfica do Brasil permite maior diversidade genética de *T. theileri*, principalmente devido ao grande número de animais na pecuária e a utilização de novos marcadores polimórficos, como *ITS*, *SL* ou *catl*, melhor evidenciam a diversidade genotípica, expandindo para 18 genótipos descritos Tth I (IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II, IJ, IK, IL) e Tth II (IIA, IIB, IIC, IID) e as linhagens IIE e IIF recentemente incorporadas a literatura por Suganuma et al. (2019).

A extensa área geográfica utilizada para a pecuária e o intenso fluxo interno de animais no Brasil, favorecem transmissão de diversos hemoparasitos como *T. theileri* e uma maior diversidade genética deste parasito (YOKOYAMA et al., 2015).

Nos relatos de Garcia et al. (2011), Lee et al. (2013) e Yokoyama et al. (2015) foi visualizado em árvore filogenética que isolados do Brasil, Estados Unidos, Tailândia e outros países asiáticos podem ser idênticos, o que pode estar diretamente relacionado ao trânsito do rebanho bovino entre países e aos materiais utilizados pelo gado. Porém Rodrigues et al. (2006) não corroboram com a afirmação acima, já que apesar da Tailândia ter intensa movimentação de gado dentro do país, normalmente não introduz animais de países distantes, e a inseminação artificial é comumente utilizada na reprodução, esta restrição faz supor que existe um papel importante na evolução genotípica.

2.5.4. Outros Exames

Os proteinogramas séricos são uma ferramenta diagnóstica capaz de prever prognósticos, indicando a fase de infecção e resposta ao tratamento de diferentes doenças. Como exemplo destes temos as proteínas de fase aguda (APPs) as quais são glicoproteínas produzidas pelo fígado que indicam a gravidade da doença e extensão do dano tecidual, sua quantificação pode fornecer informações sobre o diagnóstico e prognóstico da doença. Em ruminantes, as principais APPs são amiloide A, haptoglobina e lipopolissacarídeo (SAMPAIO et al., 2015).

Na maioria das infecções, *T. theileri* não pode ser detectado por métodos devido à baixa parasitemia, porém, a hemocultura apesar de oferecer um resultado demorado (15-30 dias), requer sangue colhido assepticamente e amostras frescas, tem sido um método confiável (VERLOO et al., 2000). Além disso, apresentam baixa sensibilidade, mas são ferramentas insubstituíveis que indicam a competência do animal para ser uma fonte de infecção para o vetor (RODRIGUES et al., 2019).

Trypanosoma vivax é geralmente difícil de cultivar em laboratório e isso restringiu os estudos biológicos a esse parasito, e por isso não entrou em uso rotineiro para diagnóstico laboratorial (ZWEYGARTH et al., 1991). Por isso, a maioria dos modelos são desenvolvidos *in vivo* e poucas cepas de *T. vivax* foram isoladas de roedores (GIBSON, 2012). Porém recentemente foi criado um sistema simplificado para o cultivo *in vitro* a partir de *T. vivax*, o que irá permitir um avanço no estudo do metabolismo e fisiologia deste parasito, bem como na formulação de novos tripanocidas (GIORDANI et al., 2016).

2.6 Tratamento e controle

O controle da Tripanosomose Africana em animais deve ser um conjunto de medidas, como: restringir a circulação de animais doentes, tratar os animais infectados, monitorar através de estudos epidemiológicos a distribuição e gravidade da doença e eliminar ou controlar os vetores. Para o tratamento ser eficaz, faz-se necessário um tripanocida aplicado corretamente nos animais infectados, além disso, deve-se realizar um manejo nutricional de qualidade durante a doença. O maior entrave para o tratamento tem sido a tripanosomose crônica, quando os animais infectados cronicamente não respondem à terapêutica, o que faz com que continuem magros e com anemia por deficiência de ferro (OSÓRIO et al., 2008).

Para o tratamento de infecções por *T. vivax*, os melhores fármacos incluem: diaceturato de diminazeno (Beronal®, Berenil® e Ganaseg®) e cloreto de isometamidium (Trypamidium®, Vivendium®) (DESQUESNES et al., 1995).

Os tripanocidas têm um forte apelo econômico junto aos proprietários, uma vez que fornecem os meios para proteger os bens privados, permitir resultados impressionantes a baixo custo e reduzir a mortalidade do rebanho. O desenvolvimento de resistência a tripanocidas em tripanosomas é uma ameaça contínua ao uso sustentável no controle da doença, e no desespero do proprietário para o controle, há a ameaça de resistência aos tripanocidas, por isso faz-se necessário uma estratégia de manejo adequada (VAN DEN BOSSCHE et al., 2000).

Apesar de diversos pesquisadores tentarem desenvolver uma vacina para os tripanosomas, o maior entrave é a complexidade antigênica destes protozoários, impedindo que as terapias imunogênicas sejam aplicadas tão cedo (OSÓRIO et al., 2008).

Portanto, as perdas econômicas ocorridas pelas tripanosomoses, não se devem apenas a mortalidade e redução na produção de leite e carne, mas também aos custos elevados na prevenção e tratamento dos animais infectados (PAOLETTA et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição dos locais de estudo

Para este estudo, 389 bovinos foram amostrados em quinze municípios do estado do Rio de Janeiro, onde ocorreu o surto de *T. vivax*, durante o período de 2016 à 2018, a saber: Areal, Barra do Piraí, Barra Mansa, Cantagalo, Carapebus, Duas Barras, Itaguaí, Paraíba do Sul, Piraí, Rio Claro, Rio das Flores, Santo Antônio de Pádua, Seropédica, Trajano de Moraes e Valença, com os respectivos georreferenciamentos conforme Figura 4. As propriedades foram selecionados por conveniência de acordo com o histórico de animais doentes.

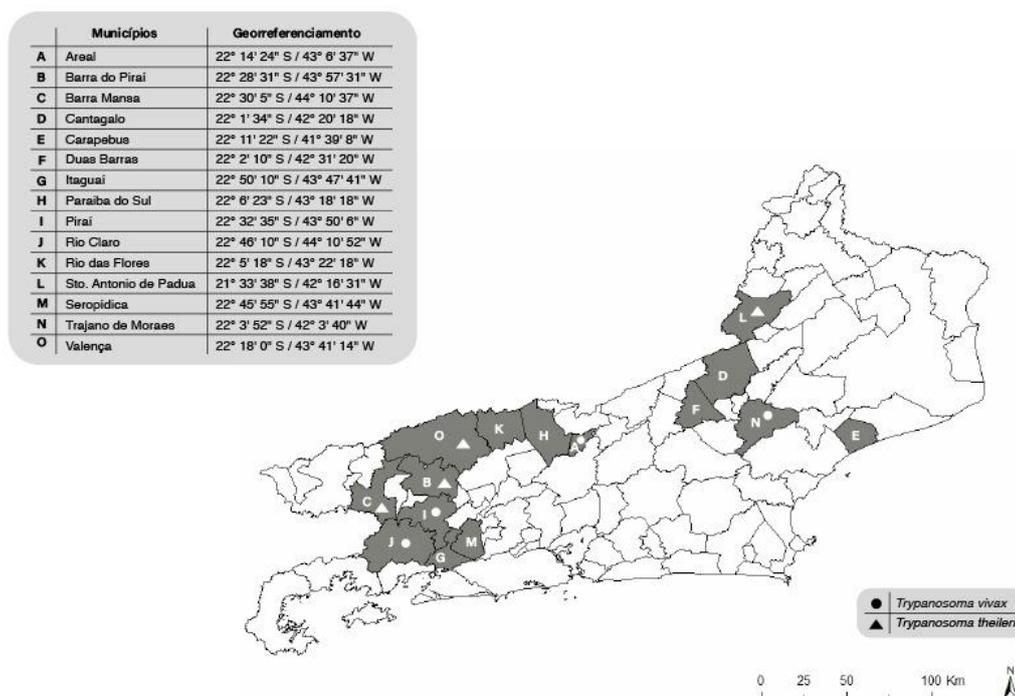


Figura 4. Mapa do estado do Rio de Janeiro com origens geográficas de amostras positivas de *Trypanosoma vivax* (círculo) e *Trypanosoma theileri* (triângulo) caracterizados neste estudo em cidades com suspeita de infecção por *Trypanosoma vivax*.

Quanto as classificações climáticas de vegetação, temperatura, chuva e características sazonais, é possível classificar o clima dos municípios estudados apresentam latitudes (sul) de 22°, incluindo estas na zona climática A ou Clima Megatérmico (Clima Tropical Chuvoso), porém como o inverno nestas cidades são secos e com precipitação média inferior à 60mm em pelo menos um dos meses desta estação, podemos ainda classificar o tipo climático

fundamental e variedade dentro do grupo A como Aw. O único município de tem latitude diferente é Santo Antônio de Pádua, que tem um clima tropical, com muito menos pluviosidade no inverno que no verão e também apresenta a classificação do clima como Aw de acordo com Köppen e Geiger, dados disponíveis no site climate-data.org.

3.2 Amostragem

Os bovinos coletados foram de ambos os sexos, de todas as faixas etárias, de diferentes raças e animais que desenvolviam diferentes aptidões zootécnicas (leite e carne). Não houve estratificação amostral por propriedade ou cidade coletada, sendo coletados os seguintes animais por município: Areal (n=146), Barra do Piraí (n=9), Barra Mansa (n=22), Cantagalo (n=8), Carapebus (n=4), Duas Barras (n=14), Itaguaí (n=14), Paraíba do Sul (n=17), Piraí (n=16), Rio Claro (n=14), Rio das Flores (n=15), Santo Antônio de Pádua (n=76), Seropédica (n=2), Trajano de Moraes (n=2) e Valença (n=30), totalizando 389 bovinos.

Após a devida contenção física dos animais, o sangue total foi coletado da veia coccígea com agulha 25 x 7mm em tubos estéreis de 4 mL contendo o anticoagulante EDTA (ácido etileno diaminotetracético) à 10%. As amostras foram mantidas sob refrigeração em isopor hermeticamente fechado até chegar ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram processadas.

As amostras de sangue total foram aliquotadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificadas por numeração sequencial e mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA total.

3.3 Avaliação do Esfregaço Sanguíneo

As amostras de sangue coletadas para este estudo foram usadas para a confecção de esfregaços sanguíneos. Essas lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos, coradas pelo Método de Giemsa (1:10), e submetidas à microscopia óptica com objetiva de imersão (100x) e aumento da ocular de 10x, para possibilitar a visualização direta de parasitos. Aproximadamente 100 campos foram avaliados por lâmina.

3.4. Extração do DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de 300 µL de cada amostra sanguínea de bovino usando kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído em 100 µL da solução de reidratação que

acompanha o kit, sendo acondicionada em microtubos de 0,6mL em três alíquotas e mantida à -20°C. Posteriormente, as amostras foram quantificadas e analisadas quanto a qualidade por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000). As concentrações das amostras de DNA variaram e foram padronizadas em 20 ng / uL nas alíquotas. O DNA total foi armazenado em microtubos de 1,5 mL a -80 °C para análise molecular.

Tanto a extração de DNA, quanto o preparo das reações e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados, evitando a ocorrência de contaminação. Além disso, ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

As amostras de DNA de sangue bovino foram submetidas à amplificação do fragmento *18S* do DNA ribossomal de *Trypanosoma* sp. por PCR convencional com o objetivo de realizar uma triagem das amostras. As reações com alvo no *18S rDNA* foram realizadas utilizando os iniciadores 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA -3 ') e o iniciador reverso 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATATTGCATATAC3'), que amplificam aproximadamente 780 pb (GEYSEN et al., 2003), com adaptações na concentração de dNPT, MgCl₂ e Taq, conforme descrito abaixo. O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 13,5 µL de água ultrapura, 1X de tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,8 µM de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerase (Platinum® *Taq* DNA Polymerase) e 5 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 4 min seguido por 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 ° por 1 min 30 s e 72 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C por 4 min.

Na reação de *T. vivax* com o gene *catl*, os primers DTO 154 (5'-ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG-3') e DTO155 (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3 ') foram utilizados, amplificando internamente 500 pb (CORTEZ et al., 2009), com adaptações na concentração de dNPT, MgCl₂ e Taq, conforme descrito a seguir. O volume final da reação foi de 30 µL contendo: 17,45 µL de água ultrapura, 1X tampão de amplificação, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,5 mM de cada primer, 1,5U de DNA polimerase Taq (Platinum® *Taq* DNA Polymerase) e 5 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min e 72 °C durante 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Para *T. theileri*, a reação para amplificação do fragmento do gene *catl* utilizou o par de primers Tthcatl1 (5'-CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC-3') e DTO155 (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3'), amplificando aproximadamente 273 pb (YOKOYAMA et al., 2015), com adaptações na concentração de dNPT, MgCl₂ e Taq, conforme descrito abaixo. O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 14,8 µL de água ultrapura, 1X tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,5 µM de cada iniciador, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase) e 4 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 94 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min e 72 °C durante 1 min, com extensão final a 72 °C por 5 min.

O controle positivo para *T. vivax* (MH184514) e para *T. theileri* (MN966843) foi obtido de vacas com alta carga parasitária em esfregaços de sangue e confirmado por sequenciamento de DNA para o gene *18 S rDNA*, sem co-infecção. Para os controles negativos utilizamos água ultrapura para PCR, dentro e fora do fluxo laminar. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% a 100 V por 40 min, corados com brometo de etídio e fotografados.

Tabela 1. Lista de primers usado na PCR

Organismo	Alvo DNA	Primer	Sequência de oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho (bp)	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Trypanosoma</i> sp.	18S	18STnF2	CAACGATGACACCCATGAATTGGGGGA	800	59 °C	(GEYSEN et al., 2003)*
		18STnR3	TGCGCGACCAATAATTGCAATAC			
<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>catl-Like</i>	DTO 154	ACAGAATTCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG	500	56 °C	(CORTEZ et al., 2009)*
		DTO 155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA			
<i>Trypanosoma theileri</i>	<i>catl-Like</i>	Tthcatl1	CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC	273	62 °C	(YOKOYAMA et al., 2015)*
		DTO 155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA			

*A reação de PCR foi modificada.

3.6 Purificação do Produto da PCR

Os “amplicons” resultantes foram submetidos ao processo de purificação com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos produtos purificados pôde ser estimada em gel de agarose a 2%, onde um volume de 5 µL dos produtos purificados foram homogeneizados em 1,5 µL de tampão de amostra. Como escala de massa molecular foi

utilizado 4 µL de Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen®).

3.7 Sequenciamento de nucleotídeos

As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977), onde para o fragmento do gene *18S rDNA* um par de primers descritos no estudo de Geysen et al. (2003) para *Trypanosoma* sp. foi utilizado: 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') e 18STnR3 (5'-TGCTCG ACC AAT AAT TGC AAT AC -3'), amplificando aproximadamente 780 pb.

Para o sequenciamento de *T. vivax* com o gene *catl*, os primers DTO 154 (5'-ACA GAA TTC CAG GGC CAA TGC GGC TCG TGC TGG-3 ') e DTO155 (5'-TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA -3 ') e o primeiro Tvicat11 (5'-GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA -3'), amplificando internamente 500 pb (CORTEZ et al., 2009).

Para *T. theileri*, a reação do gene *catl* utilizou o par de primers Tthcat11 (5'-CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC-3') e DTO 155 reverso (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3'), amplificando aproximadamente 273 pb (YOKOYAMA et al., 2015).

O sequenciamento das amostras foi realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL, USP).

3.8. Análise do Sequenciamento

As seqüências de *T. vivax* baseado no gene *18S* deste estudo foram montadas e editadas usando o programa CLC Genomics WorkBench v5.1, e depositadas no GenBank sob os números de acesso MH184514.1, MH184515.1, MH184517.1, MN966704.1, MN966705.1, MN966706.1, MN966707.1, MN966708.1 e MN966709.1, já as seqüências para o gene *catl* foram depositadas sob os números xxxxxxxxxxxx.

As seqüências de *T. theileri* baseado no gene *18S* deste estudo foram montadas e editadas usando o programa CLC Genomics WorkBench v5.1, e depositadas no GenBank sob os números de acesso MN966843.1, MN966844.1, MN966706.1, MN966845.1 e MN966846.1, já as seqüências para o gene *catl* foram depositadas sob os números xxxxxxxxxxxx.

As seqüências obtidas neste estudo foram alinhadas com seqüências similares obtidas no GenBank usando a ferramenta Clustal W e foram ajustadas manualmente usando o

programa Mega 7.0 (KUMAR et al., 2016). A matriz de distâncias nucleotídicas divergentes foi calculada no programa CLC Genomics WorkBench v5.1.

As análises filogenéticas de *T. vivax* baseadas no gene *18S rDNA* e *catl* foram construídas pelo método da Máxima Verossimilhança (ML), modelo de Kimura-2-parâmetros (1980), sendo realizadas no MEGA 7 (TAMURA et al., 2013). Para o gene *18S*, foram utilizadas 34 sequências disponíveis no GenBank e deste estudo, com “outgroup” de *Trypanosoma congolense* (AJ009146.1) e para o gene *catl*, foram envolvidas 37 sequências de nucleotídeos, com *Trypanosoma congolense* (KF414042.1) como “outgroup”.

Nos dendogramas de *T. theileri* baseados no gene *18S rDNA* e *catl* foram construídas pelo método da Máxima Verossimilhança (ML), modelo de Kimura-2-parâmetros (1980), sendo realizadas no MEGA 7 (TAMURA et al., 2013), sendo que para o gene *18S*, foram utilizadas 29 sequências, com “outgroup” de *Leishmania chagasi* (U42465.1) e para o gene *catl*, foram envolvidas 63 sequências de nucleotídeos, com *Trypanosoma congolense* (KF414042.1) como “outgroup”.

Tabela 2. Espécies, origem geográfica dos tripanossomatídeos empregados na análise de sequências gênicas do gene *18S rDNA* e da *catL* e genotipagem.

Espécies	Número de acesso no GenBank gene <i>18S rDNA</i>	Origem geográfica	Número de acesso no GenBank gene <i>catL-Like</i>	Origem geográfica
<i>T. vivax</i>	MH184514 (This study)	Pirai/Brasil	MH184514 (This study)	Pirai/Brasil
	MH184515 (This study)	Pirai/Brasil	MH184515 (This study)	Pirai/Brasil
	MH184517 (This study)	Areal/Brasil	MH184517 (This study)	Areal/Brasil
	MN966705 (This study)	Areal/Brasil	119 (This study)	Areal/Brasil
	MN966708 (This study)	Areal/Brasil	146 (This study)	Areal/Brasil
	MN966709 (This study)	Areal/Brasil	147 (This study)	Areal/Brasil
	MN966704 (This study)	Areal/Brasil	165 (This study)	Areal/Brasil
	MN966847 (This study)	Areal/Brasil	171 (This study)	Areal/Brasil
	MN966706 (This study)	Rio Claro/Brasil	342 (This study)	Rio Claro/Brasil
	HM209400	Brasil	EU753788	Brasil
	AY363146	Brasil	EU753789	Brasil
	AY363164	Brasil	EU753790	Brasil
	AY363165	Brasil	EU753792	Brasil
	MH184514	Brasil	EU753798	Burkina Faso
	MH184515	Brasil	EU753799	Burkina Faso
	MH184516	Brasil	EU753800	Burkina Faso
	MH184517	Brasil	EU753801	Burkina Faso
	MH184518	Brasil	EU753802	Quênia
	MK392089	Brasil	EU753803	Quênia
	KM391816	Etiópia	EU753804	Quênia
	KM391818	Etiópia	EU753805	Quênia
	KM391819	Etiópia	EU753806	Moçambique
	KM391823	Etiópia	EU753807	Moçambique
	KM391821	Etiópia	EU753808	Moçambique

KM391822	Etiópia	EU753809	Moçambique
KM391823	Etiópia	EU753810	Moçambique
KM391824	Etiópia	EU753811	Moçambique
KM391825	Etiópia	EU753812	Moçambique
KM391826	Etiópia	EU753813	Moçambique
KM391827	Etiópia	EU753714	Moçambique
KM391828	Etiópia	EU753793	Nigeria
KM391829	Etiópia	EU753794	Nigeria
U22316	Quênia	EU753795	Nigeria
EU477537	Moçambique	EU753796	Nigeria
		EU753797	Nigeria
		EU753791	Venezuela
		EU753792	Venezuela

<i>T. theileri</i>	MN966845 (This study)	Valença/Brasil	11FV (This study)	Valença/Brasil
	MN966844 (This study)	Barra Mansa/Brasil	496 (This study)	Barra Mansa/Brasil
	MN966843(This study)	Barra do Pirai/Brasil	BP3(This study)	Barra do Pirai/Brasil
	MN966846 (This study)	Sto Antônio de Pádua/Brasil	263S (This study)	Sto Antônio de Pádua/Brasil
	KR024688	República da África Central	GU299345	Pará/Brasil
	MK158254	Itália	GU299347	Pará/Brasil
	AB569249	Japão	GU299349	Pará/Brasil
	AB569250	Japão	GU299351	Pará/Brasil
	AB007814	Japão	GU299353	Pará/Brasil
	KF765799	Polônia	GU299356	Pará/Brasil
	KF924257	Polônia	GU299357	Pará/Brasil
	NBCO01000006	Reino Unido	GU299358	Pará/Brasil
	AJ009163	Reino Unido	GU299360	Pará/Brasil
	AJ009164	Reino Unido	GU299361	Pará/Brasil
	JX178162	EUA	GU299367	Pará/Brasil
	JX178163	EUA	GU299375	Pará/Brasil
	JX178164	EUA	GU299376	Pará/Brasil
	JX178165	EUA	GU299385	Pará/Brasil
	JX178166	EUA	GU299387	Pará/Brasil
	JX178167	EUA	GU299391	Pará/Brasil
	JX178168	EUA	GU299392	Pará/Brasil
	JX178182	EUA	GU299401	Pará/Brasil
	JX178183	EUA	GU299403	Pará/Brasil
	JX178184	EUA	GU299406	Pará/Brasil
	JX178185	EUA	GU299413	Pará/Brasil
	JX178186	EUA	HQ664745	Camarões
	JX178187	EUA	HQ664746	Camarões
	JX178188	EUA	HQ664747	Camarões
	JX853185	EUA	HQ664748	Camarões
			HQ664749	Camarões
			MK393794	Iran
			JX860298	Filipinas
			JX860299	Filipinas
			AB930145	Sri Lanka
			AB930147	Sri Lanka
			AB930148	Sri Lanka
			AB930149	Sri Lanka
			AB930150	Sri Lanka
			AB930151	Sri Lanka
			AB930152	Sri Lanka
			AB930154	Sri Lanka
			AB930155	Sri Lanka
			AB930157	Sri Lanka

	AB930158	Sri Lanka
	AB930159	Sri Lanka
	AB930160	Sri Lanka
	AB930163	Sri Lanka
	AB930165	Sri Lanka
	LC438503	Sri Lanka
	LC438506	Sri Lanka
	LC438507	Sri Lanka
	HQ543057	Tailândia
	HQ543059	Tailândia
	HQ543061	Tailândia
	HQ543062	Tailândia
	HQ543064	Tailândia
	HQ543073	Tailândia
	AB742558	Vietnam
	AB742559	Vietnam
	AB742562	Vietnam
<hr/> <i>Trypanosoma</i> sp	GU299415	Pará/Brasil
	GU299416	Pará/Brasil
	GU299417	Pará/Brasil

3.9 Análise Estatística

Para comparar as técnicas utilizadas para o diagnóstico de *T. vivax* e *T. theileri*, adotou-se o teste de McNemar para medir as proporções de discordância entre PCR e esfregaço sangüíneo. Discordância não significativa foi considerada como $p > 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Biostat 5.0 (AYRES, 2007).

3.10. Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ (CEUA/UFRRJ), sob número de protocolo 5931200217. O comprovante da aprovação encontra-se em anexo.

3.11. Fluxograma Metodológico

Para o delineamento deste estudo, a Figura abaixo (Figura 5) demonstra o processo de coleta do sangue total em bovinos com tudos contendo EDTA, e posterior procedimentos que envolvem a biologia molecular (extração, PCR, purificação dos produtos obtidos, sequenciamento do DNA amplificado e análise do sequenciamento através dos programas MEGA 7 e CLC, com confecção de árvore filogenética para cada um dos genes utilizados (*18S rDNA* e *catl*), e pesquisa de hemoparasitos (confecção, fixação, colocação e observação microscópica dos esfregaços sanguíneos).

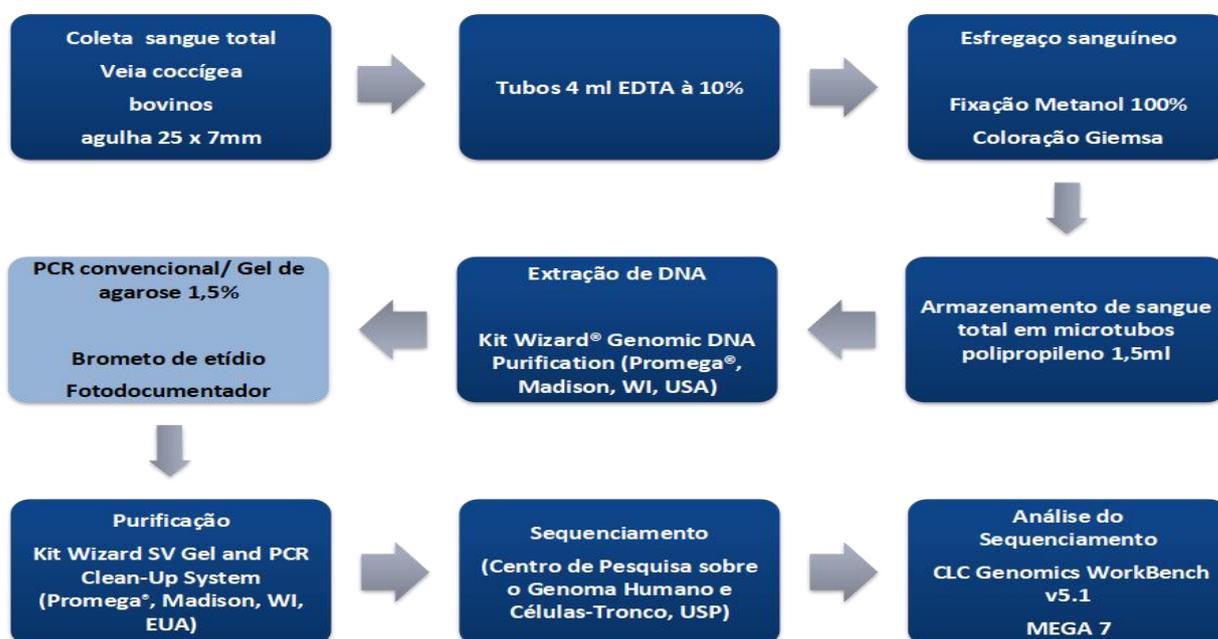


Figura 5. Fluxograma do delineamento do estudo

4 RESULTADOS

A frequência de *T. vivax* encontrada pela técnica de esfregaço sanguíneo foi de 4,4% de bovinos positivos (n = 17/389). Destes animais, 70,6% (n = 12/17) pertenciam ao município de Areal, enquanto 11,8% (n = 2/17) pertenciam a Piraí, 5,9% (n = 1/17) pertenciam a Rio Claro e 11,8% (n = 2/17) eram de Santo Antônio de Pádua (Tabela 3). Com relação ao diagnóstico direto de *T. theileri*, não foi possível encontrar formas tripomastigotas em esfregaços sanguíneos corados. Portanto, a ferramenta molecular de diagnóstico mostrou-se mais sensível que o diagnóstico direto em lâmina para este parasito.

Foram feitas também análises moleculares e filogenéticas de *Trypanosoma vivax* e *T. theileri* através dos genes *18S* e *catl-like* em bovinos naturalmente infectados. A partir de ferramentas moleculares com alvo no marcador molecular *18S rDNA* como triagem, observou-se que 11,6%(n= 45/389) animais foram positivos para *Trypanosoma* sp.

As amostras que amplificaram o gene *18S rDNA* na PCR convencional e apresentaram bandas no gel com maior intensidade (Figura 6) foram selecionadas para nova amplificação, purificação e posterior sequenciamento. O mesmo ocorreu para o gene *catl-like* para *T. vivax* (Figura 7) e *T. theileri* (Figura 8).

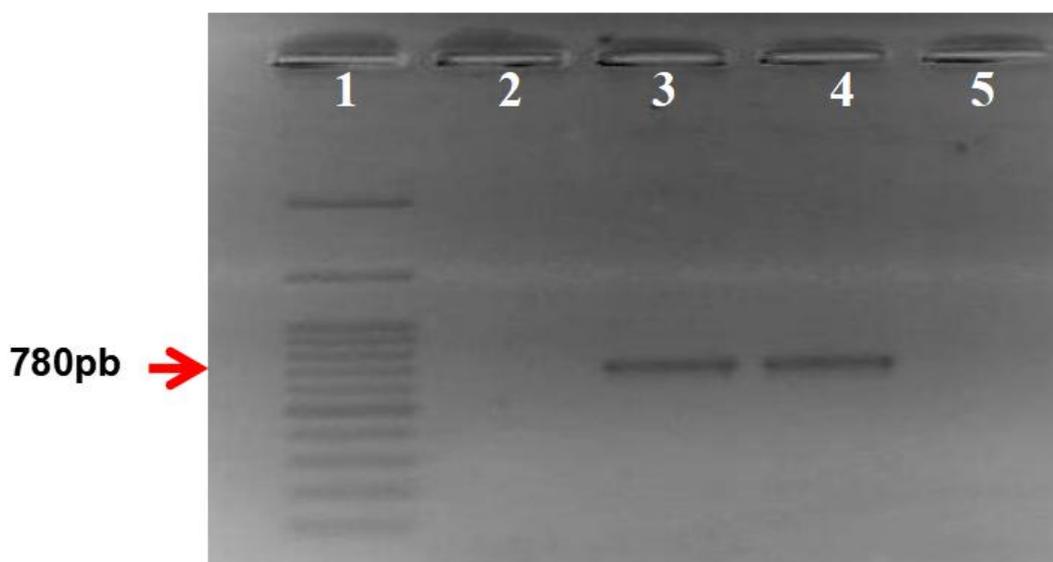


Figura 6. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 780 pb do gene *18S rDNA* para o gênero *Trypanosoma* sp. Poço: 1 - Peso Molecular (100bpPlusDNA Ladder™); 2 - Controle negativo; 3- Controle positivo de *Trypanosoma vivax*; 4 - amostra considerada positiva para *Trypanosoma* sp.; 5 - amostra considerada negativa para *Trypanosoma* sp.

Utilizando o gene *catl-like* para *T. vivax*, a frequência de amplificação de DNA confirmando

amostras positivas foi de 12,8% (n= 50/389), conforme podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3. Análise da discordância entre esfregaços sanguíneos e PCR, comparando os resultados obtidos quando amostras de bovinos foram submetidas ao diagnóstico de *Trypanosoma vivax* neste estudo.

Esfregaço Sanguíneo	PCR <i>catl</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	3	17
Negativo	36	336	372
Total	50	339	389
*p-valor	0,0001		

* p <0,05 = discordância significativa entre pares (Teste de McNemar).

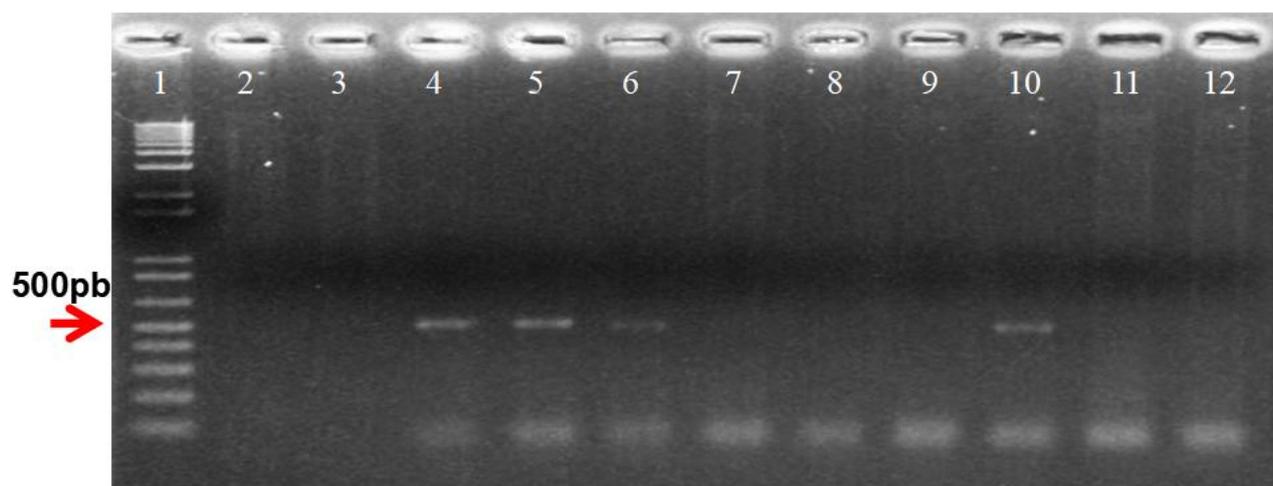


Figura 7. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 500 pb do gene *catl-like* para específico para *Trypanosoma vivax*. Poço: 1- Peso Molecular (*1Kb PlusDNA Ladder™*); 2- Controle negativo (água dentro); 3- Controle negativo (água fora); 4- Controle positivo; 5, 6, 10 - amostras consideradas positivas para *Trypanosoma vivax*; 7, 8, 9, 11, 12: amostras consideradas negativas para *Trypanosoma vivax*.

Apesar de não ter sido visualizada formas tripomastigotas de *T. theileri* em esfregaços de sangue corado, na PCR através do gene *catl*, foi observado positividade em 3,6% das amostras (n=14/389) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise da discordância entre esfregaço sanguíneo e PCR, comparando resultados obtidos quando amostras de bovinos foram submetidas ao diagnóstico de *Trypanosoma theileri* neste estudo.

Esfregaço Sanguíneo	PCR <i>catl-like T. theileri</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	0	0
Negativo	14	375	389
Total	14	375	389
*p-valor	0,0001		

* p <0,05 = discordância significativa entre pares (Método Exato de Fischer).

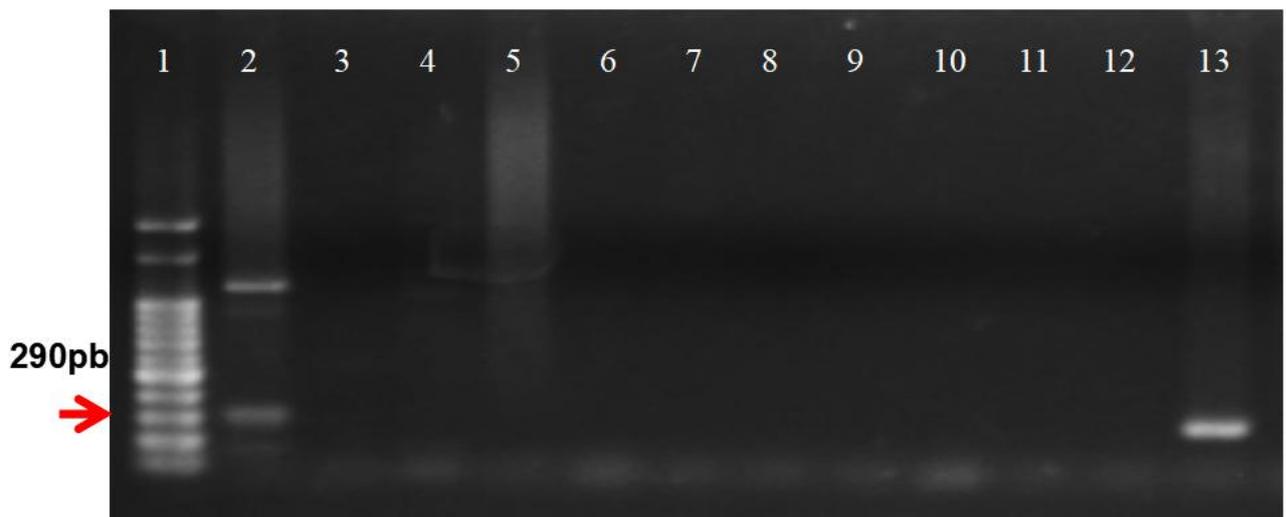


Figura 8. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de aproximadamente 290pb do gene *catl-like* para específico para *Trypanosoma theileri*. Poço: 1- Peso Molecular (100bpPlusDNA LadderTM); 2- amostra positiva para *Trypanosoma theileri*; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – amostras consideradas negativas para *Trypanosoma vivax*; 11- Controle negativo (água dentro); 12- Controle negativo (água fora); 13- Controle positivo de *Trypanosoma theileri*.

Ao observarmos a prevalência de positividade dos animais para *T. vivax* (12,8%), *T. theileri* (3,6%), bem como a presença de co-infecção com estes dois agentes (0,5%), observa-se que quanto à positividade para *T. vivax*: Trajano de Moraes (50%), Rio Claro (28,6%), Santo Antonio de Pádua (23,7%) e Areal (15,7%) foram as cidades que apresentaram maior positividade quando comparada aos outros municípios, sendo que Trajano de Moraes apresentava pouca amostra representativa o que pode ter elevado falsamente a prevalência. Os três municípios com maior frequência positiva para *T. theileri* foram Trajano de Moraes (50%), Valença (10%) e Barra do Pirai (22,2%), sendo que Trajano de Moraes apresentava pouca amostra representativa o que pode ter elevado falsamente a prevalência (Tabela 5).

Tabela 5. Prevalência de tripanossomose nas áreas de estudo e resultados da caracterização molecular de espécies de tripanossomas que infectam bovinos domésticos (n = 389).

Município	Total	Total positivos <i>T. vivax</i> com o gene <i>catl</i>(%)	Total positivos <i>T. theileri</i> com o gene <i>catl</i>(%)	Total positivos <i>T. vivax</i> and <i>T. theileri</i> com o gene <i>catl</i>(%)
Areal	146	23(15.7%)	2 (1.3%)	0
Barra do Pirai	9	0	2 (22.2%)	0
Barra Mansa	22	0	2 (9.1%)	0
Cantagalo	8	1 (12.5%)	0	0
Carapebus	4	0	0	0
Duas Barras	14	0	0	0
Itaguaí	14	0	0	0
Paraíba do Sul	17	1 (5.9%)	0	0
Pirai	16	2 (12.5%)	0	0
Rio Claro	14	4 (28.6%)	0	0
Rio das Flores	15	0	0	0
Santo Antonio de Pádua	76	18 (23.7%)	4 (5.3%)	2 (2.63%)
Seropédica	2	0	0	0
Trajano de Moraes	2	1 (50%)	1 (50%)	0
Valença	30	0	3 (10%)	0
TOTAL	389	50(12.8%)	14 (3.6%)	2 (0.51%)

Nove sequências parciais do marcador molecular *18S rDNA* de *T. vivax* foram obtidas neste estudo, sendo 06 amostras pertencentes à Areal, 02 amostras ao Pirai e 01 ao Rio Claro. As amostras foram alinhadas entre si e padronizadas em tamanho resultando em um alinhamento de 579 pb. Todas as sequências deste estudo para o gene *18S* de *T. vivax* mostraram 100% de identidade entre si. As mesmas amostras positivas para *T. vivax*, após sequenciamento de fragmento do gene *catl* foram alinhadas entre si e padronizadas, resultando em um comprimento de 456 pb de alinhamento.

Na análise filogenética, isolados de *T. vivax* para o marcador molecular *18S rDNA* é possível observar que nossos isolados estão presentes no clado A, juntamente com os isolados do Brasil, Etiópia, Quênia e Moçambique, e algumas sequências da Etiópia presentes no clado B, para tal foi utilizado o ponto de corte de 70 para definir os cladogramas (Figura 9).

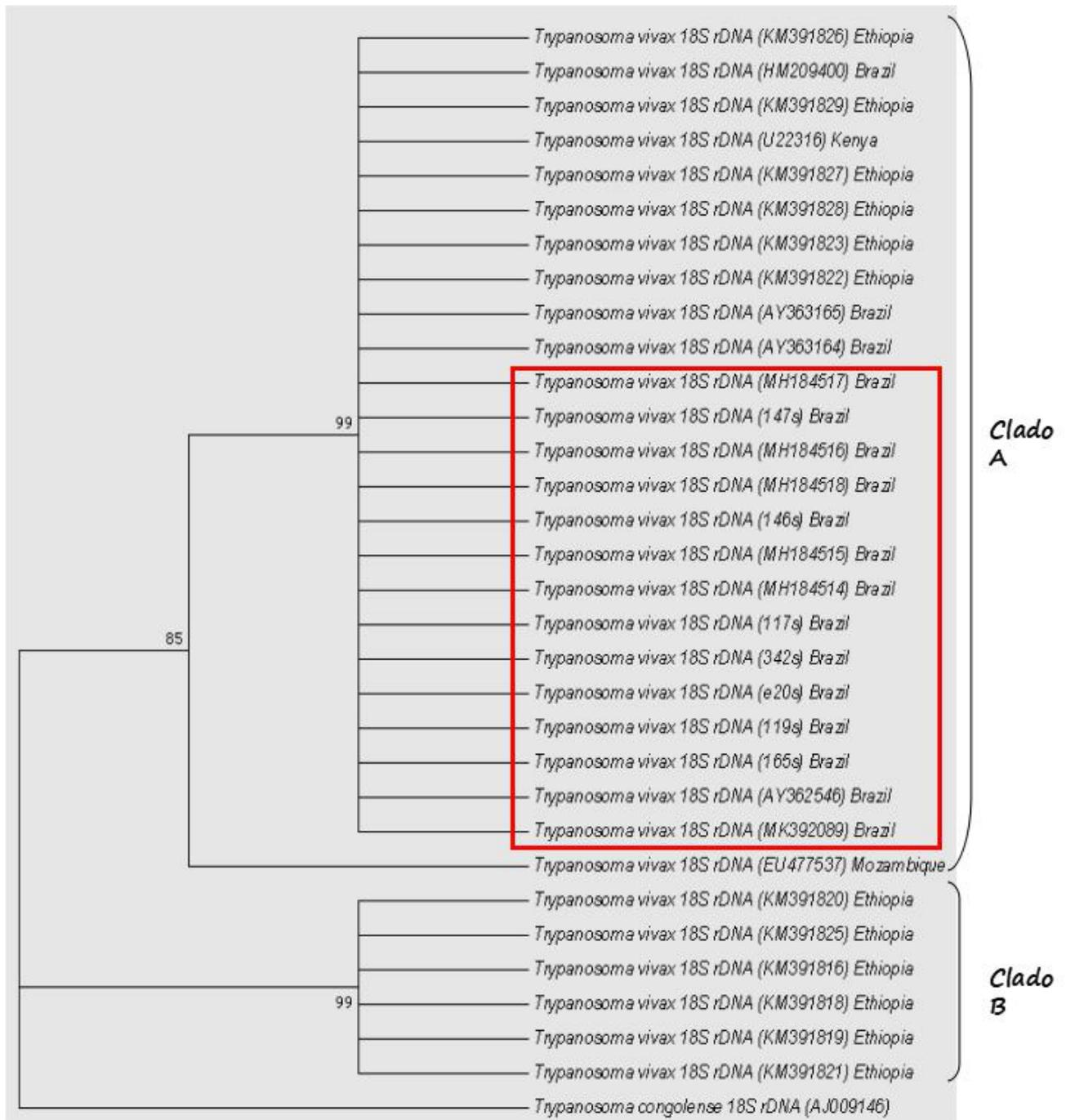


Figura 9. Dendrograma baseado nas seqüências do gene *18S rDNA* do *Trypanosoma vivax* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência (KUMAR et al., 2016).

Na filogenia de *T. vivax* para o gene *catL*, seqüências deste estudo foram agrupados no clado A, separadamente do grupo externo (*Trypanosoma congolense*). Isso foi suportado por um alto valor de bootstrap (Figura 10). Além disso, nossas seqüências agruparam com seqüências de Burkina Faso/ África, Nigéria, Brasil e Venezuela no clado A. No clado B, agruparam seqüências do Brasil, Nigéria, Venezuela e Quênia. Já no clado C, foi possível observar as seqüências de Moçambique formando um ramo único e por último o clado D, constituído por duas seqüências do Quênia.

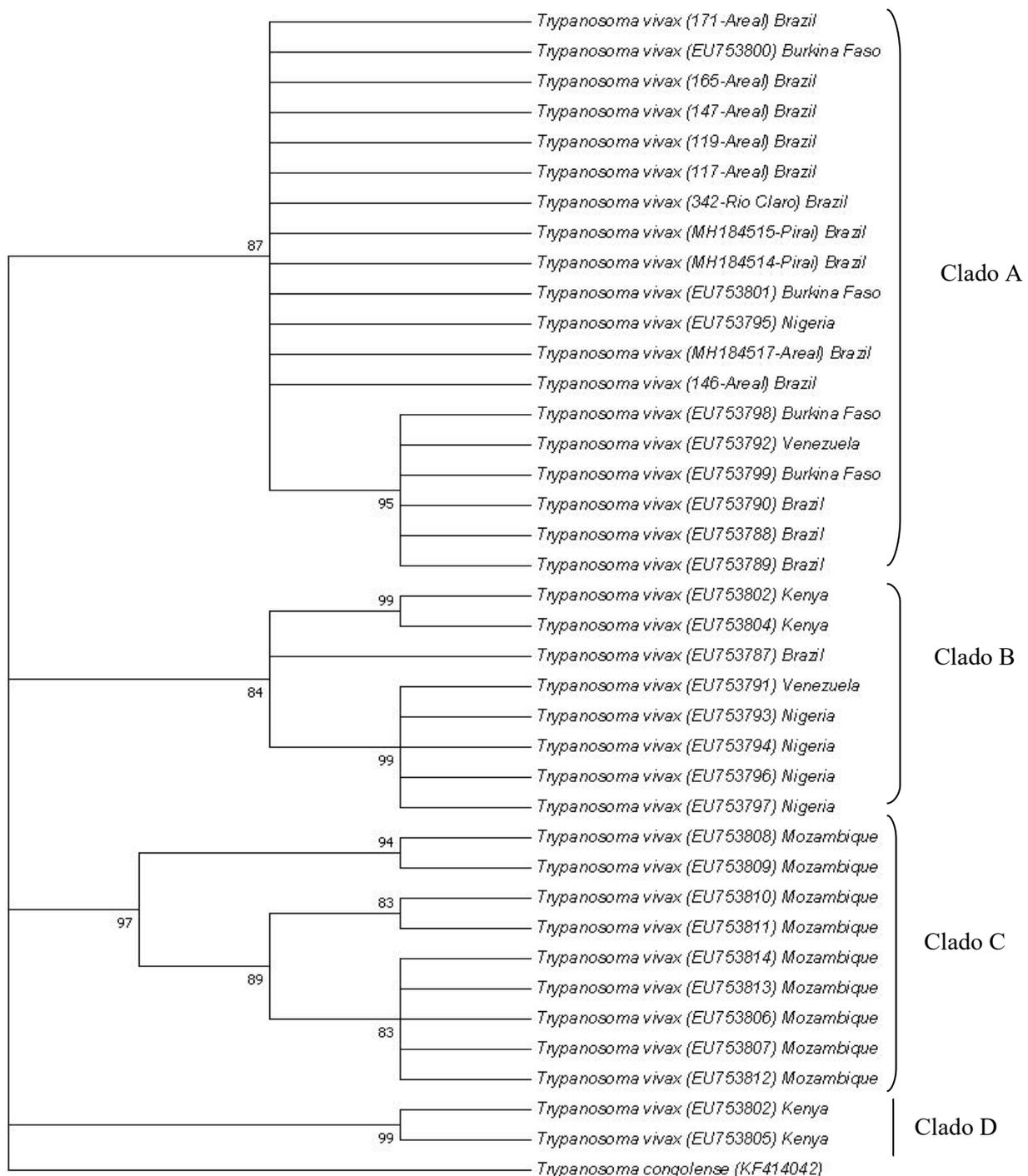


Figura 10. Dendograma baseado nas seqüências do gene *catl* do *Trypanosoma vivax* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência.

Como houve a formação de mais de dois clados, avaliamos a distância evolutiva entre grupos das localidades inseridas na árvore filogenética de *Trypanosoma vivax* para o gene *catl* (Tabela 6), onde observamos que existe uma menor distância entre as seqüências do Brasil e Burkina Faso, com 0.009, o que está diretamente relacionado a posição dos dois no mesmo clado (Clado A), e uma maior distância evolutiva entre Venezuela (Clado A) e Quênia (Clado D), com 0.092, seguida do Quênia com Moçambique (Clado C), Nigeria e Burkina Faso (Clado A), com (0.089). Nossas seqüências apresentaram maior divergência evolutiva com as seqüências do Quênia (0,088).

Tabela 6. Distância entre os grupos de *Trypanosoma vivax* com o gene *catl*.

Grupo 1	Grupo2	Distância
Brasil	Venezuela	0,037
Brasil	Nigeria	0,049
Venezuela	Nigeria	0,038
Brasil	Moçambique	0,034
Venezuela	Moçambique	0,055
Nigeria	Moçambique	0,061
Brasil	Burkina Faso	0,009
Venezuela	Burkina Faso	0,037
Nigeria	Burkina Faso	0,053
Moçambique	Burkina Faso	0,033
Brasil	Quênia	0,088
Venezuela	Quênia	0,092
Nigeria	Quênia	0,089
Moçambique	Quênia	0,089
Burkina Faso	Quênia	0,089

Posteriormente, foi estimado o grau de divergência evolutiva média sobre pares de seqüências dentro dos grupos (Tabela 7), e observamos que as seqüências de Burkina Faso (0.009) apresentam menor divergência evolutiva quando comparada aos outros países e as seqüências da Venezuela (0.076) apresentam maior divergência.

Tabela 7. Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência dentro dos grupos de *Trypanosoma vivax* com o gene *catl*.

Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência dentro de grupos de <i>Trypanosoma vivax</i> com gene <i>catl</i>.	
Brasil	0,011
Venezuela	0,076
Nigeria	0,025
Moçambique	0,016
Burkina Faso	0,009
Quênia	0,073

Foram obtidas quatro sequências parciais dos marcadores moleculares *18S rDNA* e *catl* de *T. theileri*, cada amostra de uma localidade, que segue: Barra Mansa, Barra do Piraí, Santo Antônio de Pádua e Valença. Estas sequências foram alinhadas entre si e padronizadas em comprimento de 721 pb e 263 pb, para os alvos *18S rDNA* e *catl* respectivamente. Sequências com 100% de identidade e pertencentes à mesma região foram retiradas da análise filogenética.

Na análise filogenética de *T. theileri* com base no marcador *18S rDNA*, observamos que os 4 isolados deste estudo estão agrupados juntamente com isolados de diferentes países no mundo disponíveis na base de dados GenBank (EUA, Japão, Polônia, Reino Unido, República da África Central and Itália) formando um clado único (Clado A) (Figura 11).

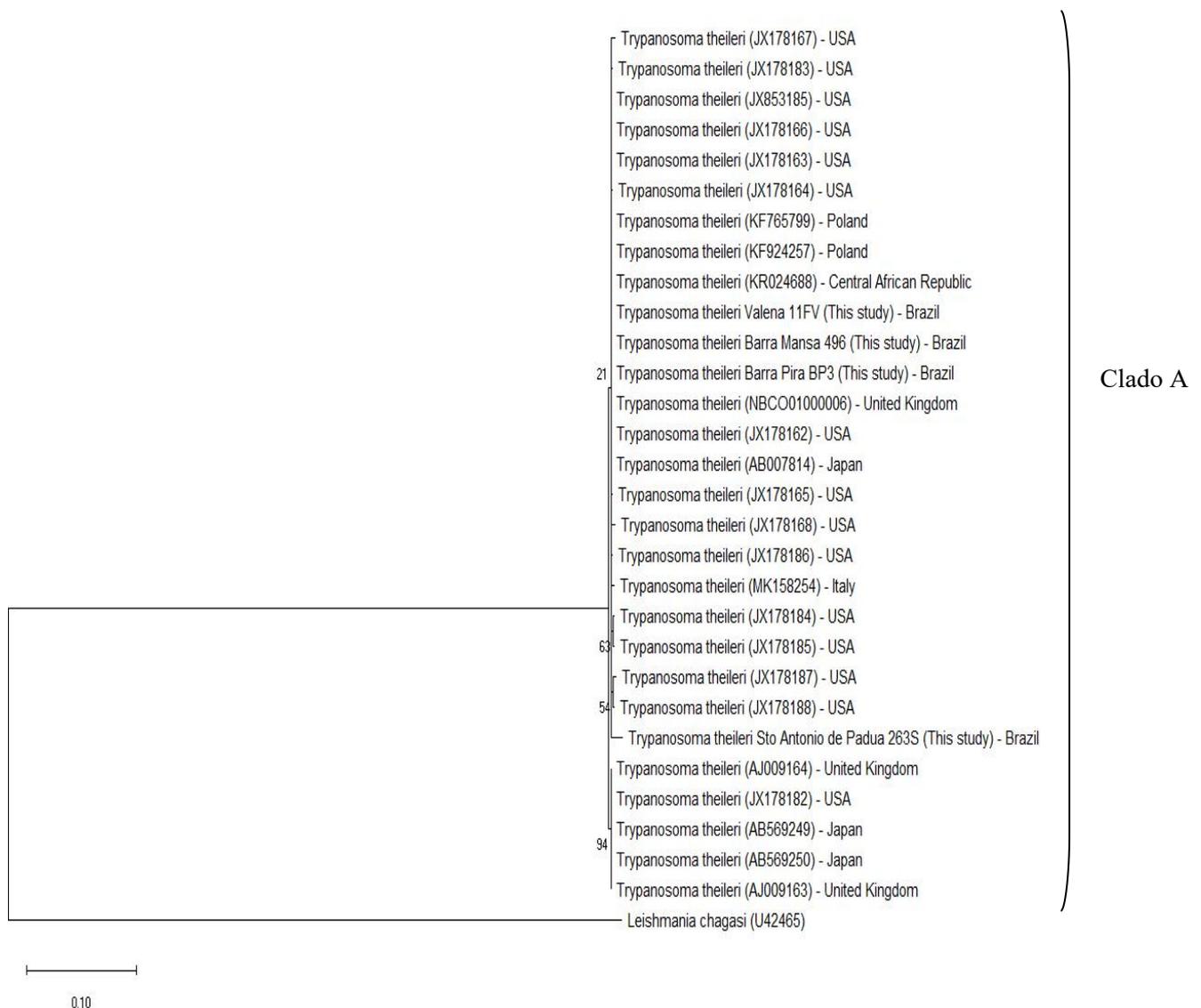


Figura 11. Dendrograma baseada baseada nas seqüências do gene *18S rDNA* de *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As sequências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência (KUMAR et al., 2016).

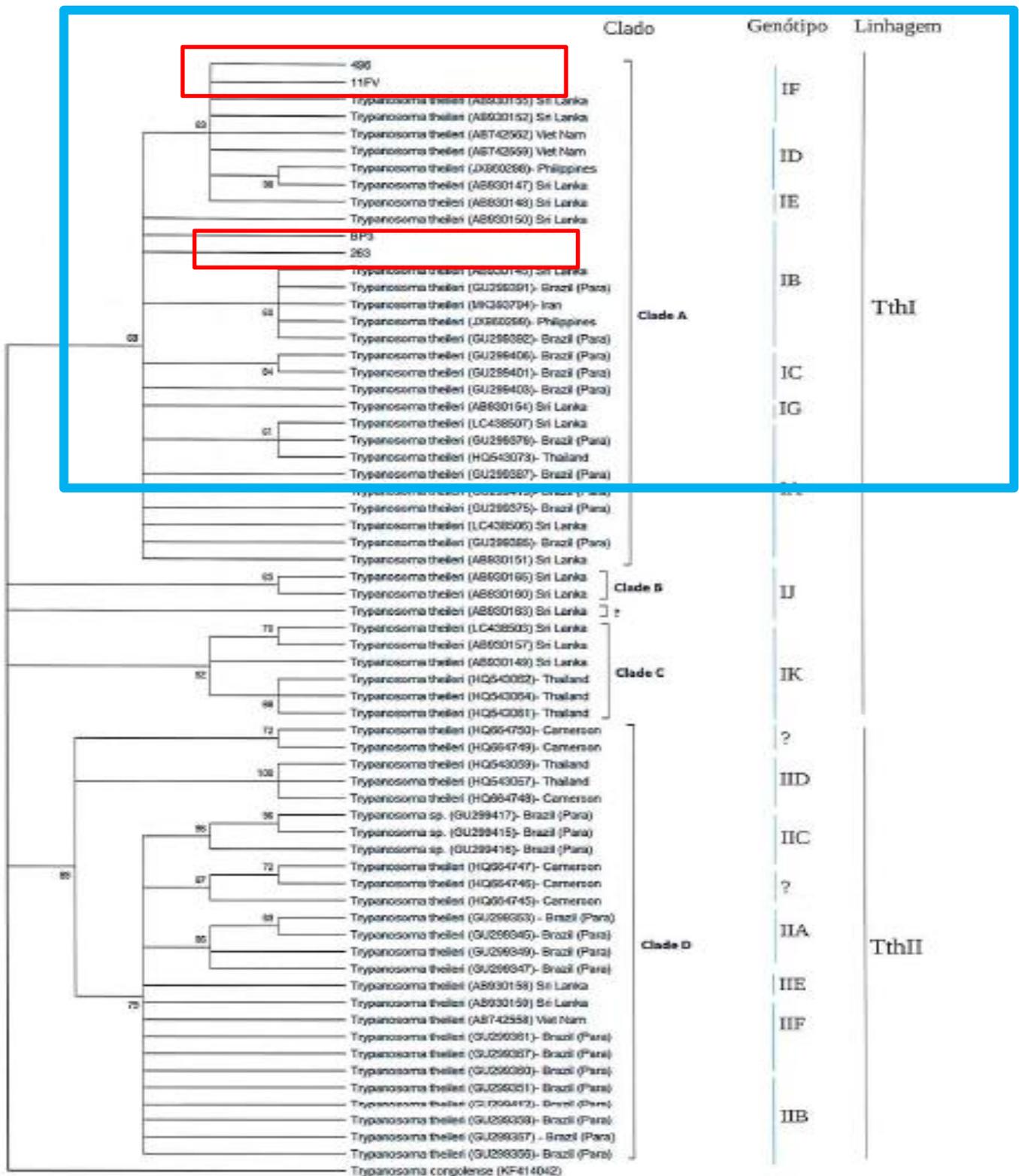


Figura 12. Dendograma baseado nas seqüências do gene *catL* do *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro / Brasil. As seqüências foram comparadas usando o método de máxima verossimilhança e o modelo de Kimura 2 parâmetros. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A barra de escala representa o número de mutações por posição de seqüência (KUMAR et al., 2016).

Ao avaliarmos a filogenia dos isolados de *T. theileri* com o gene *catl* (Figura 12), observamos que os isolados deste estudo se agruparam no clado A, juntamente com os isolados de vários países (Vietnam, Sri Lanka, Filipinas, Tailândia, Iran e Brasil), separadamente do outgroup (*Trypanosoma congolense*). Além do clado A, foram formados o clado B (com dois isolado do Sri Lanka), clado C (isolados do Sri Lanka e Tailândia), clado D (com isolados de Camarões, Tailândia, Sri Lanka, Vietnam e Brasil) e um ramo formado apenas com um isolado do Sri Lanka, o qual podemos chamar de clado E.

Estimando a divergência evolutiva média dos pares de sequências de *T. theileri* com o gene *catl* dentro de cada grupo é possível visualizar que as sequências de *Trypanosoma* sp do Pará/Brasil (Clado D), tiveram menor média de divergência, com 0.007, Vietnam obteve maior média com 0.081 e o Iran não obteve média pois só apresenta um isolado.

Tabela 8. Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência dentro de grupos de *Trypanosoma theileri* com gene *catl*.

Estimativas da divergência evolutiva média sobre pares de sequência em grupos de <i>Trypanosoma theileri</i> com o gene <i>catl</i> .	
Brasil -RJ	0,024
Sri Lanka	0,066
Brasil - PA	0,056
Brasil - PA <i>Trypanosoma</i> sp.	0,007
Iran	n/c*
Vietnam	0,081
Filipinas	0,026
Cameroon	0,042
Tailândia	0,075

*n/c - não computado pois só tinha 1 sequência

Quanto a distância genética entre as regiões baseado no gene *catl* para *T. theileri*, as sequências deste estudo apresentaram maior divergência com as sequências de Camarões (0,115), seguida de Brasil – PA *Trypanosoma* sp. (0,111) e Tailândia (0,086), enquanto houve menor divergência entre nossas sequências com as do Iran (0,016) e Filipinas (0,021) (Tabela 9).

Tabela 9. Distância genética de *Trypanosoma theileri* entre as regiões através do gene *catl*.

	Brasil-RJ	Sri Lanka	Brasil-PA	Brasil-PA <i>Trypanosoma sp</i>	Iran	Vietnam	Filipinas	Camarões	Tailândia
Brasil - RJ									
Sri Lanka	0,052								
Brasil -PA	0,071	0,076							
Brasil – PA <i>Trypanosomasp</i>	0,111	0,104	0,061						
Iram	0,016	0,043	0,060	0,101					
Vietnam	0,049	0,071	0,069	0,086	0,049				
Filipinas	0,021	0,050	0,070	0,110	0,013	0,052			
Camarões	0,115	0,106	0,067	0,045	0,105	0,092	0,113		
Tailândia	0,086	0,080	0,078	0,087	0,074	0,090	0,084	0,082	

Posteriormente foi possível observar a formação das linhagens e genótipos de *T. theileri* com o gene *catl* (Figura 12), uma vez que foram inseridas neste estudo sequências já muito bem inferidas em estudos anteriores (RODRIGUES et al., 2010; GARCIA et al., 2011; SIVAKUMAR et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2015; SUGANUMA et al., 2019), fato que nos permitiu determinar a linhagem TthI e TthII, sendo que da linhagem TthI, está presente no dendograma nove genótipos (IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IJ e IK) e seis genótipos da linhagem TthII (IIA, IIB, IIC, IID, IIE e IIF). Deste estudo, 2 sequências de DNA de amostras de sangue derivadas *catl* (BP3 e 263) foram alocadas no genótipo IB. Entretanto, as amostra de sangue de gado 11FV e 496, sequências também derivadas do gene *catl*, se agruparam com amostras de gado asiáticas (Sri Lanka), formando o genótipo IF.

5 DISCUSSÃO

Trypanosoma vivax foi identificado pela primeira vez no Brasil na década de 40 do século passado (GALIZA et al., 2011), e após um pouco mais de 70 anos pudemos detectar e caracterizar molecularmente pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro/ Brasil, além disso, *Trypanosoma theileri*, foi visto a primeira vez este hemoparasito no estado do Rio de Janeiro/ Brasil no final do século passado (GONÇALVES et al., 1998), sendo este estudo a primeira caracterização molecular deste hemoparasito na região. Apesar da Tripanossomose bovina ser considerada endêmica, ela é capaz de produzir surtos esporádicos por *T. vivax* após a introdução de animais infectados em áreas livres e por *T. theileri* em hospedeiros imunocomprometidos ou se houverem linhagens geneticamente diferentes (RODRIGUES et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005).

As coletas sanguíneas dos bovinos estudados neste trabalho ocorreram em 15 municípios com suspeita clínica de surto por Tripanossomose bovina durante três anos no estado do Rio de Janeiro. A maioria das propriedades tinha histórico de introdução de animais oriundos de leilões de gado leiteiro do estado de Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010) ou São Paulo (CORTEZ et al., 2009; CADIOLE et al., 2012; FIDELIS JR et al., 2016), estados onde já haviam sido descritas infecções por *T. vivax*, o que naturalmente fez com que a tripanossomose bovina passasse a ser uma realidade na pecuária desta região, causando diversos prejuízos econômicos.

Neste estudo, a técnica de esfregaço sanguíneo se mostrou com baixa sensibilidade quando comparada ao diagnóstico molecular pela PCR, tanto para detecção de *T. vivax* quanto para *T. theileri*, o que foi consistente com Ahamed et al. (2013), Fikru et al. (2014), Mossaad et al. (2019) e De Gier et al. (2020), ao afirmarem que biologia molecular é uma ferramenta fundamental no diagnóstico da tripanossomose animal, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade mesmo em casos de baixa parasitemia, o que ocorre com frequência em bovinos infectados por *T. theileri* ou bovinos infectados cronicamente por *T. vivax*. A baixa sensibilidade do esfregaço sanguíneo pode estar diretamente relacionada a expertise do observador, apesar das formas tripomastigotas dos tripanossomas serem de tamanho relativamente grande quando comparado com os demais hemoparasitos de bovino, este também pode ser um fator determinante para que possa ser encontrada negatividade na PCR. Além disso, encontramos uma prevalência de *T. vivax* superior a prevalência de *T. theileri* nas duas técnicas utilizadas, o que não corrobora com Jaimes-Dueñez et al. (2018) que afirmaram em seu estudo que a prevalência de *T. theileri* era maior que *T. vivax* na América do Sul, uma vez que o estado do Rio de Janeiro ainda não se apresenta como área enzoótica para *T. vivax*.

A prevalência de *T. theileri* foi inferior ao esperado (de 10 a 90%) de acordo com Lee et al. (2010) e a prevalência de *T. vivax* também foi inferior ao relatado por De Gier et al. (2020) (31%) o que pode ter ocorrido devido a massificação terapêutica indevida realizada pelos produtores rurais (GIORDANI et al., 2016) ou a cronicidade da doença na região, o que segundo Batista et al. (2009) torna a parasitemia não detectável em exames laboratoriais. Além de tudo, a baixa prevalência pode estar relacionada também a ausência de vetores biológicos como a *Glossina* sp. e a baixa endemicidade no estado do Rio de Janeiro conforme embasa Mossaad et al. (2019) e De Gier et al. (2020) ao afirmarem que os vetores influenciam diretamente na transmissão em áreas infestadas por moscas Tsé-tsé.

A análise filogenética baseada no marcador molecular *18S rDNA* de amostras de *T. vivax* e *T. theileri* do estado do Rio de Janeiro não apresentaram divergência clara e distinta entre os isolados, uma vez que todas as sequências estavam enquadradas no clado A. Isto possivelmente se deve ao gene *18S rDNA* ser altamente conservado, com regiões hipervariáveis e com pouca diversidade genética, mas o suficiente para caracterizar geneticamente os organismos (Adans et al., 2010; Fikru et al., 2016). Nosso estudo, portanto, não corrobora com Cortez et al. (2009) e Souza Pimentel et al. (2012) os quais afirmaram que a diversidade genética dos isolados sul-americanos de *T. vivax* para o *18S rDNA* menor quando comparada aos africanos, devido à ausência de um vetor / hospedeiro invertebrado que participe da multiplicação e diferenciação deste hemoparasito, este fato também pode ser explicado devido à transmissão mecânica que ocorre nas Américas e/ou a ausência de permuta genética durante o desenvolvimento cíclico nas glossinas, na África, reduzindo assim a variabilidade genética (ABBEELE; ROTUREAU, 2013).

Ao realizarmos a filogenia de isolados de *T. vivax* para o gene *catl*, a formação de quatro clados, nos faz crer que o gene *catl* apresenta uma maior diversidade genética quando comparada ao *18S rDNA*, segregando melhor as amostras de Moçambique e alguns isolados do Quênia em clados diferentes. Isso foi perfeitamente observado quando avaliamos a distância evolutiva entre os grupos, onde podemos constatar realmente que os isolados do Quênia são muito diferentes da África Ocidental e da América do Sul, fato comprovado quando comparamos com nossas sequências, já que o Quênia/ África Oriental foi o país que apresentou maior divergência evolutiva com as sequências deste estudo, o que corroborou com o que foi relatado por Cortez et al. (2009), Garcia et al. (2011), Rodrigues et al. (2015) e Jaimes-Dueñez et al. (2018), os quais visualizaram que os isolados de *T. vivax* da África Ocidental estão mais congruentes com as sequências da América do Sul. Na análise de divergência genética comparando os grupos, as sequências da Venezuela apresentaram maior variabilidade genética quando comparadas com as sequências dos demais grupos, o que não ocorreu com Burkina Faso que tem a menor variabilidade genética.

Finalmente, ao analisar o dendograma de *T. theileri* para o gene *catl* com formação de 5 clados distintos, as sequências deste estudo (Clado A) apresentaram-se muito semelhantes evolutivamente aos isolados da Filipinas, que por sua vez teve a maior distância evolutiva do isolado de Camarões (Clado D) , o que insinua que as sequências do presente estudo também são evolutivamente distantes dos isolados da África. Comparativamente, a divergência evolutiva dentro de isolados de *T. theileri* das sequências do presente estudo com as de Camarões/ África Ocidental são tão grandes quanto a divergência que existe entre os isolados de *T. theileri* das Filipinas com isolados de *Trypanosoma* sp. do Pará/Brasil, mesmo os isolados do Pará tendo apresentado menor divergência média dos pares dentro do seu grupo.

As sequências de DNA de *T. theileri* com o gene *catl* deste estudo, são da linhagem TthI, sendo que duas sequências estão enquadradas no genótipo IB e as outras duas no genótipo IF. Este portanto, é o primeiro relato da presença dos genótipos IB e IF no estado do Rio de Janeiro. Vale ressaltar que anterior a este trabalho, o genótipo IF só foi relatado por Pacheco et al. (2018) quando estudou a filogenia de *T. theileri* em bovinos da região amazônica. O genótipo IF foi detectado também em amostras de sangue de bovinos no Sri Lanka e Vietnã (SIVAKUMAR et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2015). O genótipo IB já foi visto em sequências das Filipinas, Sri Lanka, Pará/Brazil e Iran.

O conhecimento da diversidade genética do *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro/ Brazil é algo novo, já que este estudo demonstrou o primeiro relato da caracterização molecular destes dois agentes da tripanossomose bovina, sendo necessários novos estudos para melhor compreender a diversidade genética dos isolados no estado do Rio de Janeiro.

6 CONCLUSÃO

A técnica molecular demonstrou maior sensibilidade na detecção de *Trypanosoma vivax* e *T. theileri* quando comparado ao esfregaço sanguíneo.

Na filogenia com base no gene *18S rDNA*, não foi observada nenhuma diversidade genética expressiva, o que diferiu na análise do gene *catl*, onde foi possível verificar maior divergência evolutiva entre as sequências deste estudo com as sequências do Quênia/ África Oriental e Camarões/ África Ocidental, principalmente para *T. theileri*, sendo possível a descrição de dois genótipos no estado do Rio de Janeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEELE, J.V., ROTUREAU, B. New insights in the interactions between African trypanosomes and tsetse flies. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 3: 63.2013.
- ADAMS, E.R., HAMILTON, P.B., GIBSON, W.C. African trypanosomes: celebrating diversity. **Trends Parasitol.**, 26(7):324-8. jul. 2010.
- AHMED, H.A., PICOZZI, K., WELBURN, S.C., MACLEOD, E.T.A comparative evaluation of PCR- based methods for species- specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. **Parasit Vectors.**, 6(1):316. Nov. 1. 2013.
- AMATO, B., MIRA, F., DI MARCO, L.O., PRESTI, V., GUERCIO, A., RUSSOTTO, L., GUCCIARDI, F., VITALE, M., LENA, A., LORIA, G.R., PULEIO, R., CANNELLA, V. A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Itália. **Parasitol. Res.**, 118(9): 2723-2727. Jul 13. 2019.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Ong Mamiraua**. Belém, PA. 2007.
- BAKARI, S.M., OFORI, J.A., KUSI, K.A., ANING, G.K., AWANDARE, G.A., CARRINGTON, M., GWIRA, T.M. Serum biochemical parameters and cytokine profiles associated with natural African trypanosome infections in cattle. **Parasit Vectors.**, 27;10(1):312. Jun, 2017.
- BARBOSA, J.R., MADRUGA, C.R., OSÓRIO, A.L.A.R. Descrição de surto de tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax*, com morte perinatal no Pantanal de Aquidauana, MS. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA*, 4., 2001, Campo Grande. Anais... Campo Grande, p.135. 2001.
- BASTOS, T.S.A., MADRID, D.M.C., FARIA, A.M., BESSA, L.C., SOUZA, A.M., LINHARES, G.F.C. Detecção de *Trypanosoma vivax* por diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico realizadas à campo. **ARS Vet., Jaboticabal**, SP, 31(2), p.40, 2015.
- BASTOS, T.S.A., FARIA, A.M., MADRID, D.M.C., BESSA, L.C., LINHARES, G.F.C., FIDELIS, JUNIOR, O.L., SAMPAIO, P.H., CRUZ, B.C., CRUVINEL, L.B., NICARETTA, J.E., MACHADO, R.Z., COSTA, A.J.D., LOPES, W.D.Z. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 26(3): 366-371. 2017.
- BATISTA, J.S., OLIVEIRA, A.F., RODRIGUES, C.M., DAMASCENO, C.A., OLIVEIRA, I.R., ALVES, H.M., PAIVA, E.S., BRITO, P.D., MEDEIROS, J.M., RODRIGUES, A.C., TEIXEIRA, M.M. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **J. Vet. Par.**, 165: 131–135. 2009.
- BATISTA, J. S., RODRIGUES, C. M. F., OLINDA, R. G., SILVA, T. M. F., VALE, R. G., CAMARA, A. C. L., REBOUÇAS, R. E. S., BEZERRA, F. S. B., GARCIA, H. A., TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitol. Res.**, 110: 73–80. 2012.
- BATISTA, J.S., BEZERRA, F.S.B., LIRA, R.A., CARVALHO, J.R.G., NETO, A.M.R., PETRI, A.A., TEXEIRA, M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, 28: 63-69, 2008.
- BATISTA, J.S., CORREA, F.R., BARBOSA, R.C., GUERRA, J.L. Experimentalinfection by *Trypanosoma vivax* in sheep. **Pesq. Vet. Bras.**, 26: 31–37. 2006.

- BATISTA, J.S., RIET-CORREA, F., TEIXEIRA, M.M., MADRUGA, C.R., SIMÕES, S.D., MAIA, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, 143(2): 174-181, 2007.
- CABALLERO, Z.C., COSTA-MARTINS, A.G., FERREIRA, R.C.P., ALVES, J.M., SERRANO, M.G., CAMARGO, E.P., BUCK, G.A., MINOPRIO, P.G., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic and syntenic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. **Parasit Vectors**, 12;8: 222. Apr, 2015.
- CADIOLI, F.A., FIDELIS JUNIOR, O.L., SAMPAIO, P.H., DOS SANTOS, G.N., ANDRÉ, M.R., ALMEIDA, K.J.G., MACHADO, R.Z. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Vet. Parasitol.**, 214: 174–177. 2015.
- CALZOLARI, M., RUGNA, G., CLEMENTI, E., CARRA, E., PINNA, M., BERGAMINI, F., FABBI, M., DOTTORI, M., SACCHI, L., VOTÝPKA, J. Isolation of a Trypanosome Related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). **Biomed Res. Int.**, 15. Jul, 2018.
- CARVALHO, A.U., ABRÃO, D.C.; FACURY FILHO, E.J., PAES, P.R.O., RIBEIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 60 (3): 769-771. 2008.
- CHAMOND, N., COSSON, A., COATNOAN, N., MINOPRIO, P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 165(2): 170-9. Jun, 2009.
- CORTEZ A.P, RODRIGUES A.C., GARCIA, H.A., NEVES, L., BATISTA, J.S., BENGALY, Z., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. **Mol. Cell Probes**, 23(1): 44-51. Feb, 2009.
- CORTEZ, A.P., VENTURA, R.M., RODRIGUES, A.C., BATISTA, J.S., PAIVA, F., ANES, F., MACHADO, R.Z., GIBSON, W.C., TEIXEIRA, M.M. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitol.**, 133: 159-169. 2006.
- COSTA, R.V.C.; ABREU, A.P.M.; MACHADO, M.N.; THOMÉ, S.M.G.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A.; UBIALI, D.G.; BRITO, M.F. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **IX Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário. Pesquisa Veterinária Brasileira** 36(Supl.). Salvador, BA, 20 de outubro de 2016a.
- COSTA, R.V.C.; ABREU, A.P.M.; MACEDO FILHO, J.C.; THOMÉ, S.M.G.; MASSARD, C.L.; BRITO, M.F. Haematological Findings in Dairy Cattle infected with *Trypanosoma* sp. In Rio de Janeiro State **In:XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease in Caxambu**, Minas Gerais, Brazil, from November 07th to 09th, 2016b.
- CUGLOVICI, D.A., BARTHOLOMEU, D.C., REIS-CUNHA, J.L., CARVALHO, A.U., CARVALHO, A.U., RIBEIRO, M.F.B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 169 (3–4), 320–326. 2010.
- DA SILVA, A.S., GARCIA PEREZ, H.A., COSTA, M.M., FRANÇA, R.T., DE GASPERI, D., ZANETTE, R.A. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brasil. **Parasitol. Res.**, 108(1): 23-30. 2011.

- DA SILVA, A.S., GARCIA PEREZ, H.A., COSTA, M.M., FRANÇA, R.T., DE GASPERI, D., ZANETTE, R.A., AMADO, J.A., LOPES, S.T., TEIXEIRA, M.M., MONTEIRO, S.G. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brasil. **Parasitol. Res.**, 108(1): 23-30. Jan. 2011.
- DAVILA, A.M.R., HERRERA, H.M., SCHLENBINGER, T., SOUZA, S.S., TRAUB-CSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 117: 1-13, 2003.
- DÁVILA, A.M.R., RAMIREZ, L., SILVA, R.A.M.S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brasil and Bolivia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92: 357-358.1997.
- DE GIER, J., CECCHI, G., PAONE, M., DEDE, P.E., ZHAO, W. The continental Atlas of tsetse and African animal trypanosomosis in Nigeria. **Acta Tropica**, 105328. 2020. doi: 10.1016 / j.actatropica.2020.105328.
- DESQUESNES, M., GARDINER, P.R. Épidémiologie de la trypanosome bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyana Française. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, 46: 463-470, 1995.
- DESQUESNES, M., DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Vet. Parasitol.**, 5;119(1):9-19. Jan 2004.
- FEITOSA JR, A.B., GUERA, R.M.S.N.C., SANTOS, H.P., ABREU-SILVA, A.L. Registro e morfometria de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino no município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, (S1): 232.2004.
- FIDELIS JR, O.L., SAMPAIO, P.H., MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R., CADIOLI, F.A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, 25 (1): 69-81, jan.-mar., 2016.
- FIDELIS, Q.C., FARAONE, I., RUSSO, D., ARAGÃO CATUNDA-JR, F.E., VIGNOLA, L., DE CARVALHO, M.G., DE TOMMASI, N., MILELLA, L. Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.)Baill.: a source of bioactive compounds with multifunctional properties. **Nat. Prod. Res.**, 33(10):1500-1503. May, 2019.
- FIKRU, R., MATETOVICI, I., ROGÉ, S., MERGA, B., GODDEERIS, B.M., BÜSCHER, P., VAN REET, N. Ribosomal DNA analysis of tsetse and non-tsetse transmitted Ethiopian *Trypanosoma vivax* strains in view of improved molecular diagnosis. **Vet. Parasitol.**, 220:15-22. 2016.
- FIKRU. R., HAGOS, A., ROGÉ, S., REYNA-BELLO, A., GONZATTI, M.I., MERGA, B., GODDEERIS, B.M., BÜSCHER, P. A proline racemase based PCR for identification of *Trypanosoma vivax* in cattle blood. **PLoS One**, 9(1): e84819. Jan 8, 2014.
- GALIZA, G.J.N., GARCIA, A.C.O., ASSIS, D.M., OLIVEIRA, L.A., PIMENTEL, A.F.M., DANTAS, S.V.D., SIMÕES, M.M.G., TEIXEIRA, F., RIET-CORREA. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Vet. Parasitol.**, 182: 359– 363. 2011.
- GARCIA, H., GARCIA, M.E., PEREZ, G., BETHENCOURT, A., ZERPA, E., PÉREZ, H., MENDONZA-LEÓN. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 100: 297–305. 2006.
- GARCIA, H.A., RAMÍREZ, O.J., RODRIGUES, C.M., SÁNCHEZ, R.G., BETHENCOURT, A.M., DEL, M., PÉREZ, G., MINERVINO, A.H., RODRIGUES, A.C., TEIXEIRA, M.M. *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting

disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. **Vet. Parasitol.**, 230: 49-55. Oct 30, 2016.

GARCIA, H.A., RODRIGUES, S. A.C., RODRIGUES, C.M., BENGALY, Z., MINERVINO, A.H., RIET-CORREA, F., MACHADO, R.Z., PAIVA, F., BATISTA, J.S., NEVES, L., HAMILTON, P.B., TEIXEIRA, M.M. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasit Vectors**, 7: 210. May 3. 2014

GARCIA, H.A., RODRIGUES, A.C., MARTINKOVIC, F., MINERVINO, A.H., CAMPANER, M., NUNES, V.L., PAIVA, F., HAMILTON, P.B., TEIXEIRA, M.M. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **Int. J. Parasitol.**, 41(13-14): 1385-96. Nov, 2011.

GEYSEN, D., DELESPAUX, V., GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Vet. Parasitol.**, 110, 171–180. 2003.

GONÇALVES, T.C., DE OLIVEIRA, E., DIAS, L.S., ALMEIDA, M.D., NOGUEIRA, W.O., PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93(6):711-7. Nov-Dec, 1998.

GONZALES, J.L., CHACON, E., MIRANDA, M., LOZA, A., SILES, L.M. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Vet. Parasitol**, 146(1-2): 9-16. May 15, 2007.

GUEDES JUNIOR, D.S., ARAÚJO, F.R., SILVA, F.J.M., RANGEL, C.P., BARBOSA NETO, J.D., FONSECA, A.H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 17 (2): 105-109. 2008.

GUERRA, R.M.S., FEITOSA-JUNIOR, A.B., SANTOS, H.P., SILVA, A.L.A., SANTOS C.G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brasil. **Cienc. Rural**, 38: 833-835, 2008.

GUNASEKARA, E., SIVAKUMAR, T., KOTHALAWALA, H., ABEYSEKERA, T.S., WEERASINGHA, A.S., VIMALAKUMAR, S.C., KANAGARATNAM, R., YAPA, P.R., ZHYLDYZ, A., IGARASHI, I., SILVA, S.S.P., YOKOYAMA, N. Epidemiological survey of hemoprotozoan parasites in cattle from low-country wet zone in Sri Lanka. **Parasitol. Int.**, 71:5-10. Aug. 2019.

HOARE, C.A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 749p. 1972.

JACKSON, A.P., SOYARD, S., XIA, D., FOTH, B.J., SANDERS, M., WASTLING, J.M., MINOPRIO, P., BERRIMAN, M. Global Gene Expression Profiling through the Completed Life Cycle of *Trypanosoma vivax*. **PLOS Neglected Trop. Dis.**, August 12, 2015.

JAIMES-DUEÑEZ, J., TRIANA-CHÁVEZ, O., MEJÍA-JARAMILLO, A.M. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colômbia. **Ticks Tick Borne Dis.**, 8(2):290-299. Feb. 2017.

JAIMES-DUEÑEZ, J., TRIANA-CHÁVEZ, O., MEJÍA-JARAMILLO, A.M. Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes

- (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colômbia. **Vet. Parasitol.**, 249:30-42. Jan 15. 2018.
- JONES, D.T., TAYLOR, W.R., THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, 8:275-282. 1992.
- JONES, T.W., DÁVILA, A.M. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitol.**, 17: 99-101, 2001.
- JUKES, T.H., CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, **Mammalian Protein Metabolism**, pp. 21-132, Academic Press, New York. 1969.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. of Mol. Evolution**, 16:111-120. 1980.
- KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. and Evolution**, 33:1870-1874. 2016.
- LATIF, A.A., BAKHEIT, M.A., MOHAMED, A.E., ZWEYGARTH, E. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, 71(4):251-6. Dec. 2004.
- LEE, Y.F., CHENG, C.C., CHEN, J.S., LIN, N.N., HUNG, Y.W., WANG, J.M., TU, W.C., TUNG, K.C., CHIU, Y.T. Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in non-phagocytic mammalian cells. **Vet. Parasitol.**, 191(3-4):228-39. Jan 31, 2013.
- LEE, Y.F., CHENG, C.C., LIN, N.N., LIU, S.A., TUNG, K.C., CHIU, Y.T. Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, 72(4):417-24. Apr. 2010.
- LINHARES, G.F.C., DIAS-FILHO, F.C., FERNANDES, P.R., DUARTE, S.C. Bovine trypanosomiasis in the municipality of Formoso do Araguaia County, Tocantins, Brasil (case report). **Cienc. Anim.**, 7:455-460. 2006.
- MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O., MELO, E.S.P., ALMEIDA, D.A., ALMEIDA JUNIOR, N.F., XAVIER, M.A.S., OSÓRIO, A.L.A., GÓES-CAVALCANTE, G., RAMOS, C.A.N. **Diagnóstico molecular e análise filogenética de seqüências brasileiros de *Trypanosoma vivax* baseado na reação da polimerase em cadeia – PCR.** Embrapa Gado de Corte, 5 pp. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 84). 2003.
- MAGONA, J.W., WALUBENGO, J., ODIMIN, J.T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica**, 107: 186-191. 2008.
- MAIA DA SILVA, F., NOYES, H. A., CAMPANER, M., JUNQUEIRA, A. C. V., COURA, J. R., ANEZ, N., SHAW, J. J., STEVENS, J. R. AND TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitol.**, 129: 549-561. 2004.
- MARTINS, C.F., MADRUGA, C.R, KOLLER, W.W., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O., KESSLER, R.H., MELO, E.S.P., RIOS, L.R., ALMEIDA, R.C.F., LIMA JR, M.S.C., BARROS, A.T.M., MARQUES, L.C. *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, 28: 51-56. 2008.
- MARTINS, J.R., LEITE, R.C., DOYLE, R.L. Tripanosomatides like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 17(2): 113-4. Apr-Jul. 2008.

- MASAKE, R.A., MAJIWA, P.A., MOLOO, S.K., MAKAU, J.M., NJUGUNA, J.T., MAINA, M., KABATA, J., OLE-MOIYOI, O.K., NANTULYA, V.M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol.**, 85: 193–205. 1997.
- MATSUMOTO, Y., SATO, A., HOZUMI, M., OHNISHI, H., KABEYA, M., SUGAWARA, M., TAKAISHI, H. A case of a Japanese Black cow developing trypanosomiasis together with enzootic bovine leukosis. **J. of the Japão Vet. Med. Association**, 64 (12): 941-945. 2011.
- MOTT, G.A., WILSON, R., FERNANDO, A., ROBINSON, A., MACGREGOR, P., KENNEDY, D., SCHAAP, D., MATTHEWS, J.B., MATTHEWS, K.R. Targeting cattle-borne zoonoses and cattle pathogens using a novel trypanosomatid-based delivery system. **PLoS Pathog.**, 7(10):.e1002340. Oct. 2011.
- NAKAYIMA, J., NAKAO, R., ALHASSAN, A., HAYASHIDA, K., NAMANGALA, B., MAHAMA, C., AFAKYE, K., SUGIMOTO, C. Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. **Parasite**, 20:24. 2013.
- NEI, M., KUMAR, S. **Mol. Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York. 2000.
- NGOMTCHO, S.C.H., WEBER, J.S., NGO BUM, E., GBEM, T.T., KELM, S., ACHUKWI, M.D. Molecular screening of tsetse flies and cattle reveal different *Trypanosoma* species including *T. grayi* and *T. theileri* in northern Cameroon. **Parasit Vectors**, 10(1):.631. Dec. 29, 2017.
- OLIVEIRA, J.B., HERNÁNDEZ-GAMBOA, J., JIMÉNEZ-ALFARO, C., ZELEDÓN, R., BLANDÓN, M., URBINA, A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. **Vet. Parasitol.**, 163:136–139. 2009.
- ORTIZ, P.A., MAIA, D.A., SILVA, F., CORTEZ, A.P., LIMA, L., CAMPANER, M., PRAL, E.M., ALFIERI, S.C., TEIXEIRA, M.M. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. **Acta Trop.**, 112(3):.249-59. Dec. 2009.
- OSÓRIO, A.L.A.R., MADRUGA, C.R., DESQUENES, M., SOARES, C.O., RIBEIRO, L.R.R., DA COSTA, C.G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 103: 1-13. 2008.
- OTTE, M.J., ABUABARA, J.Y. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. **Acta Trop.**, 49:73-76, 1991.
- OTTE, M.J., ABUABARA, J.Y., WELLS, E.A. *Trypanosoma vivax* in Colômbia: epidemiology and production losses. **Trop. Anim. Health Prod.**, 26:146- 156. 1994.
- PACHECO, T.D.A., MARCILI, A., COSTA, A.P.D., WITTER, R., MELO, A.L.T., BOAS, R.V., CHITARRA, C.S., DUTRA, V., NAKAZATO, L., PACHECO, R.C. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brasil's western Amazon region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 27(4):.579-583. Oct-Dec, 2018.
- PAIVA, F., LEMOS, R.A.A., NAKASATO, L., MORI, A.E., BRUM, K.B., BERNARDO, K.C. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. I. Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 9:135–141. 2000.
- PAIVA, F., LEMOS, R.A.A., OSHIRO, E.T., SALVADOR, S.C., NAKASATO, L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 6 (1): 349, 1997.

- PAOLETTA, M.S., LÓPEZ ARIAS, L., DE LA FOURNIÈRE, S., GUILLEMI, E.C., LUCIANI, C., SARMIENTO, N.F., MOSQUEDA, J., FARBER, M.D., WILKOWSKY, S.E. Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. **Ticks Tick Borne Dis.**, 9(2): 155-163. Feb., 2018.
- PIMENTEL, S.P., RAMOS, C.A., RAMOS, N., ARAÚJO, F.R.B., ORBA, M.L., FAUSTINO, M.A. G., ALVES, L.C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 185 (2-4): 286-289. 2012.
- PIMENTEL, S., RAMOS, C.A., RAMOS, R.A., DE ARAÚJO, F.R., BORBA, M.L., FAUSTINO, M.A., ALVES, L.C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 185(2-4): 286-9. Apr. 2012.
- QUISPE, P.A., CHÁVEZ, A.V., CASA, E.A., TRIGUEROS, A.V., SUÁREZ, F.A. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali. **Rev. Inv. Vet. Perú**, 14(2): 161-165. 2003.
- RADWANSKA, M., VEREECKE, N., DELEEUW, V., PINTO, J., MAGEZ, S. Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. **Front. Immunol.**, 9: 2253. Oct. 2, 2018.
- RAMÍREZ-IGLESIAS, J.R., ELEIZALDE, M.C., REYNA-BELLO, A., MENDOZA, M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. **J. Parasit. Dis.**, 41(2): 450-458. Jun 2017.
- RODRIGUES, A.C., CAMPANERA, M., TAKATA, C.S.A., DELL' PORTO, A., MILDER, R.V., TAKEDA, G.F., TEIXEIRA, M.M.G. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequence. **Vet. Parasitology**, 116: 185-207. 2003.
- RODRIGUES, A.C., PAIVA, F., CAMPANER, M., STEVENS, J.R., NOYES, H.A., TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitol.**, 132: 215-224, 2006.
- RODRIGUES, C.M.F., BATISTA, J.S., LIMA, J.M., FREITAS, F.J.C., BARROS, I.O., GARCIA, H. A., RODRIGUES, A.C., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. **Parasites & Vectors**, 8: 564. 2015.
- RODRIGUES, C.M.F., GARCIA, H.A., RODRIGUES, A.C., COSTA-MARTINS, A.G., PEREIRA, C.L., PEREIRA, D.L., BENGALY, Z., NEVES, L., CAMARGO, E.P., HAMILTON, P.B., TEIXEIRA, M.M.G. New insights from Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Moçambique increasing the genetic diversity of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma vivax-like* in tsetse flies, wild ungulates and livestock from East Africa. **Parasites & Vectors**, 10:337, 2017.
- RODRIGUES, A.C., GARCIA, H.A., ORTIZ, P.A., CORTEZ, A.P., MARTINKOVIC, F., PAIVA, F., BATISTA, J.S., MINERVINO, A.H., CAMPANER, M., PRAL, E.M., ALFIERI, S.C., TEIXEIRA, M.M. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitol Int.**, 59(3): 318-25. Sep. 2010.
- RODRIGUES, A.C., NEVES, L., GARCIA, H.A., VIOLA, L.B., MARCILI, A., DA SILVA, F.M., SIGAUQUE, I., BATISTA, J.S., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analysis

of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax-like* genotype infecting a nyala antelope from Moçambique. **Parasitology**, 135(11): 1317-28. Sep 2008.

RODRIGUES, C.M.F., GARCIA, H.A., SHEFERAW, D., RODRIGUES, A.C., PEREIRA, C.L., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. Genetic diversity of trypanosomes pathogenic to livestock in tsetse flies from the Nech Sar National Park in Ethiopia: A concern for tsetse suppressed area in Southern Rift Valley? **Infect Genet Evol.**, 69: 38-47. Apr, 2019.

SAJID, M., MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 120(1):1-21. Mar. 2002. Review.

SAMPAIO, P.H., FIDELIS JUNIOR, O.L., MARQUES, L.C., MACHADO, R.Z., BARNABÉ, P.A., ANDRÉ, M.R., BALBUENA, T.S., CADIOLI, F.A. Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet. Parasitol.**, 211(3-4): 141-145. 2015.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**, 74 (12) 5463-5467. Dec. 1, 1977.

SHAW, J.J., LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 66: 25-32, 1972.

SILVA, A. S., COSTA, M. M., POLENZ, M. F., POLENZ, C. H., TEIXEIRA, M. M. G., LOPES, S. T. A., MONTEIRO, S. G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, 39: 2550-2554. 2009.

SILVA, R. A. M. S., MORALES, G., EULERT, E., MONTENEGRO, A., YBANEZ, R. Outbreaks of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in cattle in Bolivia. **Vet. Parasitol.**, 76: 153-157. 1998.

SILVA, R.A.M.S., SILVA, J.A., SHNEIDER, R.C., FREITAS, J., MESQUITA, T., RAMIREZ, L., DÁVILA, A.M.R., PEREIRA, M.E.B. Bovine Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. **Trynews**, 4: 1-2. 1995.

SILVEIRA, J.A., RABELO, E.M., LACERDA, A.C., BORGES, P.A., TOMÁS, W.M., PELLEGRIN, A.O., TOMICH, R.G., RIBEIRO, M.F. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brasil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 4(4): 341-5. Jun. 2013.

SIVAKUMAR, T., LAN, D.T., LONG, P.T., YOSHINARI, T., TATTIYAPONG, M., GUSWANTO, A., OKUBO, K., IGARASHI, I., INOUE, N., XUAN, X., YOKOYAMA, N. PCR detection and genetic diversity of bovine hemoprotozoan parasites in Vietnam. **J. Vet. Med. Sci.**, 75(11):1455-62. Nov. 2013.

SUGANUMA, K., KONDOH, D., SIVAKUMAR, T., MIZUSHIMA, D., ELATA, A.T.M., THEKISOE, O.M.M., YOKOYAMA, N., INOUE, N. Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. **Parasitol. Res.**, 118(6): 1927-1935. Jun. 2019.

SUMBA, A.L., MIHOK, S., OYIEKE, F.A. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Med. Vet. Entomol.**, 12(4):417-22. Oct. 1998.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol. Biol. and Evolution**, 30: 2725-2729. 2013.

TOWNSEND, J., DUFFUS, W.P. *Trypanosoma theileri*: antibody-dependent killing by purified populations of bovine leucocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, 48(2):289-99. May. 1982.

TRUC, P., BUSCHER, P., CUNY, G., GONZATTI, M. I., JANNIN, J., JOSHI, P., JUYAL, P., LUN, Z. R., MATTIOLI, R., PAYS, E., SIMARRO, P. P., TEIXEIRA, M. M. G., TOURATIER, L.,

- VINCENDEAU, P., DESQUESNES, M. Atypical Human Infections by Animal Trypanosomes. **PLOS Neglected Trop. Dis.**, 7 (9): 1-7. Sep 2013.
- VAN DEN BOSSCHE, P., SHUMBA, W., MAKHAMBERA, P. The distribution and epidemiology of bovine trypanosomiasis in Malawi. **Vet. Parasitol.**, 88: 163-176..2000.
- VERLOO, D., BRANDT, J., VAN MEIRVENNE, N., BÜSCHER, P. Comparative in vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. **Vet. Parasitol.**, 28;89(1-2): 129-32. 2000.
- VIEIRA, O.L.E., MACEDO, L.O., SANTOS, M.A.B., SILVA, J.A.B.A., MENDONÇA, C.L., FAUSTINO, M.A.D.G., RAMOS, C.A.D.N., ALVES, L.C., RAMOS, R.A.N., CARVALHO, G.A. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 26(4): 516-520. Oct-Dec, 2017.
- WELLS, E.A. Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. **Transactions Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 71: 448-449, 1977.
- WHELAN, S., GOLDMAN, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. **Mol. Biol. and Evolution**, 18:691-699. 2001.
- YOKOYAMA, N., SIVAKUMAR, T., FUKUSHI, S., TATTIYAPONG, M., TUVSHINTULGA, B., KOTHALAWALA, H., SILVA, S.S., IGARASHI, I., INOUE, N. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. **Vet. Parasitol.**, 207(3-4): 335-41. Jan 30. 2015.
- ZAPATA, A. La afección de los ganados llamada vulgarmente "huequera", "secadera", "cachohueco". **Rev. Med. Vet.**, Buenos Aires, 3:165-180.1931.
- ZARLENGA, D. S., HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.**, 101: 215-230. 2001.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Avaliação de parâmetros bioquímicos de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro**. 2020. 40p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O objetivo deste estudo foi traçar um perfil bioquímico de bovinos infectados por *Trypanosoma vivax* em bovinos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas, por meio de venopunção da veia coccígea de 242 bovinos, sendo o sangue total coletado acondicionado em tubos contendo ácido etileno-amino-tetracético à 10% para análise molecular e tubos sem anticoagulante para bioquímica, sendo posteriormente enviadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro onde foram realizadas as análises. As amostras de DNA foram extraídas seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (Promega®), e posteriormente, armazenadas em freezer -20 °C até o momento das análises moleculares. O soro para análise bioquímica foi obtido pela centrifugação em centrífuga clínica à 3.000 rpm por 5 minutos e posteriormente foi enviado ao Laboratório de Análises Clínicas do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV/ UFRRJ), onde os níveis séricos de Gama Glutamiltransferase (GGT), Proteína Sérica Total (PTS), Albumina (ALB), Bilirrubina Total (BT) e Direta (BD), Creatinina (CR), Uréia (UR), Fosfatase Alcalina (FAL), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP) foram determinados usando o analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®) e kits de reagentes comerciais. Foi utilizado o método exato de Fisher com p-valor <0,20 (Bioestat®) para verificar se existe diferença significativa nos resultados bioquímicos de animais infectados e não infectados para *T. vivax*, posteriormente foi construído modelos de Regressão Linear (R Studio®). A análise molecular foi realizada através do gene *cat1* para identificação *Trypanosoma vivax* e *T. theileri*. Além disso, foram feitos diagnósticos diferenciais para *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*, baseado nos genes *18S rDNA* para os dois primeiros agentes e *mps5* para o último. A frequência obtida foi 0.6% (50/242) animais positivos para *Trypanosoma vivax*, 8.3% (20/242) para *Babesia bigemina*, 12.8% (31/242) para *Babesia bovis* e 53.7% (130/242) para *Anaplasma marginale*, sendo que a co-infecção mais frequente foi de *T. vivax* e *A. marginale*, 8.3% (20/242). Este foi o primeiro relato de análise bioquímica dos animais infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro, onde foi possível verificar que a enzima LDH apresentou alteração significativa e animais com aumento desta enzima apresentam aproximadamente sete vezes mais chance de ser positivo para *T. vivax*.

Palavras-chave: Tripanossomose; bioquímica; bovino.

ABSTRACT

ABREU, Ana Paula Martinez de. **Evaluation of biochemical parameters of cattle naturally infected with *Trypanosoma vivax* in the state of Rio de Janeiro.** 2019. 40p. Tesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The aim of this study was to trace a biochemical profile of cattle infected with *Trypanosoma vivax* in cattle naturally infected in the state of Rio de Janeiro. The samples were collected by means of venocuncture of the coccygeal vein of 242 cattle, and the whole blood collected was conditioned in tubes containing 10% ethylene-amino-tetracetic acid for molecular analysis and tubes without anticoagulant for biochemistry, being subsequently sent to the Laboratory of Hemoparasites and vectors from the Federal Rural University of Rio de Janeiro where the analyzes were performed. The DNA samples were extracted following the protocol recommended by the manufacturer (Promega®) and subsequently stored in a -20 ° C freezer until the moment of molecular analysis. The serum for biochemical analysis was obtained by centrifugation in a clinical centrifuge at 3,000 rpm for 5 minutes and was later sent to the Clinical Analysis Laboratory of the Experimental Chemotherapy Laboratory in Veterinary Parasitology (LQEPV / UFRRJ), where the serum levels of Glutamyltransferase (GGTT), Total Serum Protein (PTS), Albumin (ALB), Total Bilirubin (BT) and Direct (BD), Creatinine (CR), Urea (UR), Alkaline Phosphatase (FAL), Lactate Dehydrogenase (LDH), Aspartate Aminotransferase (AST / TGO) and Alanine Aminotransferase (ALT / TGP) were determined using the automated biochemical analyzer A15 (Biosystems®) and commercial reagent kits according to the equipment used. Fisher's exact method with p-value <0.20 (Bioestat®) was used to verify if there is a significant difference in the biochemical results of infected and uninfected animals for *T. vivax*, Linear Regression models were subsequently built (R Studio®). Molecular analysis was performed using the *cat1* gene to identify *Trypanosoma vivax*. In addition, differential diagnoses were made for *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma marginale*, based on the *18S rDNA* genes for the first two agents and *mps5* for the last. The frequency obtained was 0.6% (50/242) positive animals for *Trypanosoma vivax*, 8.3% (20/242) for *Babesia bigemina*, 12.8% (31/242) for *Babesia bovis* and 53.7% (130/242) for *Anaplasma marginale*, the most frequent co-infection being *T. vivax* and *A. marginale*, 8.3% (20/242). This was the first report of biochemical analysis of animals naturally infected with *Trypanosoma vivax* in the state of Rio de Janeiro, where it was possible to verify that the LDH enzyme showed significant change and animals with an increase in this enzyme are approximately seven times more likely to be positive for *T. vivax*.

Keywords: Trypanosomiasis, biochemistry; cattle.

1 INTRODUÇÃO

A Tripanosomose Africana Animal causa perdas econômicas na pecuária mundial, acometendo diversos ruminantes, sendo mais comum encontrarmos retardo de crescimento, perda de peso corporal, baixa produção de proteínas animais (carne e leite) e diminuição da fertilidade. Ela tem como agente etiológico principal, no Brasil, o *T. vivax*, com vetor biológico na África a mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.) e nas Américas, a transmissão é mecânica com a participação de espécies de Tabanidae e Stomoxyidae, podendo ser transmitido por outros invertebrados, morcegos e fômites contaminados com sangue infectado (agulhas) (BATISTA et al., 2011; DAGNACHEW e BEZIE, 2015; HURTADO et al., 2016).

Dentre as alterações patológicas mais comuns, foram relatadas a hiperplasia do baço, linfadenite eosinofílica, miocardite, hepatoesplenomegalia e glomerulonefrite, sendo que todas elas teriam origem da deposição de imunocomplexos e/ou em danos causados pelo próprio agente que estaria presente no espaço extravascular se movimentando (PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2006).

As infecções por tripanosoma em animais geralmente progridem para estados crônicos da doença, quando neste momento é possível observar algumas alterações nos parâmetros hemotológicos, com uma anemia de moderada a grave em bovinos (BATISTA et al., 2007, 2008; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012), porém o perfil bioquímico pode se manter inalterado ou ligeiramente alterado, da mesma forma que há a redução brusca da parasitemia. A cronicidade pode, portanto, explicar as diferenças não significativas nos parâmetros bioquímicos observados em bovinos em diversos estudos (BAKARI et al., 2017).

Os sinais clínicos da tripanossomose são muito semelhantes com outras enfermidades, como anaplasmose e babesiose, o que nos leva a crer que a tripanossomose bovina está sendo subdiagnosticada no Brasil, este panorama piora ao avaliarmos que os medicamentos utilizados terapêuticamente na anaplasmose e babesiose apresentam alguma eficácia sobre os tripanossomas, o que pode levar a uma recuperação momentânea do animal e erros de diagnóstico (PEREIRA et al., 2018). Por isso, faz-se necessário o uso de diagnóstico complementar para auxiliar o médico veterinário à campo e entender como o *T. vivax* age no organismo do bovino infectado, bem como as possíveis alterações bioquímicas relacionadas às injúrias celulares garante mais uma ferramenta de diagnóstico.

Diante disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil bioquímico de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agentes Etiológicos

A maioria das espécies do gênero *Trypanosoma* é formada por parasitos digenéticos, com participação de diversos ruminantes como hospedeiros (bovinos, búfalos, caprinos, ovinos, antílopes, cervos, bizão) e dípteros hematófagos e carrapatos como vetores. A transmissão biológica de *Trypanosoma vivax* na África tem como vetor principal a mosca tsé-tsé (*Glossina* sp.), porém nas Américas, a transmissão é mecânica com a participação de espécies de dípteros das famílias Tabanidae (*Tabanus*) e Muscidae (*Stomoxys*), podendo ser transmitido por outros invertebrados, morcegos e fômites contaminados com sangue infectado (agulhas) (BATISTA et al., 2011; DAGNACHEW; BEZIE, 2015; HURTADO et al., 2016).

A tripanossomose bovina ocasionada por *T. vivax* é uma doença emergente na América do Sul, que além de atingir ruminantes, também vem infectando equinos, causando um enorme prejuízo a pecuária mundial (GIORDANI et al., 2016).

2.2. Sinais clínicos

Na tripanossomose bovina causada por *T. vivax*, durante o período inicial ou período pré-patente, nenhuma manifestação clínica da doença é observada, sendo que a hipertermia é considerada um dos primeiros sinais clínicos seguido de anemia, ocasionada por lise dos eritrócitos (HURTADO et al., 2016).

Trypanosoma vivax desencadeia sinais inespecíficos em bovinos como febre, apatia, anorexia, letargia, perda progressiva de peso, produção reduzida de leite, linfadenopatia, abortamento e diarreia, além de anemia (mucosas hipocoradas), edema submandibular, tosse, corrimento nasal, queratite, lacrimação, leucopenia e eventual leucocitose (FIDELIS JR et al., 2016; HURTADO et al., 2016). Porém, quando os animais nunca foram expostos ao agente da Tripanossomose Africana Animal (TAA) pode ocorrer cegueira transitória, sinais neurológicos (dismetria, ataxia, fraqueza muscular do quarto traseiro, decúbito esternal), febre intermitente, distúrbios reprodutivos (abortamento e esterilidade), síndromes hemorrágicas e óbito espontâneo após uma ou duas semanas da infecção. O quadro clínico pode se espalhar rapidamente no rebanho, ocorrendo um surto da doença, principalmente em áreas sem registro da infecção. Bezerros apresentam uma maior taxa de mortalidade e morbidade quando comparada às vacas adultas, o que se deve em grande parte à anemia (BATISTA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012; HURTADO et al., 2016; SCHENK et al., 2001).

Silva e colaboradores (2009) relataram que no Brasil (Pantanal), todos os bovinos que apresentavam quadro neurológico evoluíram para o óbito, e que vacas gestantes abortaram ou pariram bezerros mortos ou que morreram logo após o parto.

Segundo Boada Sucre e colaboradores (2016), *T. vivax* causa efeitos prejudiciais à pecuária através do retardo de crescimento, baixa produção de proteínas animais (carne e leite) e diminuição da fertilidade, podendo ainda causar febres periódicas e anemia devido a parasitemia, alterações na química do sangue e, muitas vezes, morte. Estes autores acreditam que a anemia é o sintoma mais característico desta infecção podendo ser ocasionada por hemólise intravascular na fase aguda da doença e extravascular na fase crônica.

Na relação parasito-hospedeiro da infecção por *T. vivax*, a patogenia e os sinais clínicos podem variar de acordo com o equilíbrio criado com o hospedeiro podendo permanecer clinicamente normal por um longo período. Isso pode ser observado em raças de bovinos (N'Dama, Muturu e Dahomey) no continente africano, que são resistentes a infecção por *T. vivax*, caracterizando a chamada tripanotolerância, que normalmente tem origem genética e ambiental, mas pode variar de acordo com fatores nutricionais, idade, estresse, infecções concomitantes e cepas do agente envolvidas (DAVILA et al., 1997; SCHENK et al., 2001; MOURA et al., 2009). Animais selvagens que co-evoluíram com tripanossomas, também são geralmente tripanotolerantes e raramente sofrem de doença clínica quando infectados (GIARDINI et al., 2016).

A mortalidade por tripanossomose bovina pode atingir 6,5% em vacas adultas e 30% em bezerros, sendo esta letalidade é atribuída em grande parte à quadros graves de anemia. Os distúrbios reprodutivos graves geralmente aparecem durante o período agudo da doença, tanto em machos quanto em fêmeas (HURTADO et al., 2016).

2.3. Patogenia

A patogenicidade das infecções por tripanossomas varia consideravelmente, dependendo de vários fatores, dentre eles: aspectos relacionados ao parasita (espécie e virulência), hospedeiro (espécie, raça, idade, características imunológicas), estado nutricional do animal, presença de co-infecção, condição física, vetor (espécie, densidade, taxa de infecção e preferência do hospedeiro), situação epidemiológica (endêmica ou epidêmica) e meio ambiente (por exemplo, a disponibilidade de alimentos e água e a estação do ano) (GIORDANI et al., 2016).

Os tripanossomas quando persistem na circulação sanguínea dos hospedeiros, evadem o sistema imune através da invasão aos órgãos vitais como fígado, baço e rins. Acredita-se que a invasão dos tecidos pode ocasionar processos inflamatórios nestes locais, alterando alguns parâmetros, ou infecções concomitantes com outros hemoparasitos, como *Babesia* spp.,

podem explicar ainda os títulos séricos incomuns observados neste momento, isto pode ocasionar alterações fisiológicas como mudança de pH do sangue, hormônios, nutrientes e níveis metabólicos (colesterol e creatinina) em diversos animais (BAKARI et al., 2017).

Os principais mecanismos patogênicos da anemia envolvidos na infecção por *T. vivax* incluem dano mecânico produzido pela interação de tripanossomas com hemácias, filopodia mediado por adesão e fusão de membrana, complexos imunes adsorvidos por eritrócitos e substâncias biologicamente ativas liberadas por tripanossomas vivos ou mortos que produzem lesão eritrocitária (BOADA SUCRE et al., 2016).

Diversos autores relatam alterações patológicas em graus diferentes de lesões em vários órgãos, como hiperplasia de baço, linfadenite eosinofílica e miocardite em ovinos infectados por *T. vivax* (BATISTA et al., 2006), hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite e miocardite não supurativa multifocal em bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* no Pantanal (PAIVA et al., 2000). Acredita-se que todas estas lesões teriam origem na deposição de imunocomplexos e/ou em danos causados pelo próprio agente que estaria presente no espaço extravascular se movimentando.

Alterações histopatológicas do tecido cardíaco de animais infectados demonstraram infiltrado multifocal de células mononucleares no interstício em caprinos, ovinos e bovinos, bem como lesões hemorrágicas com infiltrado mononuclear, atribuindo a reação inflamatória no miocárdio à presença extravascular do *T. vivax*. Alterações em meninges e testículos também já foram observadas, sendo que a última pode afetar diretamente a fertilidade dos animais levando a perda da libido, retardamento da puberdade e má qualidade do sêmen (ALMEIDA et al., 2010). Outras alterações descritas foram os infiltrados inflamatórios nos rins de bovinos infectados por este agente (PAIVA et al., 2000), além de lesões hepáticas, observadas histologicamente e alterações nas enzimas hepáticas, possivelmente decorrentes da produção de uma hepatotoxina produzida pelos tripanossomas ou por um autoanticorpo hepático como ocorre na infecção por *Trypanosoma brucei* (ALMEIDA et al., 2010).

As lesões neurológicas estão em sua maioria associadas à presença de formas tripomastigotas de *T. vivax* no sistema nervoso, como ocorre com o *T. brucei* e *T. evansi*, causando lesões cerebrais inflamatórias e degenerativas, porém o desenvolvimento de encefalopatia associada à hipoglicemia também pode ser um dos fatores responsáveis por estas lesões (DAGNACHEW et al., 2014).

2.4. Diagnóstico Laboratorial

2.4.1 Hemograma

As alterações eritrocitárias variam de acordo com o grau de parasitemia, ou seja, com a evolução clínica da doença, onde é possível observar em fase aguda uma diminuição dos índices hematimétricos (hematócrito, hematimetria e hemoglobina) (GUEGAN et al., 2013). A maioria dos autores afirmam que existe uma anemia de moderada a grave em bovinos (BATISTA et al., 2007, 2008; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012), porém Fidelis Jr e colaboradores (2016) observaram em seu experimento que esta redução é gradativa e mais evidente 18 dias após o período inicial da infecção.

Em relação ao leucograma, leucocitose seguida de linfocitose é um dos achados mais frequentes em fase crônica da infecção por *T. vivax* em cabras, ovelhas e bovinos, bem como eosinopenia (PAIVA et al., 2000). Por outro lado, Batista e colaboradores (2006; 2008) encontraram com maior frequência na fase crônica a leucopenia com linfocitose. Acredita-se que os valores dos leucócitos tendem a retornar à fase pré-infecção e às vezes até excedem esses valores (FIDELIS JR et al., 2016).

Fidelis Jr e colaboradores (2016) comentaram que no início da infecção, a leucopenia ocorre pela presença massiça de *Trypanosoma vivax* na circulação ou devido à apoptose leucocitária, fato já demonstrado no estágio parasitêmico da infecção por *T. brucei* em ratos. Associada a redução dos leucócitos, a neutropenia pode estar relacionada a redução de eritrócitos, já que estudos anteriores demonstraram a capacidade dos eritrócitos de proteger os neutrófilos da apoptose pelo metabolismo da glutatona e da catalase.

A trombocitopenia na primeira semana de infecção experimental, iniciada simultaneamente com a detecção de parasitos, pode estar relacionada à lise plaquetária ou ao consumo de plaquetas na formação de microtrombos induzidos pelo parasita. A alteração numérica e funcional das plaquetas é o principal fator responsável pela síndrome hemorrágica (FIDELIS JR et al., 2016).

2.4.2 Bioquímica

As infecções por tripanossoma em animais geralmente progridem para estados crônicos da doença, quando neste momento é possível observar que os parâmetros bioquímicos séricos atingem valores normais ou quase normais, concomitante com a redução brusca da parasitemia. A cronicidade pode, portanto, explicar as diferenças não significativas nos parâmetros bioquímicos observados em bovinos em diversos estudos (BAKARI et al., 2017).

Os fatores raciais interferem nos teores séricos de proteína total e de bilirrubina total nos bovinos da raça Gir, Girolando e Holandesa, de forma que os valores da aspartato aminotransferase (AST) são maiores nos bovinos da raça Girolando quando comparado com os obtidos para os

bovinos da raça Holandesa e Gir. O proteinograma de bovinos da raça Gir e Holandesa apresentam os valores de proteína total e gamaglobulinas maiores do que na raça Girolanda, em contrapartida os valores de albumina são menores nesta raça. As taxas séricas de bilirrubinas e da gama glutamiltrnasferase (GGT) não sofrem influência de fatores raciais (SOUZA et al., 2004).

O perfil bioquímico de animais infectados por *T. vivax* geralmente é normal (SCHENK et al., 2001; ALMEIDA et al., 2010). A associação de alterações inespecíficas com a flutuação da parasitemia observada durante a infecção dificulta o diagnóstico e contribui para sua disseminação (FIDELIS JR et al., 2016).

Segundo Bakari e colaboradores (2017), anormalidades na fisiologia do hospedeiro de mamíferos, como alterações no pH do sangue, hormônios, nutrientes e níveis de metabólitos, dentre eles colesterol e creatinina, ocorrem durante o curso da infecção por *Trypanosoma* spp. em bovinos, cães, porcos, ovelhas e cabras.

Danos teciduais e celulares provocados por diversos agentes alteram a permeabilidade da membrana liberando as enzimas que estariam no citosol ou organelas celulares para o fluido extracelular, o que pode ser detectado através das alterações nos níveis de enzimas no sangue (OBALEYE et al., 2007).

a) Fosfatase Alcalina (FAL)

A fosfatase alcalina (FAL) é uma glicoproteína com função hidrolítica, responsável pela remoção de grupamentos fosfato de vários tipos de moléculas. Sua determinação é bastante útil no diagnóstico de doenças hepatobiliares. Sua elevação na corrente sanguínea pode estar associada a obstrução biliar extra e intra-hepática, colestases e hepatite (KANNEKO et al., 2008).

A elevação da FAL em animais infectados por *Trypanosoma* spp. está associada a uma provável invasão das formas tripomastigotas nos órgãos vitais do corpo e inflamação, particularmente do intestino e do fígado ou pela destruição de tripanossomas pelo sistema imunológico do hospedeiro (BAKARI et al., 2017).

Foi visto um aumento significativo de FAL em bovinos infectados por *T. vivax* e *T. theileri* no estudo de Bakari e colaboradores (2017), o que não ocorreu nos trabalhos de Moura et al. (2009) e Fidelis Jr et al. (2016), ficando dentro da normalidade. No entanto, em Almeida et al. (2010), houve a redução da enzima na circulação sanguínea o que foi explicado pelos autores como uma interação entre o *T. vivax* e o hepatócito.

Da mesma forma que é possível observar elevação da fosfatase alcalina (ALP) em infecções por *T. vivax* e *T. theileri*, foram observadas elevações desta enzima em porcos, coelhos e ratos infectados experimentalmente com *T. brucei* (ORHUE et al., 2005) e *T. congolense* (EGBE-NWIYI

et al., 2003).

b) Bilirrubinas

O metabolismo dos pigmentos biliares revela a produção de bilirrubina como produto final da degradação do grupo heme, o qual pode provir da hemocaterese realizada pelo baço, onde é posteriormente transportado para o fígado pela circulação esplênica (Figura 1). A bilirrubinemia está em excesso quando a produção de bilirrubina é elevada e atinge o máximo da capacidade de ligação do pigmento pela albumina, sai da circulação e dirige-se para vários tecidos, em especial fígado, rins, pulmões, coração, glândulas suprarrenais e cérebro (MARTELLI, 2012).

A elevação de bilirrubina indireta é sugestivo de anemia hemolítica que ocorre pela presença de tripanossomas no sangue ou icterícia, conforme relatado anteriormente em animais infectados por estes hemoprotozoários (BAKARI et al., 2017). Fidelis Jr e colaboradores não encontraram alterações significativas de bilirrubinas no sangue de bovinos infectados, este fato está relacionado provavelmente a pouca hemólise, já que os animais não apresentaram anemia grave no estudo. Além disso, segundo estes autores, se houvesse o aumento da bilirrubina direta poderia indicar lesão hepática.

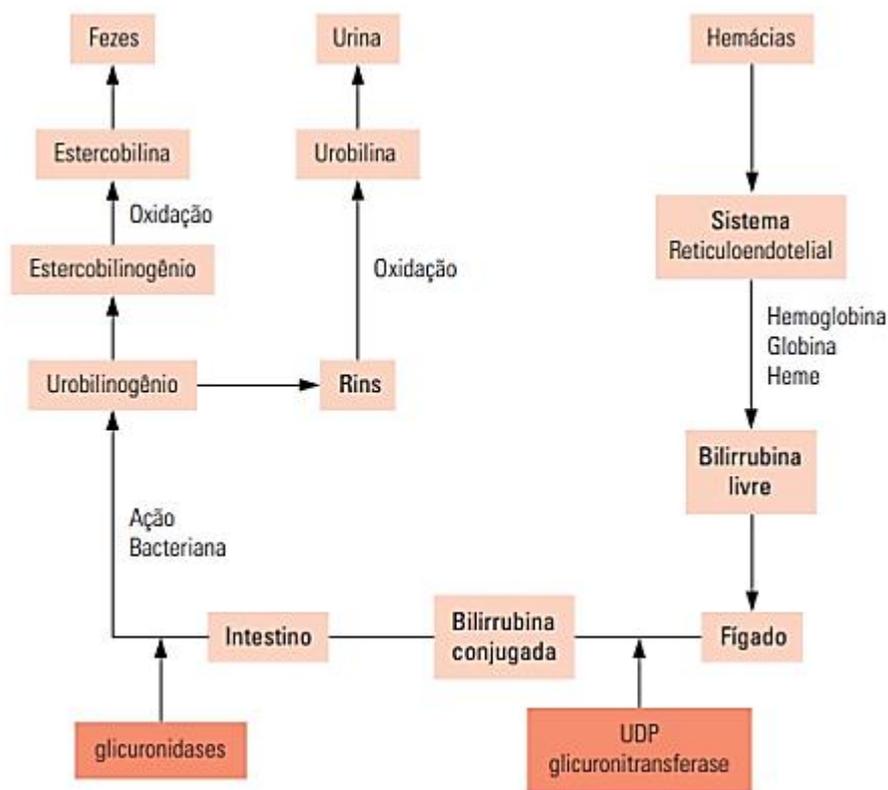


Figura 1. Esquema do metabolismo da bilirrubina (MARTELLI, 2012).

c) Proteína Total e frações

A proteína total do soro é composta basicamente por albumina e globulina, sendo que a hipoproteïnemia deve-se a: requerimento insuficiente na dieta, má absorção proteica, deficiência na síntese de albumina pelo fígado, evasão da albumina para o espaço tecidual, com o aumento da permeabilidade capilar nos processos inflamatórios agudos, e nas enfermidades crônicas como nas neoplasias, além do estágio fisiológico do animal que influi na variação do proteinograma (COLES, 1984). Bakari e colaboradores (2017) relataram a presença de hipoproteïnemia recorrente em fase aguda de animais infectados por *T. vivax* e correlacionaram isso a perda de apetite dos animais.

A hipoalbuminemia pode estar relacionada à lesão hepática, uma vez que a albumina é produzida apenas nesse órgão (KANEKO et al., 2008). No entanto, a proteína total e a albumina podem ser encontradas em níveis normais, mesmo na presença de lesão hepática, a menos que a hepatite envolva grande parte do fígado e seja suficientemente grave para causar falência de órgãos (PINCUS; SCHAFFNER, 1999).

A hiperglobulinemia normalmente está relacionada ao aumento do estímulo antigênico durante a fase crônica das tripanosomoses, elevando a produção de anticorpos ou imunoglobulinas (IgG e IgM) a fim de controlar e erradicar o parasito (BAKARI et al., 2017; FIDELIS JR et al., 2016).

A hiperproteïnemia também foi encontrada em bovinos infectados com *T. vivax* e teve como explicação plausível a hemoconcentração ou estimulação antigênica causada por este agente. Além disso, a tripanossomose pode induzir o catabolismo proteico nos animais infectados, alterando assim a dinâmica do metabolismo proteico (MOURA et al., 2009).

d) Colesterol

O colesterol é um álcool policíclico de cadeia longa, considerado um esteroide, encontrado em membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo dos animais. É o principal esteroide sintetizado no tecido animal (KANEKO et al., 2008). A redução do colesterol está relacionada a demanda de energia dos tripanosomas, bem como à síntese ou liberação prejudicada de colesterol pelo fígado (BAKARI et al., 2017).

Sabe-se que as formas tripomastigotas de tripanosomas na corrente sanguínea, são incapazes de sintetizar o colesterol, sendo este necessário para formação de fosfolípidios e lípidios totais para síntese e crescimento da membrana. Assim, a síntese no hospedeiro é prejudicada, o que por sua vez pode resultar em uma respiração hepatocelular insuficiente devido à hipóxia causada pela anemia e uma liberação reduzida de colesterol pelo fígado, o que também pode ser um fator adicional para a diminuição dos níveis séricos do colesterol total, observados nos animais infectados pelo tripanossoma (DAGNACHEW et al., 2014).

e) Glicose

Os tripanossomas usam a glicose como fonte principal de energia, isso é facilmente observado na fase aguda das tripanossomoses quando há uma alta parasitemia. O processo ocorre através de transportadores específicos em sua membrana plasmática, similares aos das hemácias de mamíferos, que facilita a captação dessa molécula. Além disso, esse tipo de difusão facilitada permite ao parasito uma grande eficiência na captação da glicose resultando em uma hipoglicemia no hospedeiro (BARRET et al., 1998).

Dagnachew e colaboradores (2014) e Fidelis Jr e colaboradores (2016), observaram esta hipoglicemia em bovinos infectados com *T. vivax* durante a fase aguda da doença num período de aumento da parasitemia.

f) Uréia

As concentrações séricas de uréia podem estar elevadas com o aumento do consumo dietético de proteína, caquexia ou hemorragia no interior do trato gastrointestinal. E esse aumento, pode acarretar tanto em uma aceleração no catabolismo protéico, quanto em uma diminuição na sua excreção urinária. Fatores não renais que diminuem os valores de uréia sanguínea são esteróides, diminuição do catabolismo protéico e uma severa insuficiência hepática (DORETTO et al., 1996).

A diminuição de nitrogênio uréico sanguíneo pode ser considerada como indicador de doença hepática grave, uma vez que a uréia é sintetizada nos hepatócitos a partir da amônia. Em animais com insuficiência hepática, a menor quantidade de hepatócitos provoca menor taxa de conversão de amônia em uréia. Consequentemente, a taxa de amônia aumenta e o teor de nitrogênio da uréia sanguínea diminui (MOURA et al., 2009).

g) Creatinina

A creatinina é um metabólito que avalia diretamente a filtração glomerular e, portanto, é indicativa de função renal. Seus valores tornam-se elevados quando ocorre comprometimento renal da ordem de 60% a 75% dos néfrons de ambos os rins (MORAIS et al., 2000).

A produção diária de creatinina é relativamente constante não sendo influenciada por fatores extra-renais como acontece com a uréia. No entanto, a verdade é que a maioria das dietas pode causar diminuição do teor sérico da creatinina, porque os nutrientes absorvidos induzem um aumento pós-prandial da taxa de filtração glomerular (MOURA et al., 2009). Por isso, provavelmente não foi vista diferença significativa no estudo de Fidelis Jr e colaboradores (2016) entre bovinos infectados e não infectados por *T. vivax*.

h) Aspartato aminotransferase (AST)

A aspartato amino transferase (AST) é uma enzima que está presente no fígado e na musculatura esquelética e cardíaca, por isso o diagnóstico através deste exame deve estar associado a outras análises para confirmação de diagnóstico. Quando a dosagem de AST está associada a da enzima creatina fosfoquinase (CK), caracteriza uma alteração muscular. Dessa forma, esses achados sugerem haver lesão muscular em ovinos infectados com *T. vivax*. Por outro lado, a sua redução pode estar relacionada a um desequilíbrio metabólico, vindo a ocasionar um funcionamento anormal do órgão onde ela tem sua maior atividade (ALMEIDA et al., 2010).

i) Alanina aminotransferase (ALT)

A enzima alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima hepato-específica presente no citosol dos hepatócitos. Sabe-se que a concentração desta enzima é reduzida nos hepatócitos dos ruminantes, conseqüentemente a atividade sérica de ALT nestas espécies não é útil para detectar doença hepática (MOURA et al., 2009). Dagnachew e colaboradores (2014) corroboram com esta afirmativa ao relatar que os níveis de ALT em animais infectados por *T. vivax* permaneceram constantes dentro dos limites de pré-infecção ao longo do curso do estudo experimental.

Batista e colaboradores (2008) observaram que a ALT reduziu significativamente a partir do 25º dia pós infecção, o que segundo os autores pode estar relacionado a lesão hepática, já Bakari e colaboradores observaram além da redução de ALT para *T. vivax*, a redução ocorrendo também em infecções para *T. theileri*.

Segundo Almeida et al. (2010) o aumento das enzimas ALT e AST em bovinos infectados por *Trypanosoma vivax* não ocorrem por danos teciduais, mas pelo fato de o parasito secretar parte dos seus metabólicos (AST e ALT) dentro da circulação sanguínea, fato observado em suspensão de cultivo de tripanossomas. Contudo, o decréscimo destas enzimas estaria associado à alteração hepática desenvolvida com a progressão da doença.

j) Lactato desidrogenase (LDH)

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é um composto tetrâmero que apresenta dois homólogos ou subunidades, está presente na via glicolítica durante anaerobiose. Esta enzima não é hepato-específica, pois é onipresente no citoplasma de todas as células e possui cinco isoenzimas, cuja composição varia em diversos tecidos. A LDH1 é predominante no coração, eritrócitos e rim, enquanto a LDH5 é predominante no fígado e nos músculos esqueléticos. As outras isoenzimas derivam principalmente de leucócitos, linfonodos, pulmão e baço (JIALAL, SOKOLL, 2015). A LDH é portanto, um importante marcador de dano celular (BALDISSERA et al., 2015), porém para

que haja confirmação de lesão muscular, faz-se necessário a dosagem CK (KANNEKO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010).

Cano et al. (2000) verificaram um aumento na concentração plasmática de LDH em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, antes mesmo dos animais apresentarem lesões histopatológicas, o que foi sugerido como um possível indicador mais sensível para diagnóstico da infectividade do parasito nos tecidos alvos e não uma resposta inespecífica a um efeito citotóxico geral. Já Baldissera et al. (2015) observaram alterações nesta enzima em camundongos infectados por *T. evansi*, concomitantemente a lesões histopatológicas de necrose miocítica e infiltrado inflamatório. Hilali et al. (2000) também observaram a elevação da concentração da LDH em búfalos infectados com *T. evansi*, sem análise histopatológica, foi sugerido pelos autores que esta alteração pode ter ocorrido por leve distúrbio hepático, disfunção muscular, insuficiência renal congestão e / ou aumento do número de linfócitos.

Fidelis Jr e colaboradores (2016) observaram em seu experimento que houve aumento desta enzima apenas na fase crônica da tripanossomose, o que pode estar diretamente ligado ao catabolismo de proteína muscular devido caquexia característica nesta fase de evolução da doença.

l) Gama glutamiltransferase (GGT)

A γ -glutamiltransferase (GGT) é considerada uma enzima de indução. No entanto, a lesão hepática aguda pode provocar aumento imediato na atividade sérica do GGT, possivelmente devido à liberação de fragmentos de membrana que a contém. Em ruminantes, a limitada faixa de normalidade da atividade sérica de GGT torna mais valiosa a determinação desta enzima (MOURA et al., 2009).

Fidelis Jr e colaboradores (2016) observaram em seu experimento que houve uma flutuação dos resultados nos bovinos infectados com *T. vivax*, apesar de o valor de GGT já ter iniciado aumentado. Por outro lado, Schenk et al. (2001) observaram a normalidade da concentração de GGT em bovinos infectados, não sendo detectadas alterações que evidenciassem uma disfunção hepática. Já Almeida e colaboradores (2010) observaram a diminuição dos valores de GGT. Isto demonstra a grande variação do perfil bioquímico de GGT em animais infectados por tripanossoma.

A exploração do potencial de biomarcadores de parâmetros bioquímicos exige uma consideração cuidadosa do estágio da infecção (aguda ou crônica), endemicidade / intensidade de transmissão de uma área e práticas de tratamento por pecuaristas (BAKARI et al., 2017), bem como, da cepa do parasita e a variabilidade na suscetibilidade à infecção, que influenciam a natureza e a gravidade das respostas (DAGNACHEW et al., 2014). Moura e colaboradores (2009) acreditam que fatores como nutrição, manejo, e a genética dos animais avaliados, influem no estágio de evolução

da doença (fase aguda ou crônica) e ainda pode estar ligada a adaptabilidade dos animais a ação do parasito (relação parasito/ hospedeiro).

2.5. Diagnóstico Diferencial

Clinicamente, a tripanossomose pode ser confundida com babesiose, anaplasmoses ou teileriose, até mesmo com erliquiose, raiva ou intoxicação por plantas tóxicas (OIE, 2013). Encontrar informações macroscópicas patognomônicas que associam o aborto a um patógeno em específico é muito improvável, ainda mais quando a autólise está presente; por isso, o diagnóstico a campo deve considerar a história do rebanho, a epidemiologia da região e uma coordenação adequada entre o veterinário responsável e o laboratório de diagnóstico, para que isso possa definir a melhor amostra a ser coletada e o teste disponível, que possam auxiliar na identificação do agente (LINHARES et al., 2006).

Segundo Pereira e colaboradores (2018) a semelhança dos sinais clínicos com outras enfermidades, como anaplasmoses e babesiose, que cursam com sintomatologia semelhante e inespecífica, pode indicar que a tripanossomose bovina está sendo subdiagnosticada no Brasil. Este panorama piora ao avaliarmos que os medicamentos utilizados terapêuticamente na anaplasmoses e babesiose apresentam alguma eficácia sobre os tripanossomas, o que pode levar a uma recuperação momentânea do animal e erros de diagnóstico.

A babesiose bovina tem como agentes etiológicos *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) e tem como seu único vetor o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (VIEIRA et al., 2003; GUEDES JR et al., 2008). A anaplasmoses é causada pela rickettsia *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) e temos carrapatos ixodídeos, principalmente *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, como vetores biológicos, além de haver a transmissão iatrogênica, transmissão transplacentária e através de insetos hematófagos (KESSLER, 2001). Durante a infecção aguda, os patógenos da Babesiose e Anaplasmoses causam anemia, baixo ganho de peso, redução na produção de leite e até mortalidade de animais suscetíveis (KOCAN et al., 2003; BOCK et al., 2004).

2.6. Tratamento

Nas áreas de estudo atual, sem informações relevantes sobre a virulência dos tripanossomas, os tratamentos com drogas tripanocidas são frequentemente realizados para o controle da doença. Mas para isso, é fundamental conhecer sobre a virulência do parasita adaptado para transmissão cíclica e o puramente transmitido mecanicamente, para com isso avaliar as respostas ao tratamento e a resistência / tolerância do hospedeiro às infecções, bem como a distribuição da doença

(DAGNACHEW et al., 2014).

O tratamento e a profilaxia de infecções patogênicas por tripanossomas em animais dependem de apenas seis compostos e mesmo assim vários fatores limitam seu uso. Todas eles podem causar reações locais e como sua utilização tem sido intensiva a campo, ocasionou o aparecimento de parasitos resistentes. A maioria destes compostos causam a degradação do cinetoplasto dos tripanosomas, impedindo sua multiplicação, apresentando mais uma ação profilática do que terapêutica, como ocorre com o fenantridina isometamídio (STEVENSON et al., 1995). Idealmente, em áreas de baixa prevalência, apenas os animais que apresentam doença clínica atribuível aos tripanosomas e / ou que confirmaram a infecção devem ser tratados com medicamentos terapêuticos. Já em áreas endêmicas, de alto desafio, os medicamentos devem ser usados profilaticamente em todo o rebanho, reduzindo assim a mortalidade e morbidade, e consequentemente reduzindo o prejuízo econômico (GU et al., 1999).

Os dois medicamentos mais comuns no Brasil para o tratamento da tripanossomose bovina causada por *T. vivax* são o aceturato de diminazeno e cloreto de isometamídio. Se a infecção por *T. vivax* não for tratada, os animais podem se tornar portadores clínicos assintomáticos, sendo capaz de espalhar e perpetuar a doença para o resto do rebanho (BATISTA et al., 2011; HURTADO et al., 2016)

Acredita-se que novas drogas para combate aos tripanosomas só surjam em 3 a 5 anos, logo, faz-se necessário o uso prudente dos tripanocidas disponíveis no mercado, o que é difícil de controlar à campo, já que estes são vendidos a preços muito baixos na África e são livremente utilizados por pecuaristas, que muitas vezes tem acesso limitados as ferramentas de diagnóstico e confiam em sinais clínicos inespecíficos como ocorre na tripanossomose. Além disso, em casos de recaída, o animal deve ser tratado com uma classe de medicamento diferente do administrado anteriormente, o grande problema é que muitas vezes além do uso indiscriminado de medicamento, faz-se o uso alternado de diminazeno e isometamídio (GIORDANI et al., 2016).

O aceturato de diminazeno foi usado inicialmente no tratamento da babesiose e tripanossomose africana, principalmente para *Trypanosoma congolense* e *T. brucei*. Atualmente, o diminazeno é o tripanocida mais utilizado em bovinos, ovinos e caprinos, devido à sua atividade contra *T. congolense* e *T. vivax* e seus efeitos colaterais tóxicos relativamente baixos. A dose terapêutica recomendada é de 3,5 mg /kg de peso corporal para *T. congolense* e *T. vivax* (7 mg /kg podem ser recomendados contra isolados resistentes), administrado por via intramuscular ou subcutânea (CONNOR, 1992). Ele deve ser usado apenas como terapeutico e não como preventivo, pois é metabolizado e excretado muito rapidamente por via urinária (Peregrine e Mamman, 1993). Os resíduos de diminazeno podem persistir por várias semanas nos tecidos comestíveis do gado e de

outros animais produtores de alimentos, especialmente no fígado e nos rins, enquanto os níveis de fármacos no leite persistem por até 48 horas (FAO, 1990). Por esse motivo, é aconselhado que carcaças de bovinos e de ovinos não sejam utilizadas para consumo humano antes de um intervalo de 35 dias da aplicação da medicação e 3 dias para o consumo do leite (GIARDINI et al., 2016).

O cloridrato de isometamídio tem propriedades curativas e profiláticas e, é até hoje a única droga quimioprofilática da Tripanossomose Animal Africana, uma vez que apresenta baixa atividade tripanocida, mas possui um bom efeito profilático, possivelmente porque pode atuar como um pró-medimento. Administrações de isometamídio podem causar graves lesões fibrosas, prejudicando a carcaça e a qualidade da carne do gado. A administração intravenosa tem sido utilizada com sucesso para anular os danos, mas foi sugerido que isso poderia resultar em atividade profilática comprometida, devido a falta de um depósito de droga no local da injeção. A duração da atividade profilática após a administração intramuscular em bovinos é tipicamente de 2 a 3 meses e pode demorar até 6 meses. A droga se acumula no fígado, rins e baço, bem como no local da injeção, e daqui é lentamente liberado para o plasma exercendo sua atividade profilática (GIARDINI et al., 2016).

2.7. Controle e profilaxia

A variabilidade genética de *Trypanosoma* spp. durante o curso da infecção, dificulta muito a vacinação e o desenvolvimento de vacinas (ZAMBRANO-VILLA et al., 2002). É definitivamente conhecido que as autoridades sanitárias não permitem que animais infectados com *T. vivax* sejam transportados para áreas consideradas não endêmicas da doença, a fim de prevenir as conseqüências no rebanho (CADIOLI et al., 2012; JONES e DAVILA, 2001). É muito importante eliminar a possibilidade de transmissão iatrogênica, usando agulhas específicas para cada animal; além disso, deve-se prestar atenção no controle de vetores, especialmente nas épocas do ano em que sua população aumenta (HURTADO et al., 2016).

Todos os tripanossomas importantes para o gado são parasitas extracelulares em mamíferos e evadem as defesas imunológicas do hospedeiro mudando continuamente sua camada superficial, isso impede o desenvolvimento de vacinas convencionais. Sendo assim, o controle da tripanossomose animal depende principalmente do uso de inseticidas ou armadilhas para controlar o vetor (especialmente na África onde é transmitida exclusivamente pela mosca tsé-tsé) e do uso de tripanocidas para controlar o parasita. Como o controle vetorial pode ser caro quando usado em larga escala e nem sempre é sustentável ou eficaz, a administração de drogas tripanocidas tornou-se primordial em países pobres e em áreas endêmicas (GIARDINI et al., 2016).

O controle da infestação de carrapatos nas pastagens e da presença de moscas e mutucas

auxiliam no tratamento, uma vez que estes podem ocasionar estresse momentâneo, capaz de reduzir as defesas do organismo e ocasionar o surgimento de sinais clínicos em alguns animais (PEREIRA et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição dos Locais de Estudo

Para este estudo, 242 bovinos foram amostrados em cinco municípios do estado do Rio de Janeiro, onde ocorreu o surto de *T. vivax*, durante o período de 2016 à 2018, a saber: Areal, Barra Mansa, Pirai, Rio Claro e Santo Antônio de Pádua. As propriedades foram selecionados por conveniência de acordo com o histórico de animais doentes.

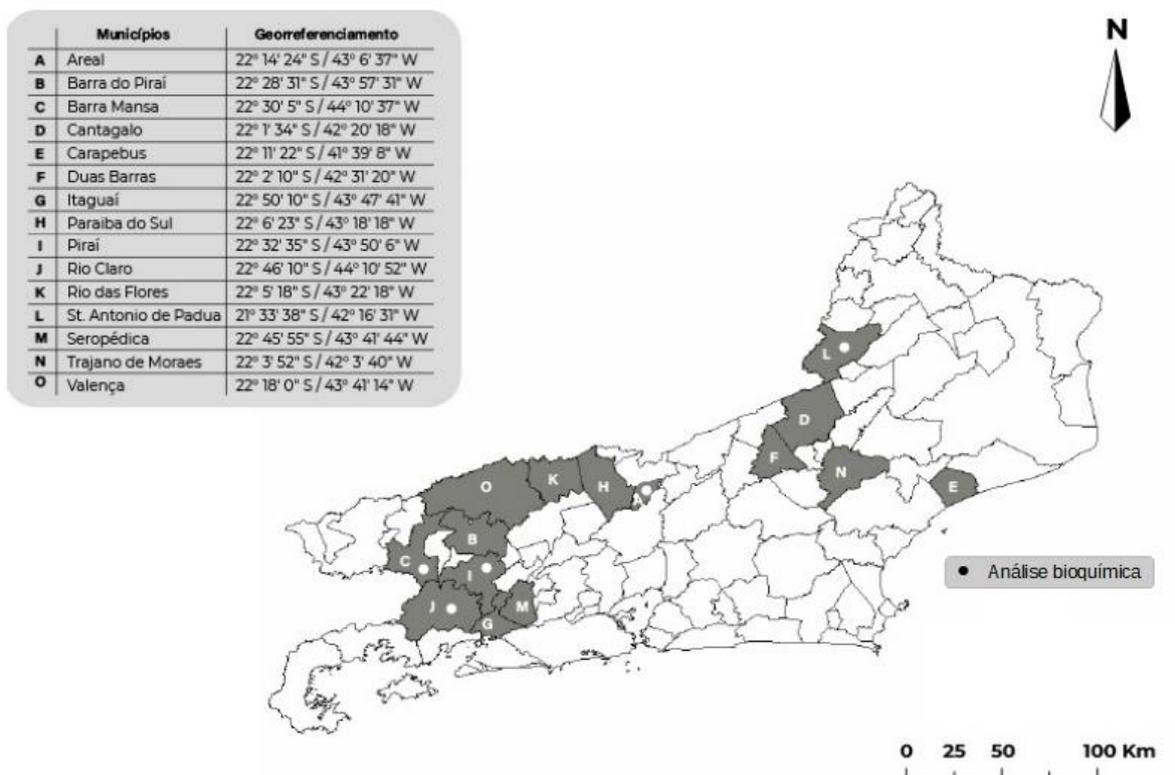


Figura 2. Mapa do estado do Rio de Janeiro com origens geográficas de cidades com suspeita de infecção por *T. vivax*, onde foram coletadas amostras para análise bioquímica.

As classificações climáticas de vegetação, temperatura, chuva e características sazonais, é possível classificar o clima dos municípios estudados apresentam latitudes (sul) de 22°, incluindo estas na zona climática A ou Clima Megatérmico (Clima Tropical Chuvoso), porém como o inverno nestas cidades são secos e com precipitação média inferior à 60mm em pelo menos um dos meses desta estação, podemos ainda classificar o tipo climático fundamental e variedade dentro do grupo A como Aw, de acordo com Köppen e Geiger, dados disponíveis no site climate-data.org.

3.2 Amostragem e Processamento das amostras

Os bovinos coletados eram de ambos os sexos, de todas as faixas etárias, de diferentes raças e animais que desenvolviam diferentes aptidões zootécnicas (leite e carne). Não houve estratificação amostral por propriedade ou cidade coletada, sendo coletados os seguintes animais por município: Areal (n=147), Barra Mansa (n=10), Pirai (n=2), Rio Claro (n=7) e Santo Antônio de Pádua (n=76), totalizando 242 bovinos.

Após a devida contenção física dos animais, o sangue total foi coletado da veia coccígea com agulha 25 x 7 mm em tubos estéreis de 10 mL sem anticoagulante. As amostras foram mantidas sob refrigeração em isopor hermeticamente fechado até chegar ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram centrifugados em centrífuga clínica por centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e dessorados com pipeta de volume variável de 200-1000 µL (microlitros). O soro foi acondicionado em tubos de polipropileno (ependorf) de 1,5 µL, identificados por numeração sequencial e armazenados em freezer a -20 °C até o momento da análise.

3.3. Extração do DNA total

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue total de bovinos conforme preconizado pelo kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®], Madison, WI, USA). Em seguida o DNA total foi armazenado em microtubos em três aliquotas de 0,6 mL e mantido à -20 °C. Tanto a extração de DNA, quanto o preparo das reações e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados e uso de ponteiras com filtro, evitando a ocorrência de contaminação.

3.4. Obtenção dos controles positivos

O controle positivo para *T. vivax* (MH184514) e para *T. theileri* (MN966843) foi obtido de vacas com alta carga parasitária em esfregaços de sangue e confirmado por sequenciamento de DNA para o gene *18 S rDNA*, sem co-infecção. Para os controles negativos utilizamos água ultrapura para PCR, dentro e fora do fluxo laminar.

3.5. Reações em Cadeia da Polimerase para diagnóstico de *Trypanosoma vivax*

A reação de PCR para *T. vivax* utilizada por Cortez e colaboradores (2009) com alvo no gene *catl*, os primers DTO 154 (5'-ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG-3') e DTO155 (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3'), amplificando internamente 500 pb, adaptações na concentração de dNPT, MgCl₂ e Taqforam realizadas conforme descrito

abaixo. O volume final da reação foi de 30 µL contendo: 17,45 µL de água ultrapura, 1X tampão de amplificação,

Organismo	Alvo DNA	“Primer”	Sequência de Oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho do amplicom (pb)	Temperatura de anelamento
<i>A. marginale</i>	<i>mps5</i>	<i>mps5F</i>	GCATAGCCTCCGCGTCTTTC	458	65 °C
		<i>mps5</i>	TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA		
<i>B. bovis</i>	<i>18S</i>	<i>GAU9F</i>	CTGTCGTACCGTTGGTTGAC	541	59,3°C
		<i>GAU10R</i>	CGCACGGACGGAGACCGA		
<i>B. bigemina</i>	<i>18S</i>	<i>GAU5F</i>	TGGCGGCGTTTATTAGTTTCG	458	57,2°C
		<i>GAU8R</i>	GCCAGCGAAAAGACCCAAC		

3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,5 µM de cada primer, 1,5 U de DNA polimerase Taq e 5 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min e 72 °C durante 1 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

3.6. Diagnóstico Diferencial

Foram considerados diagnósticos diferenciais para infecção por *T. vivax*, os agentes da Tristeza Parasitária Bovina, que acometem bovinos com maior frequência no Brasil, são eles: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Para tal, foram realizadas as reações de amplificação para *A. marginale* (TORIONI et al., 1998), *B. bovis* e *B. bigemina* (LINHARES et al., 2002), conforme tabela abaixo.

Tabela 1. “Primers” utilizados no diagnóstico diferencial de *Trypanosoma vivax*.

3.7. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, num volume de 10 µL de produto e 1,5 µL de Tampão de amostra azul de bromofenol. Além disso, no primeiro ou último poço foi aplicado 4 µL de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®). A corrida foi realizada à 100 V por 30 a 40 minutos, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH8,0), corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados no transiluminador UV acoplado a um analisador de imagem L-Pix (Loccus®).

3.8. Mensuração dos parâmetros bioquímicos do soro

As amostras de soro bovino foram processadas no Setor de Análises Clínicas do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os níveis séricos de Gama Glutamiltransferase (GGT), Proteína Sérica Total (PTS), Albumina (ALB), Bilirrubina Total (BT) e Direta (BD), Creatinina (CR), Uréia (UR), Fosfatase Alcalina (FAL), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST/TGO) e Alanina Aminotransferase (ALT/TGP) foram determinados usando o analisador bioquímico automatizado A15 (Biosystems®) e kits de reagentes comerciais de acordo com o equipamento utilizado.

3.9. Análise Estatística

Os dados obtidos foram planilhados conforme Anexo III e categorizados para análise estatística no software Bioestat® (AYRES et al., 2007) e R-Studio® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010). Para tal, animais infectados para *T. vivax* foram considerados como número 1 (um) e animais não infectados, 0 (zero). Para análise dos parâmetros bioquímicos (GGT, PTS, ALB, BT, BD, CR, UR, FAL, LDH, AST e ALT) as variáveis foram categorizadas conforme organograma abaixo (Figura 3).

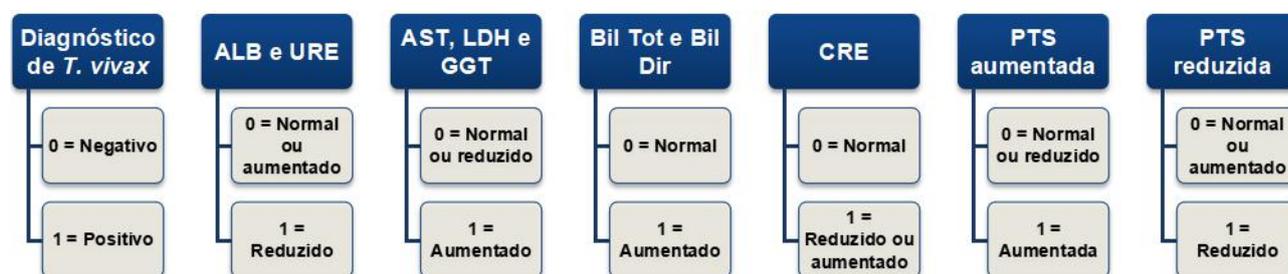


Figura 3. Organograma da categorização dos dados bioquímicos à serem analisados.

A albumina e a uréia foram consideradas 0 (zero) para valores normais ou aumentados, e 1 (um) para concentração reduzida; às enzimas AST, LDH e GGT, foram atribuídos 0 (zero) para valores normais ou reduzidos, e 1 (um) para concentração aumentada delas; em Bilirrubina direta e total, foi considerado 1 (um) para aumento da concentração e 0 (zero) para normalidade; para creatinina foi categorizada como número 1 (um) para valores acima ou abaixo da normalidade, e dentro da normalidade foram considerados como 0 (zero).

Visto que a presença de *T. vivax* pode levar a redução da albumina nos casos de insuficiência hepática, ou ainda levar ao aumento das globulinas em detrimento da resposta imunológica frente à presença do parasito, optou-se pela avaliação da PTS aumentada e diminuída

separadamente. Desta forma, categorizou-se: na primeira análise, 0 (zero) para valores normais ou reduzidos, e 1 (um) para concentração aumentada de PTS, e posteriormente, 0 (zero) para valores normais ou aumentados, e 1 (um) para concentração reduzida deste metabólito.

Em relação a ALT e FAL, não houve nenhum animal positivo para *T. vivax* com alteração bioquímica, seja para mais ou para menos, por isso, optou-se pela não realização de categorização de dados e análise estatística.

Para comparação de animais infectados e não infectados para *T. vivax* considerou-se como infectados apenas os animais positivos para este agente na ausência de co-infecção por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, e animais não infectados, os negativos para *T. vivax* e para outros agentes da Tristeza Parasitária Bovina.

A frequência de bovinos que apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos (GGT, PTS, ALB, BT, BD, CR, UR, LDH, AST) em função do resultado positivo na PCR para *T. vivax* foram comparadas através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 25% de significância. Posteriormente a esta análise, foi construído o modelo de Regressão Logística Multivariada (RLM), no software R Studio® com todas as variáveis.

3.10. Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ (CEUA/UFRRJ), sob número de protocolo 5931200217. Todos os comprovantes das aprovações encontram-se em anexo.

3.11. Fluxograma Metodológico

Para o delineamento deste estudo, a Figura abaixo (Figura 3) demonstra o processo de coleta do sangue total em bovinos com todos contendo EDTA, e posterior procedimentos que envolvem a biologia molecular (extração, PCR, purificação dos produtos obtidos, sequenciamento do DNA amplificado e análise do sequenciamento através dos programas MEGA 7 e CLC, com confecção de árvore filogenética para cada um dos genes utilizados (*18S rDNA* e *catl*), e pesquisa de hemoparasitos (confecção, fixação, colocação e observação microscópica dos esfregaços sanguíneos).

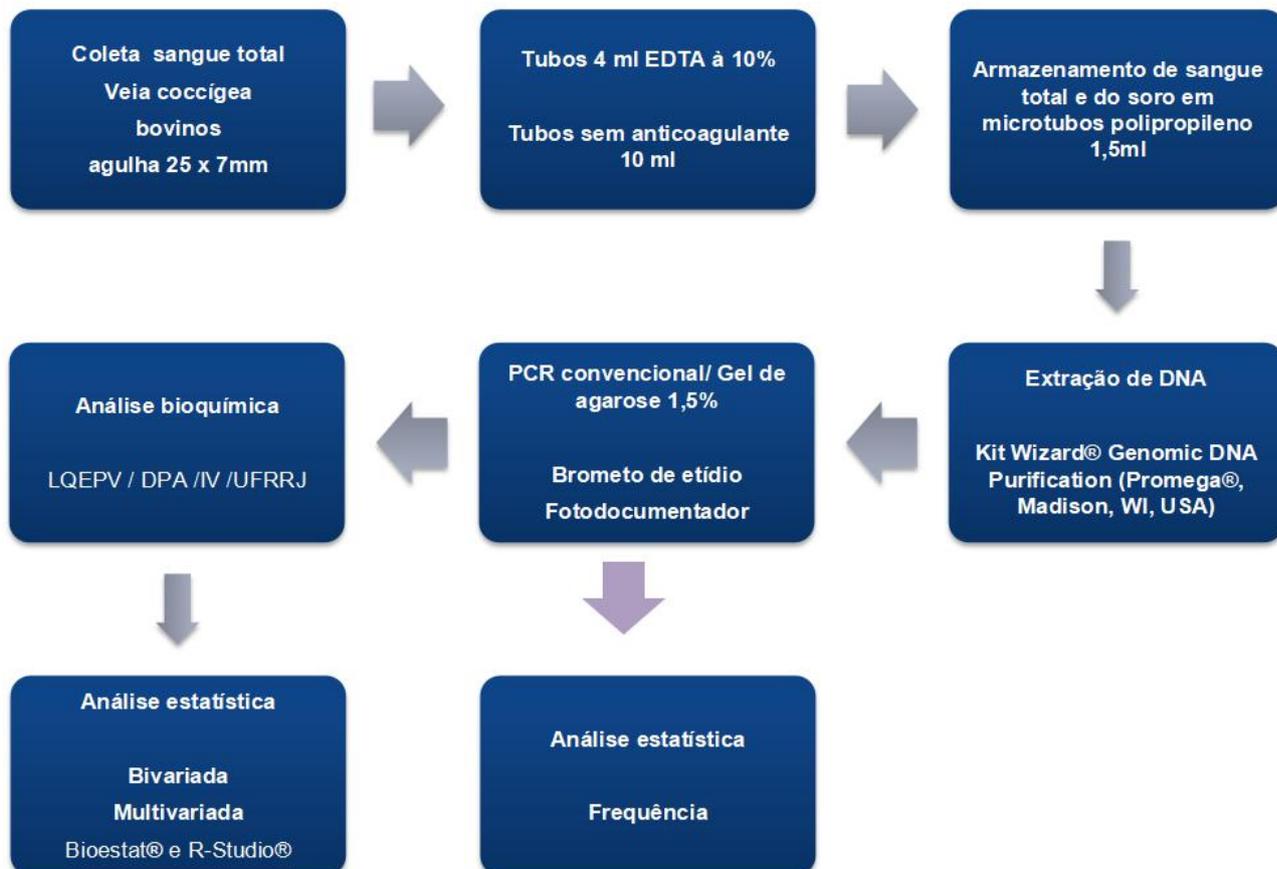


Figura 4. Fluxograma do delineamento do estudo

4 RESULTADOS

Ao analisar os dados das coletas de sangue dos 242 bovinos de cinco municípios do estado do Rio de Janeiro, 60,7% (n=147/242) foram oriundos do município de Areal, 4,1% (n=10/242) de Barra Mansa, 0,8% (n=2/242) de Pirai, 2,9% (n=7/242) de Rio Claro e 31,4% (n=76/242) de Santo Antônio de Pádua.

Deste total de amostras, através do diagnóstico por PCR convencional, verificou-se que 20,6% (n=50/242) foram positivos para *Trypanosoma vivax*, 8,3% (n=20/242) para *Babesia bigemina*, 12,8% (n=31/242) para *Babesia bovis* e 53,7% (n=130/242) para *Anaplasma marginale*, estando ou não co-infectados. 4,5% (n=11/242) dos animais estavam infectados apenas para *T. vivax*, 1,6% (n=4/242) estavam infectados apenas para *B. bigemina*, 26,8% (n=65/242) estavam infectados apenas para *A. marginale* e não houve infecção única para *B. bovis*, conforme observado na Tabela 11.

Ao avaliarmos a frequência de co-infecção dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina com o *T. vivax* (Tabela 11) foi possível observar que a co-infecção de *T. vivax* e *B. bigemina* apresentou 0,8% (n=2/242), de *T. vivax* e *A. marginale* foi de 8,3% (n=20/242) e não houve co-infecção de *T. vivax* e *B. bovis* apenas (Tabela 11).

Na análise de tripla infecção, a frequência de animais positivos para *T. vivax*, *B. bigemina* e *A. marginale* foi de 1,2% (n=3/242) e de *T. vivax*, *B. bovis* e *A. marginale* foi de 4,5% (n=11/242), porém não houve casos de co-infecção por *T. vivax* e as duas espécies de babesias concomitantemente. Os quatro agentes etiológicos foram diagnosticados molecularmente em apenas um bovino (Tabela 11).

A frequência de animais não infectados para nenhum dos agentes testados em PCR convencional foi de 38,0% (n=92/242).

Estes quatro agentes foram encontrados nas 5 cidades estudadas, causando infecções isoladas ou múltiplas, porém apenas em Santo Antônio de Pádua foi diagnosticado a presença concomitante dos quatro agentes em um bovino. Além disso, também é possível observar que *A. marginale* foi o agente de maior frequência entre os animais (26,8%) causando infecção isoladamente seguido de *T. vivax* (4,5%).

Tabela 2. Frequência de bovinos infectados e não infectados por *Trypanosoma vivax* e os agentes da Tristeza Parasitária Bovina por PCR convencional (n=242).

N de animais infectados/ total de amostras (%)		
	N	(%)
<i>T. vivax</i> (Tv)	11	4,5
<i>B. bigemina</i> (Bbi)	4	1,6
<i>B. bovis</i> (Bbo)	0	0
<i>A. marginale</i> (Am)	65	26,8
Tv/ Bbi	2	0,8
Tv/ Bbo	0	0
Tv/ Am	20	8,3
Tv/ Bbi/ Am	3	1,2
Tv/ Bbi/ Bbo	0	0
Tv/ Bbo/ Am	11	4,5
Tv/ Bbi/ Bbo/ Am	1	0,4
Negativo	92	38

Tv, *Trypanosoma vivax*; Bbi, *Babesia bigemina*; Bbo, *Babesia bovis*; Am, *Anaplasma marginale*.

Antes disso, em análise preliminar foi possível observar conforme Tabela 12, que a GGT esteve alterada em 82,6% (n=200/242) dos animais deste estudo, comparando com a literatura, seguida de ALB com 65,2% (n=158/242) dos animais apresentando alteração, PTS com 63,6% (n=154/242) e LDH com 61,1% (n=148/242). As duas enzimas com menor frequência de alteração entre os bovinos foi FAL com 2,5% (n=6/242) e ALT com 9% (n=22/242). Com relação a FAL, dos animais que apresentaram alteração nesta enzima, todos foram considerados negativos para *T. vivax*, *B. bigemina* e *B. bovis*.

Tabela 3. Frequência de alterações bioquímicas nos bovinos deste estudo (n=242).

Frequência de alterações bioquímicas em bovinos		
	N	(%)
Albumina	158	65,2
Fosfatase alcalina	6	2,5
Alanina aminotransferase	22	9
Aspartato aminotransferase	124	51,2
Bilirrubina direta	46	19
Bilirrubina total	122	50,4
Creatinina	79	32,6
Gama glutamiltransferase	200	82,6
Lactato desidrogenase	148	61,1
Proteína Total do Soro	154	63,6

Como apenas 10 amostras foram positivas exclusivamente para *T. vivax* (animais infectados) foi utilizado o teste Exato de Fisher ($p < 0,25$) na análise de frequência em detrimento das variáveis bioquímicas (n da tabela de contingência sempre menor ou igual a 5). A escolha do p -valor menos rigoroso ocorreu para observar a tendência dos dados. Além disso, utilizamos 92 amostras negativas (não infectadas) para *T. vivax* e para os agentes considerados diagnósticos diferenciais neste estudo (*B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*).

Diante de todas as análises abaixo, observamos que as dosagens bioquímicas de bilirrubina direta, gama glutamiltransferase, lactate desidrogenase e uréia foram significativamente diferentes pelo método Exato de Fisher ($p < 0,25$) quando comparamos bovinos infectados e não infectados para *T. vivax*. Ou seja, a frequência de bovinos positivos para *T. vivax* que apresentaram alteração nestas enzimas foi considerado estatisticamente maior do que animais com alteração nestas enzimas no grupo de animais negativos para os hemoparasitos de bovinos testados.

As 10 variáveis intrínsecas, análises bioquímicas, foram incluídas no modelo de regressão logística (Albumina, AST, Bilirrubina Total, Bilirrubina Direta, Creatinina, GGT, LDH, PTSreduzida, PTSaumentada e Uréia), já que FAL e ALT não apresentaram positividade para *T. vivax* associada à alteração na concentração enzimática (Tabela 5).

Tabela 4. Análise bivariada e multivariada dos parâmetros bioquímicos e sua associação com a positividade para *Trypanosoma vivax* nos bovinos através da técnica da PCR

Alterações bioquímicas	PCR <i>T. vivax</i> (<i>catl</i>)		Bivariada		Multivariada	
	N	Positivos (%)	P	P	OR	IC 95%
Albumina						
Não	5	13,89	-	-	-	-
Sim	5	8,93	0,3667	0,1144	0,2237	(0,0348-1,4354)
Fosfatase alcalina						
Não	10	100	-	-	-	-
Sim	0	0	-	-	-	-
Alanina aminotransferase						
Não	10	100	-	-	-	-
Sim	0	0	-	-	-	-
Aspartato aminotransferase						
Não	9	11,39	-	-	-	-
Sim	1	7,69	0,5874	0,8070	0,7170	(0,0497-10,3391)
Bilirrubina direta						

Não	6	7,69	-	-	-	-
Sim	4	28,57	0,0726*	0,1476	6,9711	(0,5032-96,5712)
Bilirrubina total						
Não	5	11,11	-	-	-	-
Sim	5	10,54	0,6041	0,1421	0,1674	(0,0154-1,8204)
Creatinina						
Não	7	11,48	-	-	-	-
Sim	3	9,68	0,5591	0,6034	1,6553	(0,2472-11,0839)
Gama glutamiltransferase						
Não	3	20	-	-	-	-
Sim	7	9,09	0,2460*	0,3349	0,4303	(0,0775-2,3886)
Lactato desidrogenase						
Não	2	4,35	-	-	-	-
Sim	8	17,39	0,0682*	0,0396*	7,4809	(1,1004-50,8565)
PTS reduzida						
Não	7	13,46	-	-	-	-
Sim	3	7,50	0,3200	0,4859	0,5419	(0,0476-4,0704)
PTS aumentada						
Não	8	10,81	-	-	-	-
Sim	2	11,11	0,6010	0,4695	0,4400	(0,967-3,0358)
Uréia						
Não	5	7,35	-	-	-	-
Sim	5	20	0,1242*	0,4210	2,1499	(0,3332-13,8707)

N: Número de animais; (%): Percentual de positivos; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança; PCR: Reação em Cadeia Polimerase; PTS: Proteína Total do Soro; *valores significativos

Ao aplicarmos o modelo de Regressão Logística Multivariada (RLM), no software R Studio®, utilizando todas as variáveis, obtivemos apenas a LDH com alteração significativa no grupo de animais positivos para *T. vivax* em detrimento dos negativos ($p=0,0396$). Animais com LDH aumentada apresentam 7,48 vezes mais chances de testarem positivos para *T. vivax* do que os animais com LDH normal ou reduzido (OR=7,48; $p<0,05$; IC=1,1004-50,8565).

5 DISCUSSÃO

No estado do Rio de Janeiro, a tripanossomose animal apresenta baixa endemicidade, uma vez que o primeiro relato data de aproximadamente 2016 por Costa et al., fato corroborado neste estudo, que ocorreu de 2016 à 2018, onde observamos uma frequência de 20.6% de *T. vivax* nos cinco municípios estudados. Esta baixa endemicidade pode ter garantido a frequência observada, porém, onde ocorre entrada de *T. vivax* no rebanho hígido, normalmente há o desenvolvimento de diversos sinais clínicos e óbito, tanto na pecuária leiteira quanto na de corte, causando prejuízo econômico não só pela redução na produção e mortalidade de animais mas também pelo custo no tratamento e prevenção (PAOLETTA et al., 2017).

As alterações bioquímicas estão diretamente relacionadas ao grau de infecção e evolução da doença, devido a inflamação tecidual que este protozoário causa (MOTT et al., 2011; BAKARI et al., 2017), o que nos permite traçar um perfil bioquímico dos animais infectados e entender o desenvolvimento da tripanossomose no estado do Rio de Janeiro. Para isso, comparamos as alterações bioquímicas de animais naturalmente infectados apenas para *T. vivax* com as alterações de animais sem nenhuma infecção, já que segundo Bakari et al. (2017), os hemoparasitos podem causar alterações teciduais e consequente mente bioquímicas, por isso neste estudo elegemos os agentes da Tristeza Parasitária Bovina como diagnóstico diferencial do *T. vivax*.

A coleta de sangue dos bovinos foi realizada em municípios com suspeita de surtos por *T. vivax*, o que nos garantiria a presença de alterações bioquímicas em animais diagnosticados molecularmente como positivos para este agente.

A prevalência de *A. marginale* (53.7%) foi muito superior a observada para *T. vivax* (20.6%), *Babesia bovis* (12.8%) e *Babesia bigemina* (8.3%), resultado bem semelhante ao obtido por Amorim et al. (2014) que observou uma frequência de 63.1% para *A. marginale*. Além disso, a co-infecção de *T. vivax* com *A. marginale* foi a que se apresentou mais alta (8.3%) seguida da infecção tripla de *T. vivax*, *B. bovis* e *A. marginale* (4.5%).

Na análise preliminar da frequência de animais testados com alterações bioquímicas, foi possível observar que a GGT foi o exame que apresentou maior número de animais com alteração (% , n=200/242), seguido de albumina (% , n=158/242), proteína total do soro (% , n=154/242) e LDH (% , n=148/242). Se as alterações enzimáticas estão relacionadas à lesões celulares podemos prever que podem estar ocorrendo danos teciduais e celulares provocados

por agentes que alteram a permeabilidade da membrana liberando as enzimas que estariam no citosol ou organelas celulares para o fluido extracelular (OBALEYE et al., 2007). Porém, no caso do GGT, segundo Fidelis Jr e colaboradores (2016), esta enzima tem flutuação e normalmente é observada aumentada em ruminantes.

A alteração da albumina em bovinos pode estar relacionada à alterações hepáticas por motivos variados, levando a hipoalbuminemia. Já a hiperalbuminemia em bovinos, associado a hiperproteinemia, pode estar relacionada a casos de desidratação ou ingestão aumentada de proteína. A hiperproteinemia ainda pode ter origem de uma hipergamaglobulinemia, devido ao aumento expressivo de imunoglobulinas, durante processo infeccioso (KANEKO et al., 2008).

A LDH aumentada observada com relativa frequência nos bovinos deste estudo pode ter origem hepática ou muscular, já que esta enzima apresenta cinco isoenzimas (ALMEIDA et al., 2010). Porém, sabe-se que na fase crônica da tripanossomose animal, a caquexia com degradação das células musculares e/ ou a necrose dos miócitos (BALDISSERA et al., 2015), podem liberar LDH muscular, que irá aumentar na circulação sanguínea.

Como houve uma tendência ao aumento de bilirrubina direta, GGT e LDH em animais positivos no teste Exato de Fisher, podemos supor que estas alterações são consequência de danos celulares de fígado e musculatura cardíaca e esquelética. Estas alterações poderiam ser comprovadas de forma mais rigorosa com o aumento do N amostral e/ou escolha de outras dosagens bioquímicas como a enzima creatina fosfoquinase (CK).

No modelo de Regressão Logística Multivariada foi possível observar que o aumento do LDH foi mais significativo do que as demais análises bioquímicas, fato este que já foi observado em infecções experimentais por *Trypanosoma cruzi* e *T. evansi* em camundongos. Sabe-se que esta alteração em animais infectados por *T. cruzi* ocorrem principalmente pelo histotropismo que o agente da Doenças de Chagas, na fase aguda, apresenta por musculatura cardíaca e esquelética, e por macrófagos de baço e fígado, onde o povoamento e/ ou multiplicação do parasito nestes órgãos leva a lise celular e necrose tecidual com liberação da LDH para a circulação sanguínea (CANO et al., 2000).

Na infecção experimental por *T. evansi* (BALDISSERA et al., 2015), a elevação de LDH foi observada concomitantemente à necrose miocárdica. Sabendo-se que as formas tripomastigotas deste hemoparasito ao circular pelos vasos sanguíneos do coração do hospedeiro vertebradopode provocar lesões degenerativas do miocárdio, levando ao dano

mitocondrial com depleção de ATP e conseqüentemente, morte celular por desenergização (HILALI et al., 2006).

Portanto, como não há comprovação científica que o *T. vivax* apresenta histotropismo como ocorre com o *T. cruzi*, mas sim circula livremente na forma tripomastigota por diversos vasos sanguíneos e espaço intersticial, como ocorre com o *T. evansi*, acreditamos que o mecanismo fisiopatogênico seja semelhante entre estas duas espécies. Logo, o aumento de LDH observado neste estudo e por Fidelis Jr et al. (2016) está diretamente relacionado a necrose tecidual oriunda de dano mecânico que o flagelo livre da forma tripomastigota ocasiona na superfície das células do miocárdio e outras células (hemácias, células endoteliais, fagócitos), marcando estas células, e causando alterações bioquímicas e antigênicas, induzindo assim a fagocitose delas (BOADA-SUCRE et al., 2016). Ou ainda, no caso de tecidos musculares, ocorre a autólise dos miócitos com necrose e infiltrado inflamatório (BALDISSERA et al., 2015). Este estudo, difere do encontrado por Almeida et al. (2010) que observaram uma redução dos valores de LDH e CK nos ovinos infectados experimentalmente com *T. vivax*.

Como não há nenhuma publicação comprovando a elevação de LDH associada a lesão muscular em bovinos infectados naturalmente por *T. vivax*, mesmo que Fidelis Jr e colaboradores tenham encontrado resultado elevado como neste estudo, a concentração de CK dos referidos autores foi reduzida, fato anunciado por eles devido ao tempo de congelamento das amostras. Portanto, seria fundamental a análise da enzima creatina fosfoquinase (CK) neste estudo, para que possamos definir se a elevação de LDH corresponde realmente a lesão muscular ocasionada por trauma mecânico das formas tripomastigotas de *T. vivax* nos bovinos no estado do Rio de Janeiro, uma vez que a análise multivariada afirma que os bovinos com LDH aumentado neste estudo, tem aproximadamente sete vezes mais chance de estarem positivos em PCR para *T. vivax*.

6 CONCLUSÃO

Apesar da baixa frequência de animais positivos exclusivamente para *T. vivax* no presente estudo, é possível observar que estes animais tem uma tendência de aumento da bilirrubina direta, gama glutamiltransferase, lactato desidrogenase e uréia.

A elevação da lactato desidrogenase é a alteração bioquímica comprovadamente significativa e com maior chance de ser encontrada em bovinos infectados por *T. vivax* no estado do Rio de Janeiro.

Este foi o primeiro estudo a traçar um perfil bioquímico dos animais infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K.S., FREITAS, F.L.C., TEBALDI, J.H., ALESSI, A.C., MACHADO, R.Z., NASCIMENTO, A.A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 3, p. 669-676, jul./set. 2010.

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007.

BAKARI, S.M., OFORI, J.A., KUSI, K.A., ANING, G.K., AWANDARE, G.A., CARRINGTON, M., GWIRA, T.M. Serum biochemical parameters and cytokine profiles associated with natural African trypanosome infections in cattle. **Parasit Vectors.**, 27;10(1):312. Jun, 2017.

BALDISSERA, M.D., RECH, V.C., GRINGS, M., KOLLING, J., DA SILVA, A.S., GRESSLER, L.T., SOUZA, C.F., VAUCHER, R.A., SCHWERTZ, C.I., RICARDO E. MENDES, R.E., LEIPNITZ, G., WYSE, A.T.S., STEFANI, L.M., MONTEIRO, S. G. Relationship between pathological findings and enzymes of the energy metabolism in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Parasitology International**, 64(6): 547–552. 2015. doi:10.1016/j.parint.2015.07.010.

BARRETT, M.P., TETAUD, E., SEYFANG, A., BRINGAUD, F., BALTZ, T. Trypanosome glucose transporters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, 91(1):195-205, mar. 1998.

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

BATISTA, J.S., BEZERRA, F.S.B., LIRA, R.A., CARVALHO, J.R.G., NETO, A.M.R., PETRI, A.A., TEXEIRA, M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, 28: 63-69, 2008.

BATISTA, J.S., CORREA, F.R., BARBOSA, R.C., GUERRA, J.L. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in sheep. **Pesqui Vet Bras**, 26:31–37. 2006.

BATISTA, J.S., RIET-CORREA, F., TEIXEIRA, M.M., MADRUGA, C.R., SIMÕES, S.D., MAIA, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet Parasitol**, 143(2):174-181, 2007.

BATISTA, J.S., RODRIGUES, C.M., GARCÍA, H.A., BEZERRA, F.S.B., OLINDA, R.G., TEIXEIRA, M.M.G., SOTO-BLANCO, B. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Vet. Res.**, 42, 63 (2011). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-63>.

BIOESTAT 5.0. Download de Arquivos. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&orde>

r=0.

BOADA-SUCRE, A.A., SPADAFORA, M.S.R, TAVARES-MARQUES, L.M., FINOL, H.J., REYNA-BELLO, A. *Trypanosoma vivax* Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep. **Pathology Research International**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4503214>.

BOCK, R., JACKSON, L., VOS, A., JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129, Supl.51, S247-S269, 2004.

CADIOLI, F.A., FIDELIS JUNIOR, O.L., SAMPAIO, P.H., DOS SANTOS, G.N., ANDRÉ, M.R., ALMEIDA, K.J.G., MACHADO, R.Z. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, 214: 174–177. 2015.

CANO, R.C., HLIBA, E., RUBIOLO, E.R. Creatine kinase and lactate dehydrogenase levels as potential indicators of *Trypanosoma cruzi* infectivity and histotropism in experimental Chagas' disease. **Parasitology Research**, 86(3), 244–252. 2000. doi:10.1007/s004360050038.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 566p.1984.

CONNOR, R.J. **The diagnosis treatment and prevention of animal trypanosomiasis under field conditions**. FAO Anim. Prod. Health Pap., 100: 1-35. 1992.

CORTEZ, A.P, RODRIGUES, A.C., GARCIA, H.A., NEVES, L., BATISTA, J.S., BENGALY, Z., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. **Mol Cell Probes**, 23(1):44-51. Feb, 2009.

COSTA, R.V.C.; ABREU, A.P.M.; MACHADO, M.N.; THOMÉ, S.M.G.; MASSARD, C.L.; SANTOS, H.A.; UBIALI, D.G.; BRITO, M.F. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. **IX Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário. Pesquisa Veterinária Brasileira** 36(Supl.). Salvador, BA, 20 de outubro de 2016a.

CUGLOVICI, D.A., BARTHOLOMEU, D.C., REIS-CUNHA, J.L., CARVALHO, A.U., CARVALHO, A.U., RIBEIRO, M.F.B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairycattle herd in Minas Gerais state, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 169 (3–4), 320–326. 2010.

DAGNACHEW, S., BEZIE, M., TEREFE, G., ABEBE, G., BARRY, J.D., GODDEERIS, B.M. Comparative clinico-haematological analysis in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Etiópia. **Acta Vet.Scand.**, 57, 24. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0114-2>.

DAGNACHEW, S., BEZIE, M., TEREFE, G., ABEBE, G., BARRY, J.D., GODDEERIS, B.M. Comparative biochemical changes in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from tsetse infested and non-tsetse infested areas of northwest Etiópia. **Veterinary Parasitology**, 205(3–4): 451-459. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.031>.

DÁVILA, A.M.R., RAMIREZ, L., SILVA, R.A.M.S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brasil and Bolivia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92: 357-358. 1997.

Desenvolvimento de gado e gado tripanotolerante da FAO em agricultores e compradores da África Ocidental? Evidências da África Ocidental. **Ecol. Econ.**, 45 (3): 461 - 472. 1987.

- EGBE-NWIYII, T.N., GBOKWEP, O., ONYEYIL, A. Diminazene Aceturate Resistance on the Virulence of *Trypanosoma brucei* for Rats. *Journal of Comparative Pathology*, 133 (4): 286-288. Nov. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.002>.
- FIDELIS JR, O.L., SAMPAIO, P.H., MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R., CADIOLI, F.A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, 25 (1): 69-81, jan.-mar., 2016.
- GIORDANI, F., MORRISON, L.J., ROWAN, T.G., KONING, H.P., BARRETT, M.P. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, 143 (14): 1862-1889. December 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>.
- GU, Y., GETTINBY, G., MCKENDRICK, I., MURRAY, M., PEREGRINE, A.S., REVIE, C. Development of a decision support system for trypanocidal drug control of bovine trypanosomosis in Africa. **Veterinary Parasitology**, 87, 9--23.1999.
- GUEDES JUNIOR, D.S., ARAÚJO, F.R., SILVA, F.J.M., RANGEL, C.P., BARBOSA NETO, J.D., FONSECA, A.H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 17 (2): 105-109. 2008.
- GUEGAN, F., PLAZOLLES, N., BALTZ, T., COUSTOU, V. Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Celular Microbiology**, 15 (8). Aug. 2013.
- HILALI, M., ABDEL-GAWAD, A., NASSAR, A., ABDEL-WAHAB, A. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, 139(1-3): 237–243. 2006. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.013.
- HURTADO, O.J.B., CASTRO, P.D.J., GIRALDO-RÍOS, C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Veterinary Parasitology**, 229 (15): 54-59. October 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.017>.
- JIALAL, I., SOKOLL, L.J. Clinical utility of lactate dehydrogenase: a historical perspective. **Am. J. Clin. Pathol.**, 143(2):158-9.2015.doi: 10.1309/AJCTP0FC8QFYDFA.
- JONES, T.W., DÁVILA, A.M. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitol.**, 17: 99-101, 2001.
- KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Academic Press, San Diego. 916p.2008.
- KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 4 (21): 177-179, 2001.
- KOCAN, K.M., FUENTE, J., GUGLIELMONE, A.A., MELENDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4): 698-712, 2003.
- KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33:1870-1874. 2016.
- LINHARES, G.F.C., DIAS FILHO, F.C., FERNANDES, P.R., DUARTE, S.C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso.

Ciênc. Anim. Bras., 7(4):455-460.2006.

LINHARES, G.F.C., SANTANA, A.P., LAUEMAN, L.H., MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciênc. Anim. Bras.**,3:27-32.2002.

MARTELLI, A. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. **Rev. Med. Minas Gerais**, 22(2): 216-220. 2012.

MORAIS, M.G.; RANGEL, J.M.; MADUREIRA, J.S.,SILVEIRA, A.C. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneloradas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 52, p.98-104, 2000.

MOTT, G.A., WILSON, R., FERNANDO, A., ROBINSON, A., MACGREGOR, P., KENNEDY, D., Schaap, D., MATTHEWS, J.B., MATTHEWS, K.R. Targeting cattle-borne zoonoses and cattle pathogens using a novel trypanosomatid-based delivery system. **PLoS Pathog.**, 7:10. 2011.

MOURA, D.M., PANETO, J.C.C., BITTAR, E.R., BITTAR, J.F.F. Perfil bioquímico de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria 642.

OBALLEYE, J.A., AKINREMI, C.A., BALOGUN, E.A., ADEBAYO, J.O. Toxicological studies and antimicrobial properties of some Iron (III) complexes of Ciprofloxacin. **Afr. J. Biotech.**, 6 (24): 2826-2832. 2007.

ORHUE, N.E.J., NWANZE, E.A.C., AKAFOR, A. Serum total protein, albumin and globulin levels in *Trypanosoma brucei*-infected rabbits: Effect of orally administered *Scoparia dulcis*. **African Journal of Biotechnology**, 4 (10). 2005.

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

PAOLETTA, M.S., LÓPEZ ARIAS, L., DE LA FOURNIÈRE, S., GUILLEMI, E.C., LUCIANI, C., SARMIENTO, N.F., MOSQUEDA, J., FARBER, M.D., WILKOWSKY, S.E. Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks Tick Borne Dis.*, 9(2):155-163. Feb., 2018.

PEREGRINE, A.S., MAMMAN, M. Pharmacology of Dimmenazene: a Review. **Acta Tropica**, 54, p.185-203, 1993.

PEREIRA, H.D., SIMÕES, S.V.D., SOUZA, F.A.L., SILVEIRA, J.A.G., RIBEIRO, M.F.B., CADIOLI, F.A., SAMPAIO, P.H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(5), 896-901.2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5303>.

PEREIRA, H.D., SIMÕES, S.V.D., SOUZA, F.A.L., SILVEIRA, J.A.G., RIBEIRO, M.F.B., CADIOLI, F.A., SAMPAIO, P.H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(5), 896-901.2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5303>.

PINCUS, M.R., SCHAFFNER, J.A. Avaliação da função hepática. *In*: HENRY, J.B. (Ed.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19.ed. São Paulo : Manole, p.253-267.1999.

SCHENK, M.A.M., MENDONÇA, C.L., MADRUGA, C.R., KOHAYAGAWA, A., ARAÚJO, F.R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 21(4), 157-161.2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400006>.

SILVA, A.S., COSTA, M.M., POLENZ, M.F., POLENZ, C.H., TEIXEIRA, M.M.G., LOPES, S.T.A., MONTEIRO, S.G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 39(8): 2550-2554. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000189>.

SOUZA, R.M., BIRGEL JUNIOR, E.H., AYRES, M.C.C., BIRGEL, E.H. Influência dos fatores raciais na função hepática de bovinos da raça Holandesa e Jersey. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 41:306-312. 2004.

Standardized techniques for the diagnosis of tsetse transmitted trypanosomiasis. OIE Terrestrial Manual, OIE, Rome, Itália, p. 49. 2013.

STEVENSON, P.; SONES, K. R.; GICHERU, MWANGI, E. K. Comparison of isometamidium chloride and homidium bromide as prophylactic drugs for trypanosomiasis in cattle at Nguruman, Quênia. **Acta Tropica**, Basel, 59: 77- 84, 1995.

TORIONI, D.E., ECHAIDE, S., KNOWLES, D.P., MCGUIRE, T.C. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.**, 36:777-782.1998.

VIEIRA, M.I.B., LEITE, R.C., SACCO, A.M.S., SILVA, J.G.C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e influência na estabilidade enzoótica da babesiose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12 (4): 139-144, 2003.

ZAMBRANO-VILLA, S., ROSALES-BORJAS, D., CARRERO, J.C., ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends Parasitol.**, 18: 272-278. 2002.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo possibilitou a descrição da primeira caracterização molecular de *T. vivax* e *T. theileri* no estado do Rio de Janeiro, bem como o primeiro relato da linhagem IB e IF de *T. theileri* baseado no gene *catl*. Além disso, este também foi o primeiro relato de análise bioquímica dos animais infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro.

Faz-se necessário a complementação deste estudo, principalmente com a dosagem da enzima creatina fosfoquinase (CK), para comprovação da origem do dano celular que as formas tripomastigotas de *T. vivax* ocasionaram nos tecidos dos bovinos infectados, já que apenas a elevação significativa de LDH não confirma a origem do extravasamento desta enzima.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____
propriedade: _____ telefone: _____, recebi explicações sobre o projeto “**Tripanossomose por *Trypanosoma (Duttonella) vivax* em bovinos no Estado do Rio de Janeiro: estudo clínico, patológico e epidemiológico**” do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e o projeto “**Análise filogenética, de virulência e de variabilidade de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio de Janeiro**” do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, autorizo a coleta de sangue total dos bovinos da propriedade, estando ciente que minha identidade será preservada e que não haverá danos aos animais decorrentes da coleta do material, e que estes procedimentos também não resultarão em custos.

Em ____ / ____ / _____

Assinatura: _____

Anexo II – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Trypanosoma vivax em bovinos no Estado do Rio de Janeiro", protocolada sob o CEUA nº 5931200217 *in vacuo*, sob a responsabilidade de **Marilene de Farias Brito Queiroz** e equipe; Ana Paula Martínez de Abreu; Renata Vitória Costa; Sandra Maria Gomes Thomé; Carlos Luiz Massard; Daniel Guimarães Ubial; Huanrisson Azevedo Santos - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 18/10/2018.

We certify that the proposal "Trypanosoma vivax in bovines in the State of Rio de Janeiro", utilizing 384 Bovines (males and females), protocol number CEUA 5931200217 *in vacuo*, under the responsibility of **Marilene de Farias Brito Queiroz** and team; Ana Paula Martínez de Abreu; Renata Vitória Costa; Sandra Maria Gomes Thomé; Carlos Luiz Massard; Daniel Guimarães Ubial; Huanrisson Azevedo Santos - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018 a 12/2018**

Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 80 meses**

N: **384**

Linhagem: **Girlanda, Mestiços, e Holandeses**

Peso: **50 a 700 kg**

Local do experimento: propriedades rurais do Estado do Rio de Janeiro, com focos de infecção pelo Trypanosoma vivax

Seropédica, 11 de setembro de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO III – Planilha dos dados utilizados na análise estatística

N	<i>T. vivax</i>	ALB	ALT	AST	BILDIR	BILTOT	CRE	GGT	LDH	PTN	UR
41	0	2.0	51	487	0.55	1.6	1.5	21	2741	6.3	56
43	1	3.2	12	52	0.17	0.4	2.0	31	982	6.9	38
44	0	3.6	20	88	0.2	0.4	1.6	26	402	7.3	41
50	0	3.3	20	61	0.22	0.4	1.1	30	966	6.7	34
53	0	2.5	15	53	0.15	0.3	1.3	21	869	5.7	19
58	0	3.3	16	79	0.19	0.4	1.3	22	1215	6.4	41
62	0	3.7	20	90	0.73	1.7	2.1	22	439	7.7	12
63	0	3.6	15	55	0.39	0.9	1.5	33	1184	8.5	31
64	0	3.9	18	77	0.16	0.3	1.3	32	374	7.1	17
65	0	3.2	18	69	0.16	0.4	1.3	21	1123	5.5	17
66	0	3.2	16	61	0.32	0.7	1.6	20	915	6.9	29
67	0	2.7	15	95	0.24	0.4	1.1	20	873	8.0	23
70	0	3.2	22	101	0.4	0.9	1.3	27	1059	6.3	29
71	0	2.5	21	84	0.15	0.3	0.9	22	512	6.3	26
73	1	3.1	13	51	0.24	0.5	1.3	16	928	5.9	36
74	0	2.4	13	80	0.19	0.5	1.5	22	894	5.9	36
88	0	2.2	10	72	0.37	0.9	0.9	19	701	8.5	37
97	0	3.6	24	87	0.26	0.6	1.1	29	386	6.8	44
102	0	3.3	10	44	0.17	0.3	1.2	18	1340	7.2	30
111	0	3.7	20	67	0.17	0.4	1.1	23	2110	7.1	27
119	1	2.2	12	97	0.27	0.6	1.1	23	2190	7.3	19
122	0	3.4	21	91	0.26	0.6	1.1	28	2420	7.2	32
123	0	3.1	14	79	0.34	0.7	1.0	28	1940	6.4	24
130	0	3.1	12	64	0.2	0.4	1.1	32	1375	8.0	28
132	0	2.4	45	66	0.14	0.3	0.9	29	1985	8.1	22
133	0	4.1	25	101	0.5	1.0	1.6	37	2195	7.9	46
144	0	3.2	21	117	0.3	0.9	1.1	44	4310	7.4	29
145	0	2.7	66	86	0.23	0.5	1.5	32	455	6.3	63
150	0	2.0	11	46	0.3	0.7	1.0	18	796	5.6	28
151	0	2.1	15	75	0.17	0.4	1.0	19	1800	5.6	33
157	0	2.4	17	73	0.16	0.3	1.3	18	1585	5.3	40
159	0	2.4	11	52	0.39	1.0	0.7	33	1585	6.2	30
160	1	2.3	16	100	0.26	0.5	0.9	19	2075	5.3	29
169	0	1.8	14	100	0.3	0.8	0.7	148	3970	5.4	29
172	0	2.5	16	52	0.23	0.5	1.0	34	2350	5.8	21
173	0	2.3	15	73	0.28	0.6	1.3	38	2755	7.4	30
174	0	2.7	15	59	0.24	0.5	1.2	25	2590	8.5	26
175	0	2.3	24	83	0.31	0.7	1.2	27	2870	7.2	19
177	0	2.9	18	80	0.42	1.0	1.1	23	3260	6.5	28
178	0	3.0	20	79	0.18	0.4	1.4	20	3070	7.1	33
179	0	1.8	10	45	0.18	0.2	0.9	17	1000	6.9	19
183	0	2.7	16	53	0.24	0.5	1.1	15	3180	5.9	29
185	0	3.3	15	135	0.34	0.8	1.5	24	325	6.4	44
185	0	2.1	25	92	0.17	0.3	1.2	24	3100	5.8	23
190	0	3.2	26	92	0.82	2.0	1.4	15	586	7.0	30
191	0	2.6	19	92	0.33	0.7	1.1	16	1875	8.2	36
192	0	2.9	16	50	0.13	0.3	1.2	30	2615	6.9	24
193	0	2.8	14	59	0.18	0.4	1.2	25	2185	7.5	33

194	0	3.2	19	54	0.27	0.7	1.2	17	2690	6.8	26
196	0	1.9	9	76	0.11	0.3	0.7	29	1825	6.3	23
197	1	2.3	17	89	0.19	0.4	1.2	15	1380	7.1	33
200	0	2.9	18	92	0.26	0.6	1.2	67	2445	7.1	21
201	0	3.0	20	71	0.17	0.4	1.4	19	1180	6.3	33
202	0	3.3	26	115	0.5	1.2	1.4	3	1800	8.0	35
206	0	3.6	20	129	0.28	0.7	1.1	42	230	8.4	42
208	0	3.2	13	48	0.28	0.3	1.2	36	1008	6.1	45
215	0	3.0	12	79	0.29	0.5	1.2	26	1230	5.9	49
217	0	2.4	16	218	0.21	0.6	1.6	78	630	6.2	37
218	0	2.0	12	136	0.1	0.3	0.8	156	574	5.5	23
220	0	3.1	21	210	0.15	0.3	0.8	45	970	7.4	24
221	0	3.8	20	81	0.16	0.3	1.1	27	972	7.4	38
222	0	3.8	24	80	0.19	0.4	1.7	23	986	6.9	42
223	0	3.1	13	101	0.11	0.2	0.9	24	1004	6.9	33
225	0	2.9	29	178	0.49	1.4	2.6	24	4797	6.8	40
236	0	2.7	26	80	0.31	0.7	1.2	17	2370	7.0	36
240	0	3.4	29	110	0.7	1.8	1.1	16	2170	7.5	11
242	0	1.8	14	89	0.14	0.2	0.4	19	2215	5.3	11
244	0	2.8	34	102	0.31	0.6	1.2	22	2315	7.0	37
245	0	2.0	14	57	0.19	0.3	1.0	12	1845	5.2	7
246	1	3.2	40	127	2.66	6.9	1.0	14	1925	7.6	20
251	1	1.8	11	77	0.24	0.5	0.8	63	2550	7.8	21
253	1	2.1	16	143	0.45	1.2	0.7	50	3940	6.7	15
257	0	2.8	24	95	0.14	0.4	1.4	33	1782	7.2	11
264	0	1.8	17	52	0.42	0.7	1.0	31	3312	8.4	18
265	0	1.7	18	83	0.22	0.5	0.6	50	2979	5.6	28
268	0	2.1	17	84	0.33	0.7	1.1	17	966	6.4	14
273	0	2.0	10	93	0.15	0.4	0.7	22	1398	6.8	12
277	0	2.6	14	86	0.13	0.4	0.8	17	1395	6.2	12
279	0	2.9	23	123	0.6	1.7	1.1	25	1917	6.4	19
282	0	2.6	33	104	0.42	1.0	1.1	28	1503	6.9	11
286	0	2.5	29	87	0.52	1.1	1.2	19	1099	7.7	26
287	1	3.6	20	132	0.44	1.2	1.0	18	1512	6.4	27
295	0	2.7	28	113	0.48	1.2	1.2	30	1908	6.8	8
296	0	2.2	23	110	0.85	2.4	0.8	35	1260	7.9	10
297	0	2.1	20	115	0.27	0.6	0.7	22	1323	7.0	6
298	0	2.9	25	103	1.27	3.4	0.9	3	1287	6.7	19
300	0	1.6	13	89	0.51	0.8	0.5	54	1161	6.4	7
303	0	2.2	15	54	0.88	1.2	0.5	19	2002	4.4	28
305	0	2.6	10	84	0.45	0.7	0.5	30	1925	5.2	13
307	0	1.5	16	85	0.42	0.6	0.6	21	2178	5.1	13
308	0	2.2	18	106	0.55	1.00	0.8	103	1969	7.0	7
310	1	3.3	19	87	1.12	2.4	1.1	30	2200	7.5	9
351	0	2.3	11	54	0.34	0.3	0.7	34	1012	6.2	16
353	0	1.6	16	103	0.42	0.4	0.6	13	1540	5.2	17
356	0	1.4	17	195	0.33	0.3	0.9	54	3333	7.3	21
558	0	2.4	17	149	0.19	0.4	0.9	27	851	6.2	33
560	0	3.0	40	288	0.32	0.8	0.8	37	793	8.6	36
561	0	3.1	30	273	0.21	0.5	1.0	44	727	6.9	36
563	0	2.1	27	366	0.6	1.5	0.5	116	4869	5.2	23

564	0	3.6	30	179	0.32	0.8	0.9	45	815	7.8	39
565	0	3.2	30	228	0.14	0.4	0.7	29	3375	6.5	35
566	0	3.4	36	85	0.32	0.7	1.8	17	821	7.3	43