

# ASPECTOS HEMATOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma vivax* EM OVINOS

KATYANE DE SOUSA ALMEIDA,<sup>1</sup> FAGNER LUIZ DA COSTA FREITAS,<sup>2</sup> RENATA LEMOS NAGIB JORGE,<sup>3</sup> CLAUDIA APARECIDA DA SILVA NOGUEIRA,<sup>4</sup> ROSANGELA ZACARIAS MACHADO<sup>5</sup> E ADJAIR ANTONIO DO NASCIMENTO<sup>6</sup>

1. Doutora, professora da Universidade Federal do Tocantins. E-mail: katanefreitas@gmail.com (autora correspondente)

2. Mestre, professor da Universidade Federal do Tocantins

3. Farmacêutica, técnica da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

4. Bióloga, técnica da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

5. Doutora, professora da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

6. Doutor, professor da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

## RESUMO

A presente pesquisa avaliou as alterações hematológicas em ovinos infectados experimentalmente com uma amostra de *T. vivax* procedente do Estado da Paraíba. Utilizaram-se oito ovinos machos, sendo quatro destes para o grupo testemunho e quatro infectados com  $10^5$  tripomastigotas de *T. vivax*. Colheram-se amostras de sangue em dois tempos antes da infecção e posteriormente em dias determinados. Os parâmetros avaliados foram: contagem global de hemácias e de leucócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, transferrina e ferro. Os animais foram examinados, diariamente, por parasitemia. Para a análise

estatística, empregou-se o teste de Wilcoxon a 5% de probabilidade. Detectaram-se parasitos no sangue no 1º dia após infecção (DAI) e com parasitemia intermitente até o final do experimento, havendo um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) na contagem global de hemácias, no teor de hemoglobina, no hematócrito e no volume corpuscular médio; a anemia, no final da observação foi microcítica normocrômica. A transferrina aumentou e o ferro decresceu ao final do período experimental e observou-se, ainda, leucocitose, em virtude do aumento de linfócitos. A amostra de *T. vivax* procedente da Paraíba ocasionou relevantes alterações hematológicas, em ovelhas, caracterizada por anemia e leucocitose.

PALAVRAS-CHAVES: Hematologia, ovino, *Trypanosoma*.

## ABSTRACT

### HEMATOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL INFECTION BY *Trypanosoma vivax* IN SHEEP

The research evaluated the hematological alterations in sheep infected experimentally with *T. vivax* strain precedent of Paraíba State. Eight male sheep were used, four in the testimony group and four infected with  $10^5$  *T. vivax*. Blood samples were collected two times before infection and posterior to receiving on days designated. The evaluated parameters were: red blood cell count, total leucocytes, hemoglobin, hematocritic, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration,

transferrin and iron. The animals were examined daily by pasitemia. The statistical analysis was carried through using the Wilcoxon test of 5% of probability. The results were: parasites were detected in the blood on the first day after the infection of the intermittent parasite until the end of the experiment, there was a significant decrease in the red blood cell count, hemoglobin and in the hematocritic and in the average mean corpuscular volume, the anaemia, at the end of the observations, were microcitic, normochromic. The

transferrin that were high and iron decreased at the end of the experimental period and observed leucocytosis due to the lymphocytes. The *T. vivax* strain precedent of Paraíba

State occasioned relevant hematological alterations in sheep characterized for anaemia and elevation of leukocytes.

KEY WORKS: Haematologia, sheep, *Trypanosoma*.

## INTRODUÇÃO

As tripanossomíases podem ser causadas por um grande número de espécies de tripanossoma (LEVINE, 1973), entretanto, apenas um pequeno grupo é patogênico (GARDINER, 1989) dentre eles *T. vivax*, responsável por perdas na pecuária e por anemia severa nos animais.

As amostras de *T. vivax* de animais em diferentes regiões da África possuem variações na morfologia, no desenvolvimento e na patogenicidade (GARDINER, 1989). Também essas diferenças podem ser observadas no Brasil. SILVA et al. (1996), acompanhando um surto de tripanossomíase por *T. vivax* no Pantanal do Mato Grosso, sugeriram que *T. vivax* causaria perdas econômicas importantes em bovinos no Pantanal de Poconé. No entanto, em trabalhos posteriores (PAIVA et al., 2000b), a expectativa com relação à gravidade da tripanossomíase, no Brasil, não foi confirmada. O acompanhamento de rebanhos infectados demonstrou que, nas condições epidemiológicas do Pantanal, *T. vivax* não é patogênico e, embora alguns animais apresentem parasitemia elevada, não há apresentação clínica da doença.

Em 2004 (BATISTA et al., 2006), foi descrito um surto de tripanossomíase por *T. vivax* no Sertão da Paraíba, no qual adoeceram 64 bovinos adultos e morreram onze de um rebanho de 130 vacas leiteiras; entre os bezerros, adoeceram 27 e morreram cinco de um total de 100 animais.

Com isso, observa-se que o efeito da infecção por *T. vivax* varia com o hospedeiro, podendo estabelecer um equilíbrio com o parasito e permanecer clinicamente normal, por um longo período (RADOSTITS et al., 2000), e que a susceptibilidade dos animais a tripanossomíases está associada a vários fatores tais como idade do animal, amostra do *T. vivax* envolvida (SEKONI et al., 1990), má nutrição, infecções intercorrentes, prenhez, lactação e trabalho excessivo, com a

ressalva de que nutrição é o fator mais importante (KATUNGUKA-RWAKISHAYA et al., 1997).

Como o conhecimento sobre a amostra de *T. vivax* isolada da Paraíba é escassa, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade dessa amostra por meio do estudo das alterações hematológicas em ovinos infectados experimentalmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de *T. vivax* usada no experimento foi isolada de bovinos da região de Catolé do Rocha, PB, Nordeste do Brasil, e gentilmente cedida pela Universidade Federal da Paraíba. Inoculou-se essa amostra em um ovino, macho, sem raça definida, de um ano de idade, visando à replicação do agente utilizado na infecção dos animais do experimento. Para montagem do grupo experimental, empregaram-se oito ovinos machos, com um ano de idade e sem raça definida, que passaram por um período de quarentena para avaliações clínicas, incluindo a pesquisa de anticorpos para *T. vivax* pela reação de imunofluorescência indireta, além de exames hematológicos, bioquímicos e coprológicos.

Mantiveram-se os animais hígidos em baias individuais e alimentados com silagem de milho, água *ad libitum*, sendo suplementados com sal mineral, durante 120 dias. Dividiram-se os animais, aleatoriamente, em dois grupos, sendo quatro para o grupo testemunho (C1, C2, C3 e C4) e quatro para serem infectados (I1, I2, I3 e I4), por via intravenosa, com 1mL de sangue com aproximadamente  $10^5$  tripomastigotas de *T. vivax*.

A parasitemia foi examinada, diariamente, até os 120 DAI, obedecendo à metodologia descrita por BRENER (1961) e, para realização dos exames hematológicos, coletaram-se 3mL de sangue com ácido-etilenodiaminotetracético di-sódico a 10% (EDTA a 10%), aos quatorze e sete dias antes da infecção (usados para estabelecer os valores de referência, máximos e mínimos, para cada parâ-

metro avaliado), seguindo-se no 5°, 7°, 9°, 11°, 13°, 15°, 20°, 30°, 45°, 60°, 75°, 90°, 105° e 120° dia após a infecção (DAI). Procedeu-se à contagem global de hemácias e leucócitos, com contador automático de células, teor de hemoglobina pelo método colorimétrico e o hematócrito obtido por micro-hematócrito. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados conforme descritos por WINTROBE (1942). Efetuou-se a contagem diferencial dos leucócitos em esfregaços sangüíneos corados usando-se o corante de Rosenfeld. Colheu-se, ainda, sangue sem anticoagulante para separação do soro, para determinação do ferro sérico, pelo método colorimétrico, e da transferrina por eletroforese em gel de agarose.

Analisaram-se estatisticamente os dados obtidos pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade, baseadas em RIBEIRO JUNIOR (2001), utilizando-se o programa estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período pré-patente (PPP) foi de um dia no animal I4 e nos outros animais de dois dias; a

parasitemia foi intermitente e com variação de intensidade em todos os animais até os 120 DAI.

O hemograma dos animais infectados apresentou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem global de hemácias (Figura 1), no teor de hemoglobina (Figura 2), no hematócrito (Figura 3) e no volume corpuscular médio (VCM) (Figura 4), diferindo dos resultados do grupo testemunho, que permaneceram inalterados. Caracterizou-se inicialmente a anemia como microcítica normocrômica, passando para macrocítica por um período de tempo e, posteriormente, tornou-se microcítica, revelando um quadro de anemia crônica. Registrou-se, ainda, uma leucocitose caracterizada por linfocitose. Apesar de os animais infectados apresentarem uma recuperação nesses parâmetros, não conseguiram retomar seus valores iniciais e nem se equiparar aos testemunhos.

A transferrina apresentou uma queda inicial (5 DAI) nos animais infectados e um aumento fora dos valores de referência após os 30 DAI ( $p < 0,05$ ) (Figura 5), enquanto que o ferro sérico diminuiu após 20 DAI nos animais infectados e com valores abaixo da normalidade após 105 DAI ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

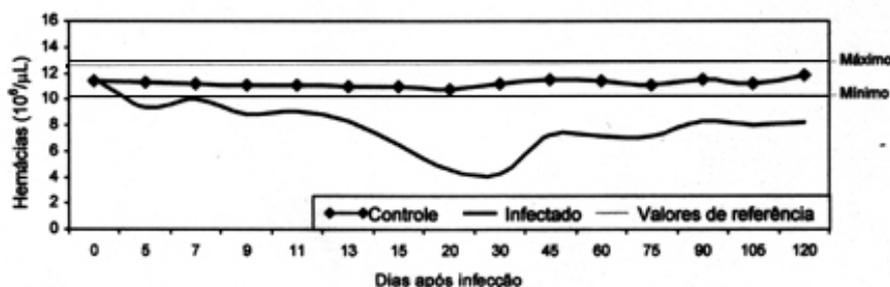


FIGURA 1. Valores médios da contagem global de hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ ) em ovinos, do grupo testemunho e do grupo experimentalmente infectado com *T. vivax*, durante o período experimental.

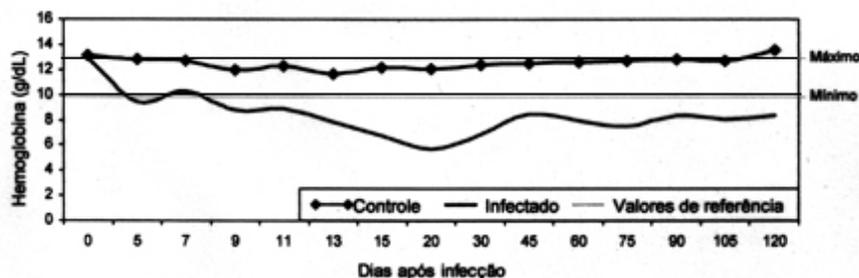


FIGURA 2. Valores médios do teor de hemoglobina (g/dL) em ovinos, do grupo testemunho e do grupo experimentalmente infectado com *T. vivax*, durante o período experimental.

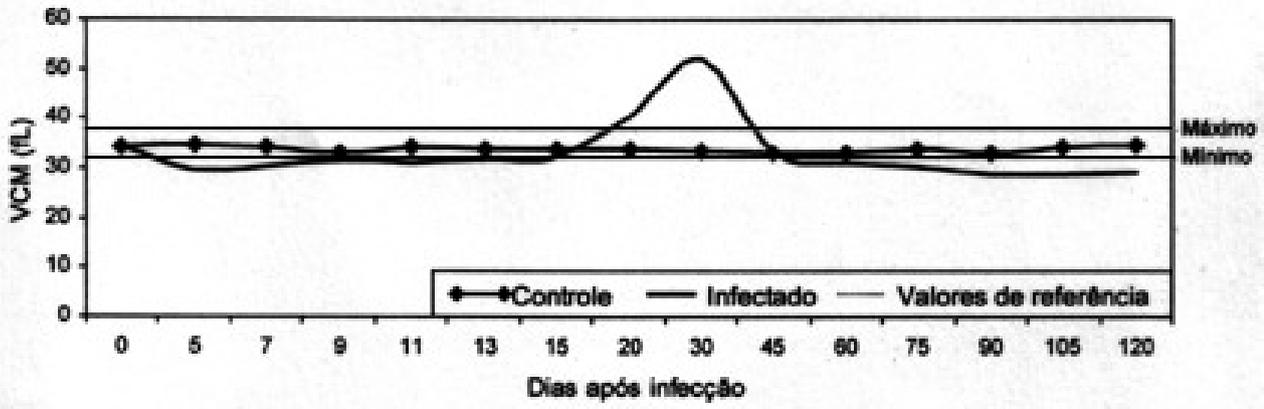


FIGURA 3. Valores médios do hematócrito (%) em ovinos, do grupo testemunho e do grupo experimentalmente infectado com *T. vivax*, durante o período experimental.

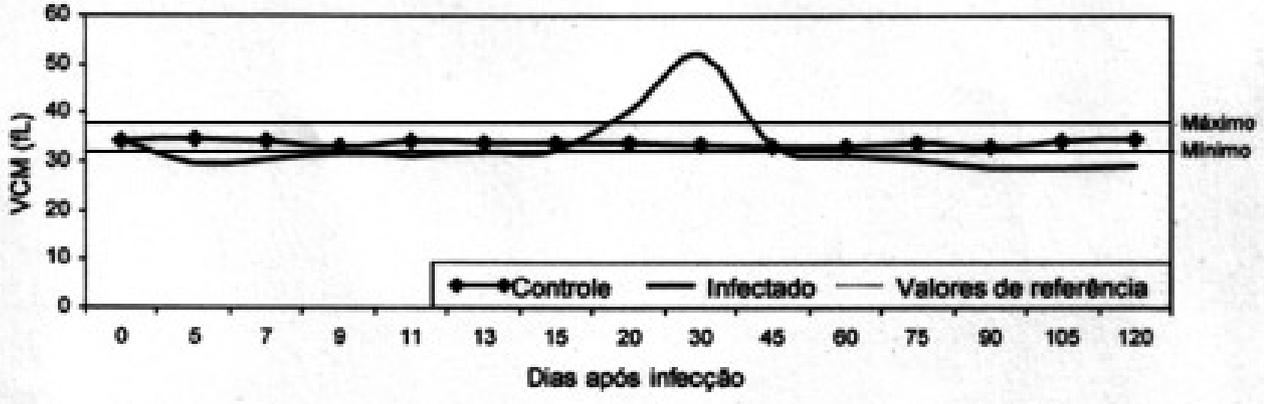


FIGURA 4. Valores médios do volume corpuscular médio – VCM (fL) – em ovinos do grupo testemunho e do grupo experimentalmente infectado com *T. vivax*, durante o período experimental.

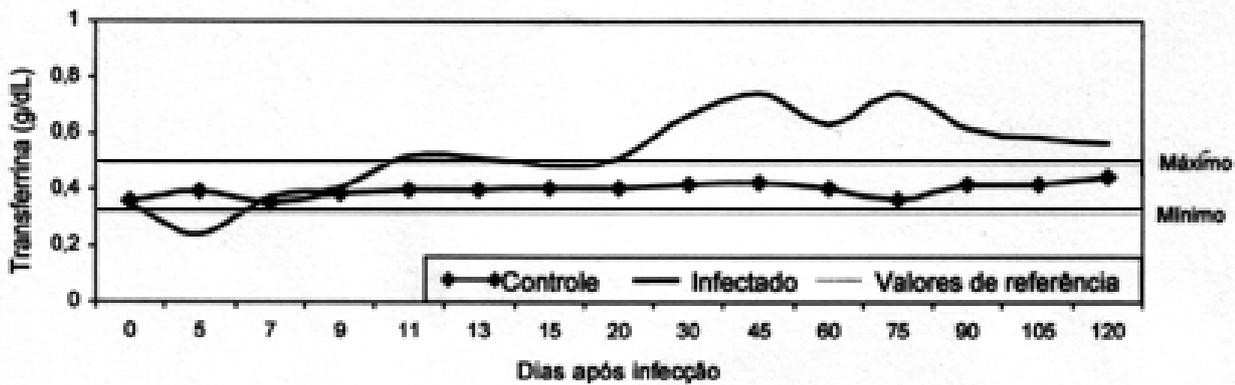


FIGURA 5. Valores médios para transferrina (g/dL) em ovinos experimentalmente infectados com *T. vivax*, em diferentes períodos de tempo.

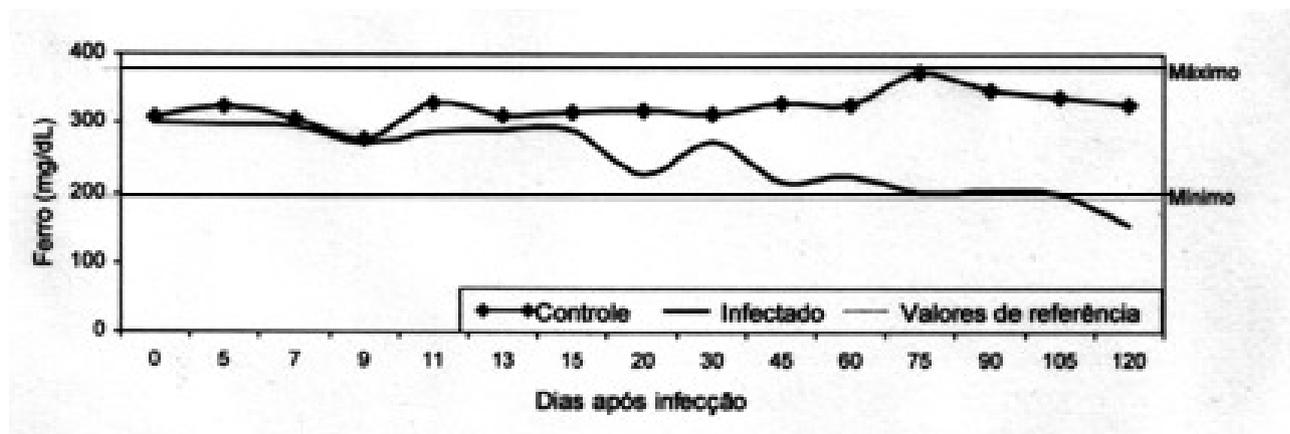


FIGURA 6. Valores médios para ferro (mg/dL) em ovinos do grupo testemunho e do grupo experimentalmente infectado com *T. vivax*, durante o período experimental.

O período pré-patente (PPP) para *T. vivax* é muito variável (IGBOKWE et al., 1996; MORAES, 2001; SCHENK et al., 2001; PELLÍN et al., 2003). BATISTA et al. (2006), trabalhando com a mesma amostra da Paraíba, observaram um PPP de quatro dias e, após os 30 DAI, não verificaram parasitos no sangue. Como o inóculo do estudo de BATISTA et al. (2006) ( $1,85 \times 10^5$  tripomastigotas) e do presente estudo ( $1 \times 10^5$  tripomastigotas) estão próximos, acredita-se que a divergência nos resultados seja decorrente das diferenças na raça e idade dos animais, na alimentação e nos fatores ambientais, que podem interferir na resposta do hospedeiro ao parasito, demonstrando que uma mesma amostra de *T. vivax* pode apresentar patogenicidade diferente dependendo dos fatores supracitados.

As alterações no hemograma foram semelhantes às obtidas no estudo de BATISTA et al. (2006), que usaram a mesma amostra em infecção de ovinos, e por PELLÍN et al. (2003), que observaram um rápido decréscimo nos valores de hematócrito e hemoglobina logo após a inoculação dos ovinos por *T. vivax*. Esses valores se mantiveram, de forma progressiva, até 39 DAI, quando alcançaram um valor mínimo e, posteriormente, permaneceram abaixo dos valores normais, porém, com menor flutuação.

A anemia causada por *T. vivax* pode resultar de vários fatores, como: a produção de um fator hemolítico (IGBOKWE, 1994); o efeito

direto dos tripanossomas sobre as hemácias; o incremento da fragilidade osmótica por ação da febre, adesão de antígenos dos tripanossomas ou deposição de imunocomplexos na superfície das hemácias (WILLIAMS et al., 1992); a hemopoese insuficiente por diminuição de eritropoetina (FIENNES, 1954) ou por aumento das citocinas (interleucinas 1 e 6, TNF $\alpha$  e interferon gama) ou, ainda, a diminuição da oferta de ferro (CANÇADO & CHIATTONE, 2002).

Os achados para o VCM corroboram com IGBOKWE & ANOSA (1989), em que os ovinos infectados experimentalmente com *T. vivax* apresentaram uma anemia progressiva com o VCM aumentado, caracterizando a anemia como macrocítica normocrômica na fase aguda da doença, e com FIENNES (1954), quando a anemia passa a ser microcítica normocrômica, caracterizando a forma crônica, possivelmente pela deficiência de ferro demonstrada por hipocromia. Essa hipocromia não foi observada no presente estudo, porém se verificou a diminuição significativa do ferro.

Entretanto, os sinais de insuficiência de ferro aparecem em etapas: primeiro se esgotam os depósitos (deficiência latente), o que se caracteriza por uma diminuição da ferritina sérica; se o aporte continuar insuficiente, ocorre o comprometimento do aporte de ferro tissular (eritropoese deficiente em ferro), verificado, precocemente, por um aumento nos receptores da transferrina e, mais tarde, por uma diminuição na saturação dessa transfer-

rina. Finalmente, se persistir o balanço negativo, observa-se a etapa mais severa, caracterizada por uma anemia microcítica hipocrômica (OLIVARES & WALTER, 2004). Logo, a diminuição do ferro sérico e o aumento da transferrina observados nos ovinos, ao final deste estudo, sugerem que os animais estavam na segunda fase.

A quantidade de ferro no organismo parece não sofrer alterações significativas na maioria dos casos de tripanossomíases, porém pode-se constatar a sua diminuição nos casos crônicos da doença (MURRAY et al., 1978), em virtude da remoção das hemácias complexadas com anticorpos ou marcadas com complemento pelo sistema mononuclear fagocítico, retendo o ferro do grupamento heme, na forma de ferretina. Além disso, a recaptção de ferro pelo sistema fagocítico mononuclear pode estar prejudicada pela liberação de interleucinas e pela grande perda desse elemento associada à pouca absorção por via dietária (HUTCHISON & DAVEY, 1999); e a anemia hemolítica, observada nas tripanossomíases, pode ocasionar hemoglobinemia e hemoglobinúria, predispondo à grande perda de ferro pela urina (JENNINGS, 1976).

Nas observações de PAIVA et al. (2000a), ocorreram redução da parasitemia e posterior desaparecimento dos parasitos, aos 56 DAI, em que o VCM elevou-se de forma satisfatória, permitindo aos animais uma rápida recuperação do quadro hemático. Entretanto, o observado nos ovinos deste trabalho foi que o VCM, as hemácias, a hemoglobina e o hematócrito permaneceram abaixo dos valores de referência para a espécie e inferiores aos controles até os 120 DAI, em decorrência da permanência da parasitemia, não sendo, portanto, observada recuperação. Além disso, a diminuição de ferro sérico e o aumento da transferrina sugerem uma anemia crônica com tendência a se tornar hipocrômica (anemia ferropriva), sugerindo que, além de todos os fatores já citados contribuírem para a anemia, o ferro tem importante participação na fase crônica da tripanossomíase.

## CONCLUSÃO

A amostra de *T. vivax*, procedente de Catolé do Rocha, PB, e utilizada na infecção experimental

em ovinos, ocasiona relevantes alterações hematólogicas, caracterizadas por anemia e linfocitose.

## REFERÊNCIAS

- BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R. C.; GUERRA, J. L. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, p. 31-37, 2006.
- BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 1961. Tese (Livro-Docência) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia e Farmácia, 1961.
- CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 24, n. 2, p.127-136, 2002.
- FIENNES, R. N. T.W. Hematological studies in trypanosomiasis of cattle. **Veterinary Record**, London, v. 66, p. 423-434, 1954.
- GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, London, v. 28, p. 229-317, 1989.
- HUTCHISON, R. E.; DAVEY, F. R. Hematopoiese. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 594-615.
- IGBOKWE, I. O. Mechanisms of cellular injury in african trypanosomiasis. **International Veterinary Bulletin**, New York, v. 64, n. 7, p. 611-620, 1994.
- IGBOKWE, I. O.; ANOSA, V. O. Response to anemia in experimental *Trypanosoma vivax* infection of sheep. **Journal Comparative Pathology**, Edinburgh, v.100, n. 2, p.111-118, 1989.
- IGBOKWE, I. O.; UMAN, I. A.; OMAGE, J. J.; IBRAHIM, N. D. G.; KADIMA, K. B.; OBAGAIYE, O. K.; SAROR, D. I.; ESIEVO, K. A. N. Effect of acute *Trypanosoma vivax* infection on cattle erythrocyte glutathione and susceptibility to in vitro peroxidation. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 63, p. 215-224, 1996.
- JENNINGS, F. W. The anemias of parasitic infection. In: SOULSBY, E. J. L. **Pathophysiology of parasitic infection**. New York: Academic Press, 1976. p. 41-67.
- KATUNGUKA-RWAKISHAYA, E.; MURRAY, M.; HOLMES, P. H. The influence of supplementation with cotton seed cake on the resistance of Uganda goats to primary and

- secondary challenges with *Trypanosoma congolense* and on their response to treatment. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 70, p.67-76, 1997.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2. ed. Minneapolis: Burgess Publ. Co. , 1973. 406 p.
- MORAES, M. A. V. ***Trypanosoma vivax*: infecção experimental em bovinos (*Bos indicus*)**. 2001, 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 2001.
- MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B.; MURRAY, M. B.; MURRAY, C. J. The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 2, p.1113-1115, 1978.
- OLIVARES, M.; WALTER, T. Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, p. 5-14, 2004.
- PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; NAKASATO, L.; BRUM, K. B.; BERNADO, K. C.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: II – Inoculação Experimental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n. 2, p.143-148, 2000a.
- PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; NAKASATO, L.; MORE, A. E.; BRUM, K. B.; BERNADO, K. C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: I – Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n.2, p.135-141, 2000b.
- PELLÍN, C. E. S.; GONZÁLEZ, F. A.G.; BALDIZÁN, G.; LINAREZ, Y. F. F. M. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. **Veterinaria Tropical**, Maracay, v. 28, p. 79-92, 2003.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9. ed. W.B. London: Saunders, 2000. 1877 p.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análise estatística no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301 p.
- 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**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p.157-161, 2001.
- SEKONI, V. O.; SAROR, D. I.; NJOKU, C. O.; KUMIDIKA, J.; OPALUWA, G. I. Comparative hematological changes following *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infection in Zebu bulls. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n.1-2, p. 11-20, 1990.
- SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA D. P.; MESQUITA T. C.; RAMIREZ, L.; DAVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 561-562, 1996.
- WILLIAMS, D. J.; LOGAN-HENFREY, L. L.; AUTHIÉ, E.; SEELY, C.; CODIMBA, F. Experimental Infection with a Hemorrhage Causing *Trypanosoma vivax* in N'Dama and Boran cattle. **Scand. Journal of Immunology**, Baltimore, v. 36, suppl. 11, p. 34-36, 1992.
- WINTROBE, M. M. The size and hemoglobin content of the erythrocyte, methods of determination and clinical application. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v.17, p. 899-901, 1942.

---

Protocolado em: 14 ago. 2007. Aceito em: 15 set. 2008.