

EFEITO DO PLASMA DE COELHOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA EVANSI* EM RATOS.

OTTO¹, Mateus Anderson; GRESSLER¹, Lucas Trevisan; FACCI¹, Luciana; REGINATTO¹, Andressa Rodrigues; SOARES¹, João Fabio; SOARES¹, Claudia Dal Molin; SILVA², Aleksandro Schafer; MONTEIRO³, Silvia Gonzalez

RESUMO

Estudos mostram que coelhos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi* possuem resistência à doença, desenvolvendo uma “autocura”. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de plasmas de coelhos infectados e não infectados com *T. evansi* no tratamento de ratos experimentalmente infectados com o flagelado. Foram utilizados dois coelhos para a obtenção do plasma e 35 *Rattus norvegicus* divididos em cinco grupos homogêneos. Todos os ratos foram infectados com uma dose de $4,5 \times 10^4$ *T. evansi*. O tratamento instituído foi feito para testar a ação preventiva, com a aplicação de plasma um dia antes da infecção e para testar a ação curativa, administrando o plasma no dia dois e quatro após o contato com o parasito. Os grupos A, B e C receberam 0,6 ml de plasma do coelho que não teve contato com *T. evansi* e os grupos D, E e F a mesma dose de plasma do coelho infectado com o flagelado que teve auto cura. O grupo G grupo controle, não foi tratado. No experimento, foi observado que o período pré-patente do grupo. Foi verificada diferença estatística significativa na longevidade dos animais tratados nos grupos A, B, E e F quando comparado ao grupo controle. Em virtude dos resultados, conclui-se que o plasma de coelhos retardou a parasitemia e elevou a longevidade de ratos infectados com *T. evansi*, no entanto não teve efeito curativo.

Palavras-chaves: Plasma imune, *Trypanosoma evansi*, coelhos, ratos.

Trypanosoma evansi é um flagelado da seção salivaria que comumente é observado parasitando o sangue de cavalos, bovinos, zebuínos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, quatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres em regiões endêmicas como o pantanal mato-grossense e atualmente o homem. Este protozoário apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados em países da África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul.

A tripanosomose em animais domésticos causa sinais clínicos como anemia, edema de pernas e partes baixas, anorexia, hálito uremico, desidratação, apatia, febre, letargia, emagrecimento, lacrimejamento, aborto, incoordenação motora e uma manqueira típica que denomina a doença.

Estudos relataram que os anticorpos têm propriedades que podem destruir o *T. evansi* em coelhos infectados. Os autores observaram que as imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) aumentara a resistência de coelhos ao protozoário, eliminando o parasita da corrente sanguínea. A cura da tripanosomose em coelhos infectados experimentalmente também foi observada no trabalho de Silva et al. (2008).

A transferência passiva de plasma imune, retirado de ratos curados de uma infecção por *Trypanosoma musculi*, quando aplicado em ratos infectados experimentalmente com o parasito, eliminou o protozoário na circulação. Baseado em outros experimentos, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos do plasma

¹ Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, Brasil. alemaootto@yahoo.com.br

² Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM. aleksandro_ss@yahoo.com.br

³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM. Campus Universitário, Santa Maria – RS, Brasil. 97105-900, Prédio 20, Sala 4232. Fax: (55) 3220 8958. Autor para correspondência: sgmonteiro@uol.com.br

de coelhos no controle de infecção por *T. evansi* em ratos infectados experimentalmente.

Dois coelhos foram utilizados para a obtenção do plasma utilizado no trabalho, sendo um infectado com *T. evansi* e o outro sadio. Um dos coelhos foi infectado com uma concentração de 10^4 tripomastigotas em 0,5ml de sangue, via intraperitoneal. O outro coelho recebeu os mesmos 0,5 ml de solução fisiológica, pela mesma via. Os dois animais foram mantidos em gaiolas separadas e acompanhados por 60 dias quando foram eutanasiados (cetamina/xilazina em doses elevadas) para coleta de sangue intracardiaco. As amostras foram colhidas em tubos com EDTA 10%, centrifugadas e o plasma foi armazenado em tubos crio preservação em nitrogênio líquido a -200°C .

Para testar os efeitos do tratamento com plasma em roedores infectados experimentalmente com *T. evansi*, foram utilizados 35 ratos (*rattus norvegicus*), machos com dois meses de idade, mantidos em temperatura ambiente e recebendo água e comida a vontade. Os ratos foram divididos em sete grupos de cinco animais cada (A, B, C, D, E, F e G), sendo todos infectados com $4,5 \times 10^4$ *T. evansi* no dia 02. Para os tratamentos, foi utilizada a dose de 0,6 mL de plasma, via intraperitoneal. A terapia foi dividida em três períodos: T1- os ratos receberam o plasma no dia 01, T2- o plasma foi administrado no dia 04 e T3- os animais receberam o plasma no dia 06. Os roedores dos grupos A, B e C receberam o tratamento com plasma normal (coelho sadio) e os grupos D, E e F foram tratados com plasma imune (coelho curado). O grupo G recebeu solução fisiológica, sendo este, o grupo controle.

Após o início do tratamento os ratos foram avaliados em intervalos de dois dias através da pesquisa microscópica de esfregaço do sangue periférico, corado por Panótico rápido e observado ao microscópio de luz em imersão. Os animais foram avaliados durante 61 dias, quando foram eutanasiados.

A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA), seguida da aplicação do teste de Tukey para comparação entre as médias do período pré-patente e longevidade, calculando-se o coeficiente de variação para verificar a precisão dos dados.

O período pré-patente, compreendido desde a infecção até a detecção dos tripomastigotas no sangue periférico dos ratos do grupo A foi superior aos outros grupos (Tabela 1). Em estudos, pesquisadores reportam que o período pré-patente para a infecção por *T. evansi* em ratos infectados pela via intraperitoneal pode variar entre 1,5 e 5,66 dias, dependendo da dose infectante. Já, quando a infecção for por via oral estipula-se este período como sendo em média de 21 dias. Os demais grupos tratados não diferiram estatisticamente do grupo controle e são semelhantes aos citados pela literatura.

A longevidade dos animais após o início do experimento apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Verificou-se que os animais que receberam plasma imune e plasma normal de coelhos, em diferentes períodos, tiveram longevidade superior aos ratos do grupo controle que sobreviveram por apenas sete dias (Tabela 1).

Nesta pesquisa não foi obtido a cura completa de todos os animais de cada grupo, no entanto dois ratos de cada grupo (A, B e E) não morreram em consequência da parasitemia pelo *T. evansi*, embora após 60 dias da infecção, apresentarem o parasito na circulação. Em alguns trabalhos, o uso de plasma imune de ratos curados da infecção por *T. musculi*, quando utilizados na terapia do flagelado tem a capacidade de controlar a infecção, sendo sugerido pelos autores que o plasma tem atividade curativa. Em outro experimento, verificou-se que a atividade do plasma imune de ratos curados de *T. musculi* quando testados em diferentes cepas do mesmo protozoário não se obtém os

mesmos resultados. Segundo estes autores, estas variações podem estar relacionadas aos elevados picos de parasitemia e patogenicidade das cepas.

No presente estudo foi verificado que ambos os tratamentos tiveram influência sobre a longevidade dos ratos. A terapia com plasma do coelho sadio acarretou uma longevidade superior aos grupos tratados profilaticamente (T1 e T2). Já o plasma do coelho que teve contato com o flagelado apresentou uma longevidade superior no período T2 e T3 (Tabela 1). Acredita-se que a longevidade dos animais esteja relacionada com as imunoglobulinas contidas no plasma dos coelhos transferidas aos ratos, já que outros autores, constataram que os coelhos são refratários a infecção. Os anticorpos de coelhos têm capacidade de destruir o flagelado. Estudos mostram que a IgG2a é a responsável pelo efeito curativo de ratos infectados com *T. musculi* quando tratados com plasma imune. Baseado nisto, sugere-se que esta imunoglobulina possa ter influenciado na longevidade dos animais tratados.

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que o plasma de coelhos utilizados no tratamento de *T. evansi* em ratos influenciou a longevidade dos mesmos. Somente no grupo tratado com plasma de coelhos que não tiveram contato com o flagelado ocorreu um retardo na parasitemia.

REFERÊNCIAS

- CARREIRA, J.C. Sanguessugas podem transmitir o mal das cadeiras, doença de eqüinos que tem grande importância econômica no Brasil. On line. Capturado em 15/12/2005. disponível na internet: http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm
- DOYLE et al. Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por trypanosoma evansi em ratos. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 35, p 67-71, 2007.
- JOSHI, P.P. et al. Human Trypanosomosis Caused by *Trypanosoma evansi* in India: The First Case Report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.3, p.491-495, 2005.
- KUBIAK, G.V.L. & MOLFI, A. Tripanosomíase eqüina (Mal das Cadeiras). Boletim n.33. **Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná**. Tip. João Haupt & Cia. Ltda. – Curitiba, 51p., 1954.
- LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MOUSSE, J.L.B.; NEVES, P. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2 ed. São Paulo: winner Graph, 1996.
- OLIVEIRA, T.C.G. et al. Comportamento do *Trypanosoma evansi* (*T. equinum*) em animais de laboratório. **Arquivo Brasileiro Veterinária e Zootecnia**, v.41, n.4, p.271-277, 1989.
- QUEIROZ, A.O. et al. Specific antibody levels and antigenic recognition of wistar rats inoculated with distinct isolates of *trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.965-967, 2001.
- SILVA, F. A. S., AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002..
- SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia Diagnóstico e Controle, **EMBRAPA**. On line. Capturada em 15/01/2005. Disponível na Internet: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015>, 2002.
- SILVA, A.S. et al. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. **Revista FZVA**, v.13, n.2, p.153-157, 2006.

SILVA, A S. et al. Infecção oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 37, n.3, p. 897-900, 2007.

SILVA, A.S. et al. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 519-523, 2008.

. UCHE, U.E.; JONES, T.W.; BOID, R. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. **Acta Tropica**, v. 52, n. 2-3, p. 139-147, 1992.

WECHSLER DANIEL S. Cure of *Trypanosome musculi* infection by heat-labile activity in immune plasma. **Infection and Immunity**, v.44, n.3, p.756-759. 1984.

WECHESLER & KONGSHAVN. Further Characterization of the Curative Antibodies in *Trypanosoma musculi* Infection. **Infection and Immunity** vol. 56, no. 9 p. 2379 - 2384, 1988.

Tabela 1: Média do período pré-patente e longevidade de ratos infectados experimentalmente por *T. evansi* no dia 02 e tratados com plasma normal e imune.

Tratamento	Grupos*	Inoculação do plasma (dia)	Período pré-patente (dias)	Longevidade (dias)	Total de ratos mortos (%)
Plasma	A	01	7,2 ^a (±4,6)	45,8 ^a (±13,8)	60% **
Normal	B	04	2,25 ^b (±0,4)	43,2 ^a (±23,2)	60% **
	C	06	2,2 ^b (±0,4)	11,0 ^{bc} (±0,0)	100%
Plasma imune	D	01	3 ^{ab} (±2,2)	10,2 ^c (±1,0)	100%
	E	04	2,4 ^b (±0,5)	37,4 ^{ab} (±21,9)	60% **
Controle	F	06	3,8 ^{ab} (±2,9)	27,8 ^{abc} (±6,2)	100%
	G	-	2,4 ^b (±1,1)	7,0 ^c (±0,7)	100%

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em nível de significância de 5% no teste de Tukey. * todos os animais foram inoculados com *T. evansi* no dia dois; ** os roedores sobreviventes foram eutanasiados após 61 dias, no entanto estes apresentavam o flagelado na circulação.