

## PLASMA IMUNE DE COELHO COM INFECÇÃO AGUDA NO CONTROLE DA PARASITEMIA POR *Trypanosoma evansi* EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

[Immune plasma of rabbits with acute infection in the control of *Trypanosoma evansi* parasitemia in experimentally infected rats]

Mateus A. Otto<sup>1</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>2</sup>, Lucas T. Gressler<sup>1</sup>, Franciele Bess<sup>1</sup>, Letícia P. Dall Agnol<sup>1</sup>, Tayana M. Sessegolo<sup>1</sup>, Patrique L. Pereira<sup>1</sup>, Sílvia G. Monteiro<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Curso de Medicina Veterinária da UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

**RESUMO** - O objetivo deste estudo foi comparar o efeito do plasma imune *in natura* e congelado de coelhos com infecção aguda no controle profilático e curativo do *Trypanosoma evansi* em ratos parasitados. Foram utilizados, um coelho e 30 ratos adultos. O coelho foi infectado com 0,5 ml de sangue contendo tripomastigotas. Ao apresentar o parasita na corrente sanguínea, foi coletado o sangue e deste obtido o plasma, o qual foi armazenado em tubos de criopreservação e congelado, "plasma congelado" e a outra metade foi mantida a 37°C por 30 minutos, "plasma *in natura*". Os ratos foram separados em seis grupos homogêneos, sendo todos infectados intraperitonealmente com  $4,5 \times 10^4$  tripomastigotas de um isolado de *T. evansi*. Foram administrados 0,8ml de plasma nos tratamentos profilático (grupos A e B), dois dias antes da inoculação do parasito, e curativo (grupos C e D), dois dias após inoculação do *T. evansi*. O grupo E recebeu apenas solução fisiológica, grupo controle. O plasma congelado foi administrado nos grupos A e C e o plasma "*in natura*" nos grupos B e D. Os efeitos do plasma de coelhos com infecção aguda foi avaliado através do período pré-patente, sobrevivência e cura dos ratos. Não houve diferença entre os períodos pré-patente. Foi observada uma longevidade superior dos ratos do grupo B que foi tratado com plasma "*in natura*" profilaticamente. Nenhum animal obteve a cura da infecção, porém podemos concluir que a terapêutica com plasma imune de coelhos aumenta a sobrevivência de ratos infectados com *T. evansi*.

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma evansi*, coelhos, ratos, plasma imune, tratamento.

**ABSTRACT** - This study was aimed to compare the effect of fresh and frozen immune plasma of rabbits with acute infection in the prophylactic and curative control of *Trypanosoma evansi*-infected rats. Thirty adult rats and a rabbit were used. The rabbit was infected with 0.5ml of blood containing trypomastigotes. Showing the parasite in the bloodstream, plasma was obtained and divided in frozen and fresh plasma. Frozen plasma was stored in cryopreservation tubes and frozen. Fresh plasma was kept at 37°C for 30 minutes. The rats were separated into six equal groups, all infected intraperitoneally with  $4.5 \times 10^4$  trypomastigotes of the *T. evansi* strain. Each rat from prophylactic (A and B) and curative(C and D) groups received 0.8ml of plasma. Animals from group E (control group) received only saline. Frozen plasma was administered in groups A and C and the fresh plasma in groups B and D. The effects of rabbits plasma with acute infection was estimated by evaluation of the prepatency period, longevity and curative effects of rats. No difference was observed in the prepatency period. The longevity of the animals treated prophylactically with fresh plasma (group B) was superior than the other groups. No curative effect was observed in the animals, but based upon the results it is concluded that the treatment with immune plasma of rabbits increases the longevity of *T. evansi*-infected rats.

**Keywords:** *Trypanosoma evansi*, rabbits, rats, immune plasma, treatment.

### INTRODUÇÃO

*Trypanosoma evansi* é um protozoário da classe Mastigophora cuja transmissão é essencialmente

mecânica, pois ele é transferido de um hospedeiro mamífero a outro pela alimentação interrompida de insetos picadores, principalmente tabanídeos e *Stomoxys* sp. (Lun e Desser, 1995). Este protozoário

\* Autor para correspondência. E-mail: sgmonteiro@uol.com.br.

causa uma importante doença popularmente conhecida como “surra” ou “Mal das cadeiras” que se encontra amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais no mundo. Esta doença afeta uma grande variedade de mamíferos domésticos, silvestres e atualmente o homem (Stevens et al., 1989; Nunes e Oshiro, 1990; Nunez et al., 1993; Franke et al., 1994; Silva et al., 1996; Joshi et al., 2005).

A doença é caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade em animais não tratados. Os principais sinais clínicos incluem febre de caráter intermitente, edemas subcutâneos, anemia, linfadenopatia, emagrecimento, letargia, incoordenação motora e uma manqueira típica que caracteriza a doença (Silva et al., 1996; Silva et al., 2002; Brandão et al., 2002; Colpo et al., 2005). Infecções naturais em cães e eqüinos com manifestação de sinais clínicos severos têm sido relatadas em municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Franciscato et al., 2007; Zanette et al., 2008).

A infecção por *T. evansi* não ocorre da mesma forma em todas as espécies animais. Em coelhos, a parasitemia e os sinais clínicos da doença não se manifestam em todos os animais que entram em contato com o parasito (Uche et al., 1992). Trabalhos relatam que coelhos possuem anticorpos capazes de destruir o *T. evansi* e durante o curso da infecção estes animais mantêm elevados seus níveis de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA). Alguns pesquisadores já descreveram a cura da tripanossomose por *T. evansi* em coelhos infectados (Uche et al., 1992; Da Silva et al., 2008).

No plasma estão presentes os principais fatores envolvidos na imunidade do hospedeiro que, segundo pesquisadores, não são perdidos com o congelamento e são passíveis de transmissão passiva (Hunt e Moore, 1990). Este trabalho teve como objetivo comparar o efeito do plasma imune *in natura* e congelado de coelhos com infecção aguda no controle profilático e curativo da parasitemia por *T. evansi* em ratos parasitados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Neste trabalho, utilizou-se um coelho (Nova Zelândia) macho, adulto e 30 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, com dois meses de idade. Todos os animais foram mantidos em ambiente com

temperatura controlada (23°C), recebendo água e ração comercial à vontade.

### Obtenção do plasma

O coelho foi infectado com 0,5mL de sangue contendo uma concentração de  $10^4$  tripomastigotas de *T. evansi*, via intraperitoneal. Diariamente foram realizados esfregaços sanguíneos com sangue periférico obtido da orelha, corados com panótico rápido e analisados em microscópio óptico (Da Silva et al., 2006). Entre o sétimo e décimo dia após inoculação o coelho apresentou tripomastigotas na circulação, período em que foi anestesiado com a associação de quetamina e xilazina para a coleta de sangue via intracardíaca. Depois da coleta do sangue o animal foi eutanasiado com uma sobredose dos medicamentos. A amostra de sangue foi mantida em tubos com EDTA 10% e centrifugada para a obtenção do plasma imune. Metade do plasma obtido foi alocado em tubos de criopreservação e armazenado em nitrogênio líquido a -200°C por 48 horas, “plasma congelado”. A outra parte do plasma foi mantida em banho-maria a 37°C por 30 minutos, “plasma *in natura*”.

### Teste em roedores

Para verificar a transmissão de imunidade passiva, anti-tripanosoma, pelo plasma imune de coelhos com infecção aguda por *T. evansi* foram utilizados ratos infectados experimentalmente por este flagelado. Trinta roedores, divididos em cinco grupos com seis animais cada (A, B, C, D, E) foram inoculados, via intraperitoneal, com uma concentração de  $4,5 \times 10^4$  de um isolado *T. evansi* (Colpo et al., 2005), criopreservado em nitrogênio líquido. Os efeitos da terapia com plasma imune congelado e *in natura* foram medidos através do período pré-patente, sobrevida e cura dos ratos.

Os animais dos grupos A e B receberam terapia profilática, isto é, o plasma imune foi administrado dois dias antes da infecção experimental dos ratos. Os roedores dos grupos C e D foram tratados curativamente, ou seja, o plasma foi administrado dois dias após a inoculação do *T. evansi* nos animais. O grupo E foi utilizado como grupo controle, não tratado.

A dose de 0,8 mL de plasma, via intraperitoneal, utilizada neste estudo foi baseada no trabalho de Wechsler e Kongshavn (1984) que obteve a cura dos animais infectados por *Trypanosoma musculi*. Os ratos do grupo E receberam pela mesma via solução fisiológica. Para verificar se o armazenamento

interferiu na conservação de constituintes do sistema imunológico presentes no plasma, foram realizados os tratamentos profiláticos e curativos com plasma congelado (grupos A e C) e plasma *in natura* (grupos B e D).

### Avaliação da parasitemia

Após a inoculação do parasito e início dos tratamentos com plasma imune, os ratos foram avaliados, em intervalos de dois dias, através da pesquisa de tripomastigotas em esfregaço do sangue periférico (Da Silva et al., 2006). O período experimental foi de 40 dias, momento em que os ratos sobreviventes foram eutanasiados (Lucca et al., 1996).

### Análise estatística

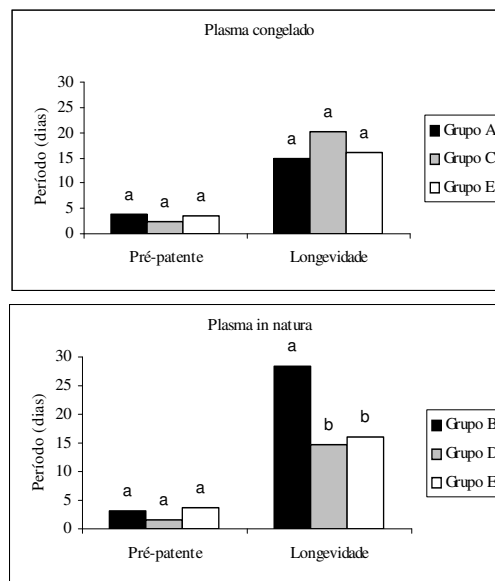
A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA), seguida da aplicação do teste de Tukey para comparação entre as médias do período pré-patente e longevidade, calculando-se o coeficiente de variação para verificar a precisão dos dados (Silva e Azevedo, 2002).

### Comitê De Ética e Bem Estar Animal

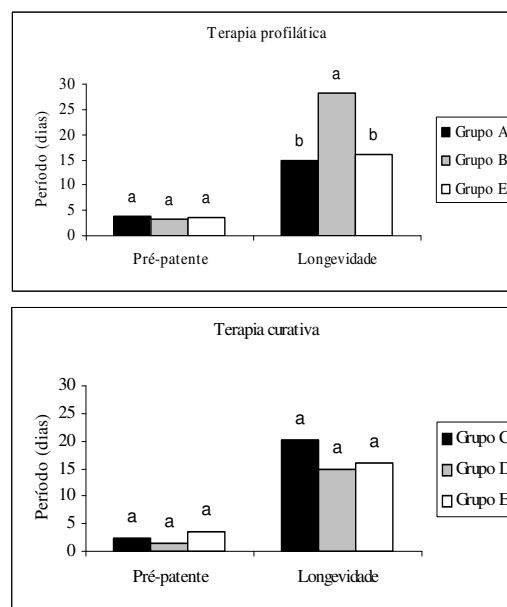
O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), nº23081.002648/2008-29, de acordo com legislação vigente e os Princípios Éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## RESULTADOS

Não foi observado diferença entre os tratamentos profiláticos e curativos com relação ao período pré-patente e sobrevida dos ratos tratados com plasma congelado. Já quando foi avaliada a ação do plasma *in natura* no protocolo terapêutico profilático, observou-se períodos de vida pós-inoculação prolongados (Figura 1). Quando se comparou os tratamentos curativos e profiláticos foi verificado que o profilático elevou a longevidade dos ratos tratados com plasma *in natura*, o que não ocorreu nos demais grupos teste. No entanto, o período pré-patente não diferiu entre protocolos profiláticos e curativos (Figura 2). A taxa de mortalidade para os grupos A, C, D e E foi de 100% e para o grupo B foi de 34,4%.



**Figura 1.** Período pré-patente e longevidade de ratos infectados por *T. evansi* após imunoterapia com plasma imune de coelhos congelado e *in natura*. (Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem estatisticamente entre si a 5% no teste de Tukey na mesma terapia).



**Figura 2.** Período pré-patente e longevidade de ratos infectados por *T. evansi* após imunoterapia profilática e curativa com plasma imune de coelhos. (Letras iguais para o mesmo parâmetro não diferem estatisticamente entre si a 5% no teste de Tukey na mesma terapia).

## DISCUSSÃO

O período pré-patente, compreendido desde a infecção até a detecção dos tripomastigotas no sangue periférico, não diferiu entre os grupos (Figura 1 e 2). Os tratamentos testados também não interferiram na pré-patência do *T. evansi* em ratos, pois o período manteve-se entre 1 e 5,6 dias, como descrito pela literatura (Oliveira *et al.*, 1989; Queiroz *et al.*, 2001; Doyle *et al.*, 2007). A criopreservação do agente em nitrogênio líquido já foi relatada prolongando a vida de ratos infectados com *T. evansi* (Da Silva *et al.*, 2009). Por este motivo, foi utilizado neste estudo sangue criopreservado para infectar os animais, a fim de aumentar a longevidade e conseqüentemente elevar a probabilidade de resposta passiva pretendida com a terapia com plasma de coelho infectado com *T. evansi*. Tal objetivo foi alcançado, pois o período de sobrevivência de todos os animais do experimento foi superior a 10 dias (Figura 1 e 2).

Nesta pesquisa, foi observada uma longevidade superior do grupo B, ratos tratados com plasma imune, *in natura*, profilaticamente. Os demais tratamentos tiveram mortalidade de 100% dos animais, assim como o grupo controle, diferente do grupo B, onde a taxa de mortalidade foi de 34,4%. Cabe ressaltar, que os ratos sobreviventes apresentavam o parasito circulante ao final do experimento. Segundo pesquisadores, o processo de congelamento do plasma sanguíneo não altera os fatores de coagulação, proteínas plasmáticas e imunoglobulinas (Hunt e Moore, 1990). Porém, foi evidente neste estudo, quando comparamos os grupos, a maior sobrevivência dos ratos onde se utilizou a terapia profilática, *in natura*. Então, acredita-se que algum elemento do sistema imunológico seja perdido no processo de criopreservação. Não saberíamos explicar porque o tratamento curativo com o plasma *in natura* não teve o mesmo efeito, porém supõe-se que como a parasitemia já estava presente no momento da terapia neste grupo (D), o hospedeiro teve um menor tempo para organizar uma resposta imune frente ao agente, através dos anticorpos transferidos passivamente pelo plasma.

Este experimento foi motivado pelos resultados obtidos por Hunt *et al.* (1990) e Wechsler e Kongshavn (1984) que utilizaram plasma imune de ratos curados da infecção por *T. musculi* na terapia deste flagelado em roedores com elevados picos de parasitemia. Os autores observaram que o protocolo testado controlou a infecção e curou os roedores. O mesmo sucesso não se obteve neste estudo, no entanto, verificou-se que o plasma *in natura* de coelhos com parasitemia por *T. evansi* influenciou a

longevidade e taxa de mortalidade destes roedores infectados experimentalmente.

Coelhos são resistentes a infecção por *T. evansi*. Estes manifestam parasitemia e sinais clínicos, porém conseguem a autocura (Uche *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 2008). Neste trabalho, testou-se a passagem de elementos imunológicos presentes nos coelhos que pudessem surtir o mesmo efeito nos ratos infectados. Esta hipótese foi confirmada em parte, pois com o plasma imune não congelado, conseguiu-se prolongar a vida dos animais e reduzir a taxa de mortalidade durante o período experimental, no entanto não ocorreu a eliminação da parasitemia.

## CONCLUSÃO

O plasma imune “*in natura*” de coelhos tem efeito sobre o período de sobrevivência de ratos infectados experimentalmente com *T. evansi* quando utilizado profilaticamente. Provavelmente com o congelamento de amostras de plasma imune ocorre a perda ou inativação de alguns elementos envolvidos na imunidade contra o *T. evansi*.

## REFERÊNCIAS

- Brandão LP, Larsson MHMA, Birgel EH, Hagiwara MK, Ventura RM, Teixeira MMG (2002). Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães – relato de caso. Clínica Veterinária, 36: 23-26.
- Colpo CB, Monteiro SG, Stainki DR, Colpo ETB, Henriques GB (2005). Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. Ciência Rural, 35: 717-719.
- Da Silva AS, Doyle RL, Monteiro SG (2006). Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, 13(2): 153-157.
- Da Silva AS, Costa MM, Doyle RL, Lopes STA, Monteiro SG (2008). Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. Ciência Animal Brasileira, 9(2): 519-523.
- Da Silva AS, Wolkmer P, Gressler LT, Otto MA, Bess F, Tavares KCS, Zanette RA, Monteiro SG (2009). Patogenicidade do isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com o parasito em sangue *in natura* e criopreservado. Ciência Rural, Prelo.
- Doyle RL, Da Silva AS, Monteiro SG, Santurio JM, Graça DL (2007). Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos. Acta Scientiae Veterinariae, 5(1): 67-71.
- Franciscato C, Lopes STA, Teixeira MMG, Monteiro SG, Wolkmer P, Garmatz BC, Paim CB (2007). Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. Ciência Rural, 37(1): 288-291.

Franke CR, Greiner M, Mehlitz D (1994). Investigation on naturally occurring *T. evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Tropica*, 58(1): 159-169.

Hunt E, Moore JS (1990). Use of blood and blood products. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 6 (1): 133-147.

Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J, Truc P (2005). Human Trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3): 491-495.

Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Mousse JLB, Neves (1996). *Manual Para Técnicos Em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 259.

Lun ZR, Desser SS (1995). Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitology Today*, 11(1): 131-133.

Nunes VLB, Oshiro ET (1990). *Trypanosoma evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5): 692.

Nunes VLB, Oshiro ET, Dorval MEC, Garcia LAM, Silva AAP, Bogliolo AR (1993). Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no pantanal sul-matogrossense. Estudo de reservatórios. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2(1): 41-44.

Oliveira TCG, Meneguim JM, Pereira EA (1989). Comportamento do *Trypanosoma evansi* (*T. equinum*) em animais de laboratório. *Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia*, 41(4): 271-277.

Queiroz AO, Samanta APL, Xavier CC, Jansen AM (2001). Specific antibody levels and antigen recognition of wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(7): 965-972.

Silva RAMS, Barros ATM, Herrera HM (1996). Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. A preliminary approach on risk factors. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux*, 48(4): 315-319.

Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR (2005). *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal, 141.

Silva FAZ, Azevedo CAV (2002). Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4: 71-78.

Stevens JR, Nunes VLB, Lanham SM, Oshiro ET (1989). Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. *Acta Tropica*, 46(2): 213-222.

Uche UE, Jones TW (1992). Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. *Journal Comparative Pathology*, 106(3): 299-309.

Wechsler DS, Kongshavn PAL (1984). Cure of *Trypanosome musculi* infection by heat-labile activity in immune plasma. *Infection and Immunity*, 44(3): 756-759.

Zanette RA, Da Silva AS, Costa MM, Monteiro SG, Santurio JM, Lopes STA (2008). Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em eqüinos no município de Cruz Alta - RS, Brasil. *Ciência Rural*, 38(5): 1468-1471.