

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**Estudo da Infecção por *Besnoitia besnoiti*: Aplicação da
Imunohistoquímica na Avaliação da Resposta Celular
Inflamatória Peri-quística**

Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

2008

A impressão desta Dissertação foi aprovada em
Comissão Coordenadora do Conselho Científico da
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
em reunião de 23 de Setembro de 2008.

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



**Estudo da Infecção por *Besnoitia besnoiti*: Aplicação da
Imunohistoquímica na Avaliação da Resposta Celular
Inflamatória Peri-quística**

Dissertação orientada pelo **Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira Leitão**, sendo co-orientadores a **Professora Doutora Maria da Conceição da Cunha e Vasconcelos Peleteiro** e a **Professora Doutora Emília de Jesus da Encarnação Valadas**

Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

2008

Os conteúdos apresentados na presente Dissertação
são da exclusiva responsabilidade do candidato
sendo, portanto, excluída a responsabilidade da
Faculdade de Medicina de Lisboa quanto ao seu conteúdo.

RESUMO

A besnoitiose bovina é uma doença infecciosa causada pelo Apicomplexa *Besnoitia besnoiti* sendo reemergente no sul da Europa. O presente trabalho visa o estudo morfológico da resposta celular inflamatória peri-quística que ocorre na pele de bovinos com besnoitiose crônica recorrendo, para isso, ao exame histológico de biópsias de pele de bovinos naturalmente infectados. Para além da classificação morfológica do tipo de resposta inflamatória, avaliou-se o número de quistos presentes na pele, por fragmento de biópsia, bem como, de forma qualitativa e quantitativa, as diferentes células envolvidas.

Foram estudadas 52 biópsias de pele contendo quistos de *B. besnoiti*, todos exibindo inflamação granulomatosa em seu redor, assumindo diversos tipos de organização celular. Assim, 34 amostras apresentaram inflamação nodular, 15 inflamação nodular discreta e, apenas três, inflamação difusa intensa. Na maioria dos casos analisados (28 em 52), o número de quistos por fragmento de biópsia foi superior a dez, o que é manifestamente indicador de elevada carga parasitária na pele.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as contagens celulares nas diferentes respostas inflamatórias, o que nos permitiu concluir pela existência de um padrão celular de resposta comum, independente da sua organização morfológica, constituído maioritariamente por linfócitos e plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e por último, neutrófilos.

A avaliação específica das sub-populações celulares que compõem os infiltrados celulares peri-quísticos foi efectuada com recurso a técnicas de imunohistoquímica. A imunomarcação realizou-se com sucesso para os linfócitos T, os linfócitos B, a sub-população de linfócitos T $\gamma\delta$ e para os macrófagos. Não foi obtida marcação para as sub-populações de linfócitos CD4+ e CD8+, apesar de várias tentativas efectuadas. O infiltrado inflamatório que rodeia o quisto é maioritariamente constituído por linfócitos T, seguindo-se os eosinófilos e os macrófagos. Os linfócitos B surgem periféricamente, em pequenos grupos e com diferenciação plasmocitóide. A sub-população T $\gamma\delta$ surge isolada e dispersa.

O presente trabalho, ao aprofundar o conhecimento sobre as lesões cutâneas da fase crônica da besnoitiose bovina, propõe-se contribuir para a compreensão da resposta imunitária do hospedeiro intermediário à infecção por *B. besnoiti*.

Palavras-chave: besnoitiose bovina; *Besnoitia besnoiti*; pele; resposta inflamatória; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Bovine besnoitiosis is an re-emergent infectious disease in the south of Europe, caused by the protozoa *Besnoitia besnoiti*. The present study aims to characterize the peri-cystic inflammatory response in the skin of chronically infected bovine using skin biopsies. Morphological classification of the inflammatory response was accomplished as well as identification and counting of type of inflammatory cells involved.

The study involved 52 skin biopsies with cysts in variable numbers, which showed granulomatous inflammatory response around the cysts, classified as follows: 34 nodular, 15 discretely nodular and only 3 were classified as intensely diffuse. For the majority of cases (28 in 52), the number of cysts per fragment of skin biopsy was higher than ten, which is certainly an indicator of a heavy parasitic skin infection.

No statistical differences were found for the cell counting parameters regarding the different types of inflammatory response, showing that there is a common reaction pattern, regardless of the cellular organisation around the cysts. Cell types involved were, by decreasing order, lymphocytes, eosinophils, macrophages and finally, the neutrophils.

Immunohistochemistry techniques were applied for characterization of cell sub-populations in peri-cystic infiltrates. Those techniques were successful for T lymphocytes, B lymphocytes, T $\gamma\delta$ lymphocytes and also for macrophages. Unfortunately and in spite of several attempts, we did not succeed in the identification of sub-populations of CD4+ and CD8+ lymphocytes. The inflammatory infiltrate around the cyst was mainly composed by T lymphocytes, followed by eosinophils and macrophages. The B lymphocytes appeared peripherally in small groups with plasmocytoid differentiation. The T $\gamma\delta$ sub-population of lymphocytes occurred isolated and dispersed all over the inflammatory infiltrate.

The present study's conclusions add to the knowledge of the cutaneous lesions in the chronic phase of bovine besnoitiosis, contributing for the understanding of the immune response against this infection.

Key-words: bovine besnoitiosis; *Besnoitia besnoiti*; skin; inflammatory response; immunohistochemistry.

À minha Família

AGRADECIMENTOS

As primeiras palavras dedico-as, naturalmente, aos meus orientadores.

Ao Doutor Alexandre Leitão é devido o meu sincero agradecimento pela orientação desta Dissertação, desde o momento em que sugeriu o tema até aos momentos finais da sua redacção. A minha gratidão estende-se aos seus bons conselhos, observações oportunas e amizade que se consolidou ao longo de todo este período.

À Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro, minha orientadora desde sempre, agradeço todo o acompanhamento ao longo da minha formação e em particular neste projecto, pelos seus ensinamentos, pela estimulação do espírito crítico e científico e pelas constantes manifestações de confiança e amizade que muito me honram.

À Professora Doutora Emília Valadas expresso o meu agradecimento pela sua co-orientação deste trabalho e pela coordenação do curso de Mestrado. Obrigado pelos excelentes momentos que nos proporcionou ao longo do curso de especialização.

Ao Professor Doutor Helder Cortes agradeço a matéria-prima desta Dissertação. Manifesto o meu reconhecimento pelos ensinamentos ministrados, pelas suas palavras de incentivo, pela amizade e pelos votos de confiança nos momentos em que o desalento parecia vencer.

Ao Professor Doutor Luís Tavares, Director do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, expresso o meu profundo agradecimento pelo acolhimento deste projecto.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel de Oliveira Soares e ao Dr. José Valente Cabeçadas quero agradecer a disponibilidade demonstrada, os sábios conselhos e o inestimável apoio na realização das imunomarcações mais difíceis.

Ao Dr. Mário Ferraz de Oliveira expresso a minha gratidão pela disponibilização do seu Serviço e pelo interesse demonstrado a este trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Correia, colega e amigo, agradeço as suas constantes manifestações de confiança e incentivo, pela força transmitida, bem como as observações oportunas que sempre trazem vontade de ultrapassar as dificuldades.

À Doutora Tânia Carvalho Barão agradeço especialmente a introdução às técnicas de imunohistoquímica. Obrigado pela amizade e companheirismo ao longo destes anos.

À Dra. Sandra Branco manifesto o meu agradecimento pelo apoio nos trabalhos de práticos de imunohistoquímica. Obrigado pelos dias passados no laboratório.

Ao Mestre Telmo Nunes e à Dra. Filipa Baptista, expresso o meu profundo agradecimento pelo auxílio na realização dos estudos estatísticos.

Aos Professores Doutores José Ferreira da Silva, Fernando Afonso e Mário Pinho agradeço o apoio pessoal que sempre recebi.

Às técnicas do nosso laboratório, Sra. D. Maria do Rosário Luís, Sra. D. Maria Augusta Luís, Sra. D. Maria Manuela Gonçalves, Dra. Iolanda Fernandes, Dra. Sandra Carvalho e Dra. Adelaide Sousa é devido o meu profundo e sincero agradecimento pelo apoio constante na realização desta Dissertação e também pelas manifestações de afecto e amizade que se vão consolidando ao longo destes anos.

Aos técnicos José F. Silva (Anatomia Patológica - C.H.L.C., E.P.E.) e Teresa Pereira (Anatomia Patológica - I.P.O.L.F.G., E.P.E.) agradeço o seu apoio altamente qualificado.

Ao Sr. Bruno Fortunato agradeço a preciosa ajuda na realização das necrópsias e pelo trabalho de campo. Obrigado pela sua amizade e lealdade.

A todos os meus muitos amigos... obrigado.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ABREVIATURAS	x
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Besnoitiose bovina.....	2
I.2. Classificação taxonómica de <i>Besnoitia besnoiti</i>	4
I.3. O género <i>Besnoitia</i>	5
I.4. Ciclo biológico de <i>Besnoitia besnoiti</i>	8
I.5. Patogenia.....	9
I.6. Distribuição geográfica da besnoitiose bovina.....	16
I.7. Distribuição geográfica da besnoitiose bovina na Europa.....	16
I.8. Diagnóstico da infecção por <i>Besnoitia besnoiti</i> em bovinos.....	17
I.8.1. Diagnóstico clínico.....	18
I.8.2. Diagnóstico laboratorial.....	19
I.8.2.1. Diagnóstico serológico.....	19
I.8.2.2. Histopatologia.....	19
I.9. Controlo da infecção por <i>Besnoitia</i> em bovinos.....	20
I.9.1. Eliminação de reservatórios.....	20
I.9.2. Luta contra vectores.....	20
I.9.3. Terapêutica.....	21
I.9.4. Vacinação.....	21
I.10. Infecção parasitária e inflamação.....	22
I.11. Imunohistoquímica.....	24
I.12. Objectivos.....	27
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS.....	28
II.1. Recolha de dados para o estudo de casos no período de 2001-2006.....	29
II.2. Técnica de biópsia de pele.....	29
II.3. Técnica histológica – Processamento e corte de tecidos.....	30
II.4. Coloração de Hematoxilina & Eritrosina (H&E).....	31

II.5. Coloração de Van Gieson.....	32
II.6. Coloração de P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff).....	32
II.7. Coloração do Vermelho do Congo.....	33
II.8. Contagem do número de quistos por fragmento.....	34
II.7. Contagem diferencial dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória peri-quística.....	35
II.8. Técnica de imunohistoquímica.....	36
II.9. Análise estatística.....	42
CAPÍTULO III - RESULTADOS.....	43
III.1. Resposta inflamatória.....	44
III.1.1. Classificação do tipo de resposta inflamatória.....	44
III.1.2. Estudo da parede do quisto.....	48
III.2. Número de quistos por fragmento.....	51
III.3. Contagem diferencial dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória peri-quística.....	53
III.4. Imunohistoquímica.....	58
III.4.1. Linfócitos T (CD 3 +).....	59
III.4.2. Linfócitos B (CD 79 α cy+).....	60
III.4.3. Linfócitos T $\gamma\delta$ (WC1+).....	62
III.4.4. Macrófagos.....	63
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO.....	65
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES.....	73
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem microscópica desenhada em câmara clara. Museu de Medicina. Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Lisboa.....	3
Figura 2 – Microfotografia obtida por microscopia electrónica de transmissão da porção central de um quisto de <i>B. besnoiti</i> onde se observam vários bradizoítos mergulhados na matriz granular.....	7
Figura 3 – Aspecto microscópico da pele onde são visíveis numerosos quistos, alguns dos quais com exuberante reacção inflamatória.....	11
Figura 4 – Aspecto macroscópico das lesões na fase crónica da doença.....	13
Figura 5 – Quistos sub-conjuntivais na fase crónica da doença.....	14
Figura 6 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Formação de granulomas em torno dos quistos.....	45
Figura 7 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Infiltrado celular e formação de células gigantes.....	46
Figura 8 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Formação de células gigantes.....	46
Figura 9 – Reacção granulomatosa de tipo nodular discreto.....	47
Figura 10 – Reacção granulomatosa difusa intensa.....	47
Figura 11 – Coloração pelo P.A.S.. Positividade para as camadas mais internas da parede do quisto.....	48
Figura 12 – Coloração pelo P.A.S.. Positividade para as camadas mais internas da parede do quisto.....	49
Figura 13 – Coloração pelo Van Gieson. Discreta afinidade da parede do quisto para esta coloração.....	49
Figura 14 – Coloração pelo Van Gieson. Discreta afinidade da parede do quisto para esta coloração (pormenor da figura 13).....	50
Figura 15 – Coloração pelo Vermelho do Congo. A parede do quisto não apresenta afinidade para esta coloração.....	50
Figura 16 – Macrófagos e células gigantes de Langanhs.....	53
Figura 17 – Eosinófilos.....	54

Figura 18 – Linfócitos e Plasmócitos.....	54
Figura 19 – Neutrófilos.....	55
Figura 20 – Infiltrado celular peri-quístico com numerosos linfócitos T (CD3+).....	59
Figura 21 – Infiltrado celular peri-quístico com numerosos linfócitos T (CD3+).....	60
Figura 22 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos B (CD79 α cy+).....	61
Figura 23 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos B (CD79 α cy+).....	61
Figura 24 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos T (WC1+).....	62
Figura 25 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos T (WC1+).....	63
Figura 26 – Infiltrado celular peri-quístico revelando numerosos macrófagos (ac. anti-monócitos/macrófagos+).....	64
Figura 27 – Infiltrado celular peri-quístico revelando numerosos macrófagos (ac. anti-monócitos/macrófagos+).....	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição das diferentes manifestações morfológicas da resposta granulomatosa.....	45
Gráfico 2 – Distribuição do número de quistos por fragmento de biópsia.....	51
Gráfico 3 – Distribuição em percentagem do número de células de resposta inflamatória em função do seu valor médio, para cada um dos diferentes tipos de resposta inflamatória granulomatosa.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados e para os quais foi obtida marcação positiva.....	37
Tabela 2 – Protocolo utilizado para imunomarcação de linfócitos T CD4+ e CD8+.....	38
Tabela 3 – Métodos de recuperação antigénica, diluições e tempos de incubação dos anticorpos primários utilizados.....	41
Tabela 4 – Distribuição do número de quistos por padrão morfológico de resposta.....	52
Tabela 5 – Medidas de tendência central (média e desvio padrão) para as contagens diferenciais dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória.....	56

ABREVIATURAS

ABC – *avidin-biotin-complex* – complexo avidina-biotina

C5a – anafilatoxina do componente C5 da cascata do complemento

CCL2 – *chemokine (C-C motif) ligand 2* – ligando da quimiocina 2; nova designação para MCP-1

CCL5 – *chemokine (C-C motif) ligand 5* – ligando da quimiocina 5

CCL-11 – *chemokine (C-C motif) ligand 11* – nova designação para eotaxina

CD – *cluster of differentiation* – *cluster* de diferenciação

C.H.L.C., E.P.E. – Centro Hospitalar de Lisboa Central, Entidade Pública Empresarial

Da – dalton

DAB – diaminobenzidina

DNA – ácido desoxirribonucleico

EBP – estreptavidina-biotina-peroxidase

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas

H&E – hematoxilina e eritrosina

IHQ – imunohistoquímica

IFN- γ – interferão gama

ITS1 – *internal transcribed spacer 1* – região espaçadora transcrita 1

IL – interleucina

I.P.O.L.F.G., E.P.E. – Instituto Português de Oncologia de Lisboa de Francisco Gentil,

Entidade Pública Empresarial

MCP-1 – *monocyte chemotactic protein-1* – proteína quimiotáctica de monócitos-1

N – normalidade

PAS – *periodic acid-Shiff* – ácido periódico de Shiff

PBS – *phosphate buffer saline* – tampão de fosfato de sódio

p/v – peso-volume

RANTES – *regulated upon activation T cell expressed and secreted* – quimiocina

regulada sob activação de linfócitos T, expressada e secretada

rDNA – ácido desoxirribonucleico ribossomal

RT-PCR – *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* – reacção em cadeia de

polimerase recorrendo à transcriptase reversa.

Th – linfócito T auxiliar

TRIS – trishidroximetilaminometano

VIH – vírus da imunodeficiência humana

VMRD – *Veterinary Medical Research & Development*

18S – molécula de ácido ribonucleico ribossómico

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1. Besnoitiose bovina

A besnoitiose bovina foi reconhecida como doença por Cadéac, em França, em 1884¹, sendo-lhe atribuída a designação de elefantíase ou anasarca dos bovinos. Em 1912, confirmou-se a sua etiologia parasitária, com a identificação de grandes e numerosos quistos de bradizoítos na derme de bovinos². Na altura, foi denominada sarcosporidiose cutânea. Pouco tempo depois surgiam trabalhos sobre a sua distribuição noutras regiões, nomeadamente em Portugal, sendo a descrição portuguesa a primeira a considerar as implicações económicas da besnoitiose bovina na produção animal³.

Em 1915, os investigadores Enrico Franco, Professor e Director do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Lisboa, e Ildefonso Borges, Professor da Escola de Medicina Veterinária e Assistente do Instituto Câmara Pestana publicaram um extenso trabalho que resumia 30 anos de investigação sobre a besnoitiose bovina (figura 1). Neste trabalho foram relatadas importantes observações sobre a doença em Portugal, as suas manifestações clínicas, o quisto parasitário e a reacção do hospedeiro à presença do quisto na pele, denominado por “tecido de reacção peri-quístico”^{3,4}. Franco e Borges propuseram, igualmente, a inclusão deste parasita num novo género, *Besnoitia*, tal como proposto por Brumpt (referido em comunicação de Henry, 1912)⁵, denominando-se assim o parasita por *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912)⁶.

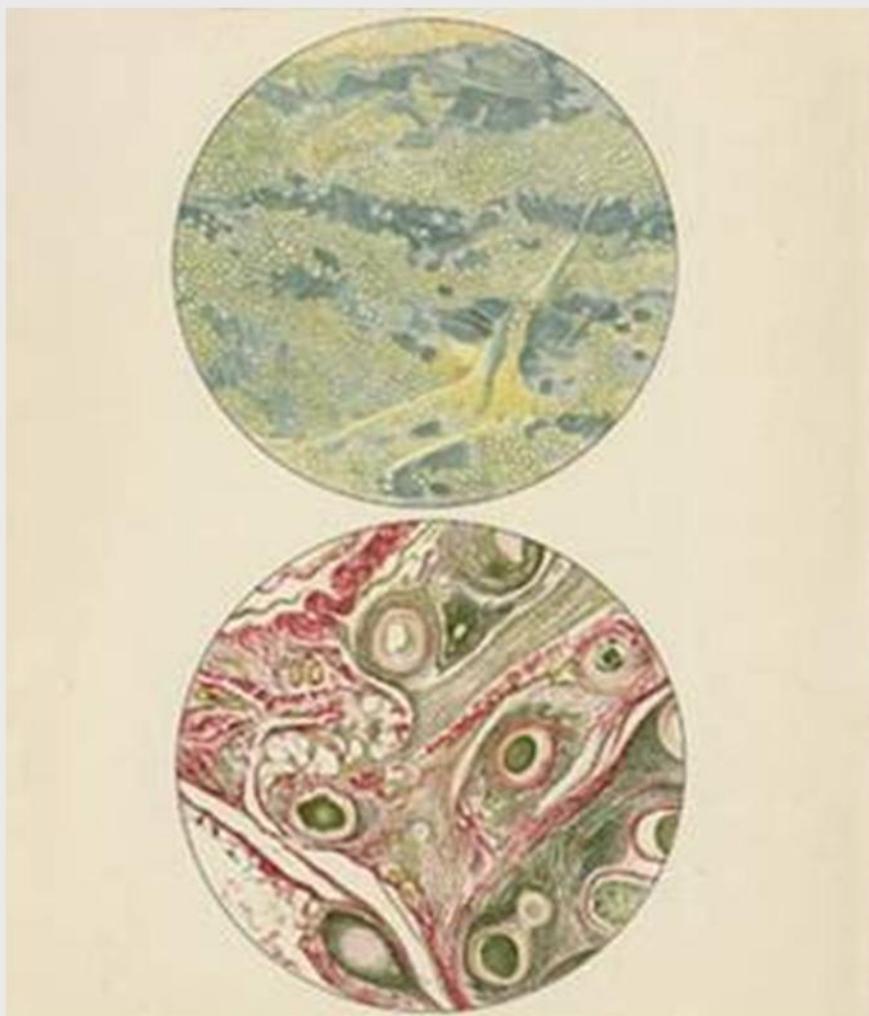


Fig. 1 – Imagem microscópica desenhada em câmara clara.
Museu de Medicina. Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de
Medicina de Lisboa (www.fm.ul.pt).

O trabalho realizado no âmbito do estudo deste parasita foi escasso nos últimos cem anos. O bovino é o hospedeiro intermediário do protozoário *Besnoitia besnoiti*. Permanece por identificar o hospedeiro definitivo, podendo mesmo questionar-se a sua existência bem como, a existência de outros hospedeiros intermediários. Estes conhecimentos são fundamentais para o correcto entendimento da epidemiologia desta doença.

I.2. Classificação taxonómica de *Besnoitia besnoiti*

De acordo com Eckert *et al.*⁷, *Besnoitia besnoiti* é classificada no reino Animal, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidiida, pertencendo à família *Toxoplasmatidae*, tal como acontece com os géneros *Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia*, responsáveis por graves doenças no homem e em muitas espécies de animais domésticos e silvestres^{8,9,10,11}. No género *Besnoitia* são reconhecidas actualmente nove espécies. O conhecimento da relação do género *Besnoitia* com outras espécies de Coccidia formadoras de quistos é escassa, embora o agrupamento dos géneros *Besnoitia*, *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma* na subfamília *Toxoplasmatinae* seja geralmente aceite^{12,13}. A análise filogenética com base em sequências nucleotídicas tem contribuído para a classificação taxonómica. O género *Besnoitia* não foi disso excepção, tendo Ellis¹⁴ procedido à análise da relação filogenética entre *Besnoitia*, *Eimeria*, *Frenkelia*, *Hammondia*, *Isospora*, *Neospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* com base nas respectivas sequências de rDNA. Desta análise filogenética resulta a apresentação do género *Besnoitia* como grupo muito próximo do conjunto que inclui os géneros *Hammondia*, *Neospora* e *Toxoplasma*.

Nas análises filogenéticas entre as entidades incluídas no género *Besnoitia* foram utilizadas as sequências disponíveis de rDNA do 18S e do ITS1 de diversas Coccidia formadoras de quistos e também as sequências disponíveis de *Besnoitia* isolada de bovinos e de impala da República da África do Sul, bem como de cabra oriunda do Quénia. O facto de *B. besnoiti* e *B. caprae* apresentarem igual sequência de ITS1 levou Ellis¹⁴ a questionar se efectivamente são entidades diferentes ou se na realidade não corresponderá *B. caprae* a uma população de *B. besnoiti*. No entanto, o mesmo autor alertou para a necessidade de se conhecerem sequências de DNA de outras entidades do mesmo grupo antes de se proceder a qualquer alteração à

classificação em vigor.

A microscopia electrónica revelou que *Besnoitia* apresenta uma ultra-estrutura característica dos parasitas formadores de quistos, designadamente o corpo conóide, róprias, microtúbulos, micronemas e um anel polar anterior¹⁵⁻¹⁷. Sheffield¹⁵ salientou a grande semelhança morfológica entre *B. jellisoni* e *Toxoplasma gondii*. Alguns autores ainda consideram *Besnoitia* como sendo filogeneticamente muito próximo do género *Toxoplasma*¹⁸⁻²⁰. Os isolamentos e descrições de espécies do género *Besnoitia* de diferentes hospedeiros intermediários²¹⁻²⁵ constituirão importante contribuição para futuros trabalhos da filogenia deste género.

1.3. O género *Besnoitia*

No género *Besnoitia* proposto por Franco e Borges⁴ reconhecem-se hoje nove espécies que, salvo algumas excepções, cada uma parasita uma única espécie de hospedeiro intermediário. O hospedeiro definitivo para a maioria das espécies parasitárias deste género permanece por identificar. Excepção feita para *B. wallacei*^{12,26}, *B. darlingi*^{22,27,28} e *B. oryctofelisi*²⁹, cujo hospedeiro definitivo se demonstrou ser o gato³⁰.

Assim, *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912)⁶ parasita bovinos, antílopes e, experimentalmente, gerbos, coelhos e hamsters; *Besnoitia bennetti* parasita o cavalo, o burro e os seus híbridos; *B. wallacei*^{12,26} e *Besnoitia jellisoni* são parasitas do rato (*R. norvegicus*); *Besnoitia darlingi*^{22,27,28} é parasita da sarigueia (*Didelphis marsupialis*); *Besnoitia tarandi* é parasita da rena; *Besnoitia caprae*¹⁷ é parasita da cabra; *B. oryctofelisi*²⁹ do coelho e *Besnoitia akodoni*²³ do rato-do-mato (*Akodon montensis*).

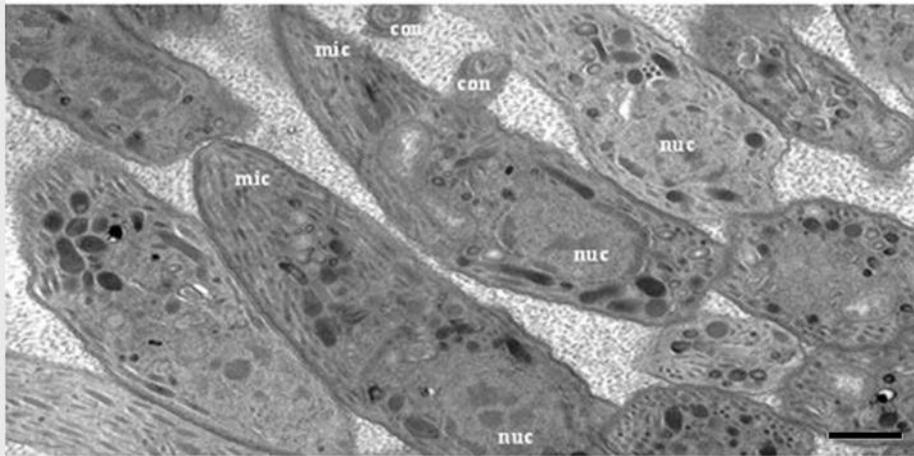
As diferenças morfológicas entre as espécies do género *Besnoitia* são pouco definidas³⁰, sendo difícil distingui-las apenas com base na sua observação microscópica. Assim sendo, tem sido necessário recorrer às sequências de DNA disponíveis em bases de dados para auxiliar na distinção entre as diferentes espécies de *Besnoitia*^{14,22,23}.

Os taquizoítos em cultura medem 5 a 9 µm de comprimento por 2 a 5 µm de largura³¹ e caracterizam-se por um corpo conóide, micronemas, róptrias, microtúbulos, grânulos densos e um único núcleo¹⁶. Os micronemas, que surgem por todo o citoplasma do taquizoíto, predominam na região anterior ao núcleo. Sheffield¹⁵ contabilizou 22 microtúbulos em *Besnoitia jellisoni*.

Em determinados cortes foram observadas até 7 róptrias. Algumas estendem-se para a região posterior do núcleo e o seu conteúdo apresenta-se electrodenso. A porção terminal das róptrias mede até 225 nm de diâmetro¹⁶. O núcleo, com forma oval, surge com localização ligeiramente posterior ao centro do parasita¹⁷.

Na observação da ultra-estrutura dos quistos de *Besnoitia besnoiti*, com dimensões variando entre 250 e 400 µm de diâmetro³, muito semelhantes às descritas para *B. akodonti*²¹, foram identificadas três camadas na parede do quisto (do exterior para o interior): uma membrana externa (primeira camada); uma camada intermédia electrodensa contendo os núcleos e citoplasma da célula hospedeira (segunda camada) e a parede do vacúolo parasitóforo (terceira camada). A segunda camada exhibe estrutura granular e encontra-se encostada ao núcleo da célula hospedeira e retículo endoplasmático. Identifica-se um conjunto de pequenas vesículas sob a membrana do vacúolo parasitóforo que contém os bradizoítos. Os bradizoítos libertados dos quistos medem de 4,5 a 8,4 µm de comprimento por 1 a 1,8 µm de largura^{3,33}. A observação de bradizoítos por microscopia electrónica de transmissão revelou numerosos micronemas,

amilopectina, corpos que se assemelham a lípidos, róptrias e um núcleo na porção posterior, cujas



**Fig. 2 – Microfotografia obtida por microscopia electrónica de transmissão da porção central de um quisto de *B. besnoiti* onde se observam vários bradizoítos mergulhados na matriz granular³².
nuc = núcleo; mic = micronemas; con = corpo conóide. Barra = 0,5 µm.**

dimensões ocupam aproximadamente metade do comprimento do bradizoíto (figura 2). Os numerosos micronemas, com até 296 nm de comprimento e 38 nm de largura, contêm material de natureza electrodensa, e apresentam, predominantemente, localização anterior ao núcleo. As róptrias revelam conteúdo electrodenso medindo, aproximadamente, 200 nm de largura. Em alguns taquizoítos foram observadas 8 róptrias, estando presentes na maioria dos cortes, uma ou duas³⁰. Os numerosos grânulos de amilopectina localizam-se na área posterior ao núcleo. Não foram observados corpos enigmáticos em mais de 100 bradizoítos de *B. besnoiti* estudados³⁰, em oposição aos 15 corpos enigmáticos que puderam ser observados num único corte em *B. akodonti*²³.

I.4. Ciclo biológico de *Besnoitia besnoiti*

O ciclo de vida de espécies do género *Besnoitia* é descrito em poucos trabalhos científicos, embora todos eles o refiram como um ciclo heteroxeno. Wallace e Frenkel³⁴ e Frenkel¹² demonstraram ser o gato o hospedeiro definitivo de *Besnoitia wallacei* e serem ratazanas e ratos os seus hospedeiros intermediários. Smith e Frenkel^{27,28} identificaram o gato como hospedeiro definitivo de *Besnoitia darlingi*, que teria como hospedeiros intermediários alguns roedores, morcegos, lagartos e sarigueias¹⁹. O ciclo de vida de *B. besnoiti* permanece ainda por esclarecer: segundo Diesling *et al.*³⁵, o gato não parece ser o hospedeiro definitivo desta espécie, estando descritos vários ruminantes, tais como bovinos, impalas e gnu, como hospedeiros intermediários³⁶. Está demonstrada a transmissão da infecção por *B. besnoiti* entre bovinos por picadas de insectos hematófagos³⁷.

Passado mais de um século após o reconhecimento dos primeiros casos clínicos¹, muito pouco se continua a saber sobre o modo de transmissão da doença. Peteshev *et al.*³⁸, tendo alimentado gatos com tecidos de bovinos infectados com *B. besnoiti* e encontrado oocistos nas fezes, sugeriram serem o gato doméstico (*Felis catus*) e o gato selvagem africano (*Felis libyca*) os hospedeiros definitivos de *B. besnoiti*. Contudo, dada a não repetibilidade destes resultados e a dúvida sobre o estado higio-sanitário dos gatos utilizados, permanece o desconhecimento sobre o hospedeiro definitivo de *B. besnoiti*^{18,33,35,39,40-43}.

A grande maioria dos casos de besnoitiose bovina surge durante os meses de Verão^{44,45}. O facto de serem os meses do ano com maior densidade populacional de insectos hematófagos parece salientar a importância dos vectores mecânicos na disseminação de *Besnoitia* entre os bovinos³¹. Trabalhos experimentais confirmaram esta hipótese para *Glossina brevipalpis*⁴⁴,

Tabanus dentricornis, *T. taenicola*, *Stomoxys* spp., *Siphona*, *Haematobia* e *Culex simsoni*³⁷, permanecendo no entanto desconhecido se outros parasitas hematófagos artrópodes a podem veicular.

Está igualmente demonstrada a transmissão do parasita pela utilização de agulhas. Este facto alerta para a importância epidemiológica da transmissão iatrogénica³⁷.

I.5. Patogenia

A besnoitiose bovina constitui-se como uma doença que atinge animais adultos. Hofmeyr⁴⁶, em vasto trabalho desenvolvido na República da África do Sul não encontrou qualquer animal doente com idade inferior aos dezoito meses. A única excepção referida na bibliografia parece ser a de dois casos de doença encontrados por Bigalke³⁷.

Quando a infecção surge numa exploração de bovinos, cerca de 10% do efectivo acabará por desenvolver sintomatologia responsável por graves prejuízos económicos³¹. Os animais doentes perdem peso, algumas fêmeas abortam, a produção de leite decresce consideravelmente, os touros tornam-se estéreis e as peles perdem o valor comercial⁴⁷. Não parece haver diferenças na susceptibilidade entre raças ou sexos. Franco e Borges³ referem a doença em animais de raça Alentejana e de raça Brava. Leitão⁴⁸ regista a ocorrência da doença principalmente no Sul de Portugal e predominantemente em animais de raça Alentejana. Pols e Bigalke^{31,37} referem ser a raça Afrikaner tão susceptível como as raças Hereford, Holstein-Frísia, Shorthorn, Brâmane ou animais cruzados. Juste *et al.*⁴⁹ e Irigoien *et al.*⁵⁰ verificaram morbilidade em animais de raça Holstein-Frísia no País Basco.

O curso da patogenia na besnoitiose bovina segue o quadro geral da maioria das doenças infecciosas. Distinguem-se uma fase inicial, de carácter agudo e de curta duração, na qual ocorre parasitémia, e uma fase subsequente, de carácter crónico, mais tardia e que se prolonga no tempo. A fase crónica é caracterizada pela presença de elevado número de quistos, sendo que os tecidos parasitados são os mais superficiais, de que se destacam a derme (figura 3), tecidos subcutâneos, e tecido conjuntivo da esclera. Os tecidos conjuntivos mais profundos e outros órgãos, raramente se encontram parasitados, com excepção do perióstio.

Dada a dificuldade em reproduzir experimentalmente casos clínicos de besnoitiose bovina^{37,47,51,52} e dado o facto de os sintomas iniciais se confundirem com outras situações patológicas ou não serem identificados na exploração, a patogenia das fases iniciais da doença nos bovinos foi um aspecto tardiamente caracterizado. Dois factores possibilitaram um melhor esclarecimento das ocorrências durante esta fase inicial da besnoitiose bovina: a descoberta da susceptibilidade dos coelhos à inoculação com bradizoítos deste parasita^{44,47,51,53}, de que estes adquirem lesões muito semelhantes às encontradas em bovinos, e de que estes são susceptíveis de desenvolver quadro clínico quando inoculados com elevado número de taquizoítos provenientes de culturas celulares ou de tecidos de coelho com elevado número de formas proliferativas^{37,54}.

A inoculação experimental de elevado número de parasitas permite acompanhar a evolução do estado clínico na fase aguda da doença e as lesões resultantes em animais que sucumbem, geralmente entre os dias 8 e 11 após a inoculação de *B. besnoiti*^{55,56}. O período de incubação varia entre 6 e 10 dias³¹ persistindo a febre por 3 a 6 dias, com a temperatura rectal a poder ultrapassar os 41 °C. Durante este período correspondente à fase aguda, a parasitémia é elevada³⁷. Nesta fase o animal apresenta-se anorético, deprimido, indiferente ao meio que o rodeia e com extrema dificuldade respiratória.

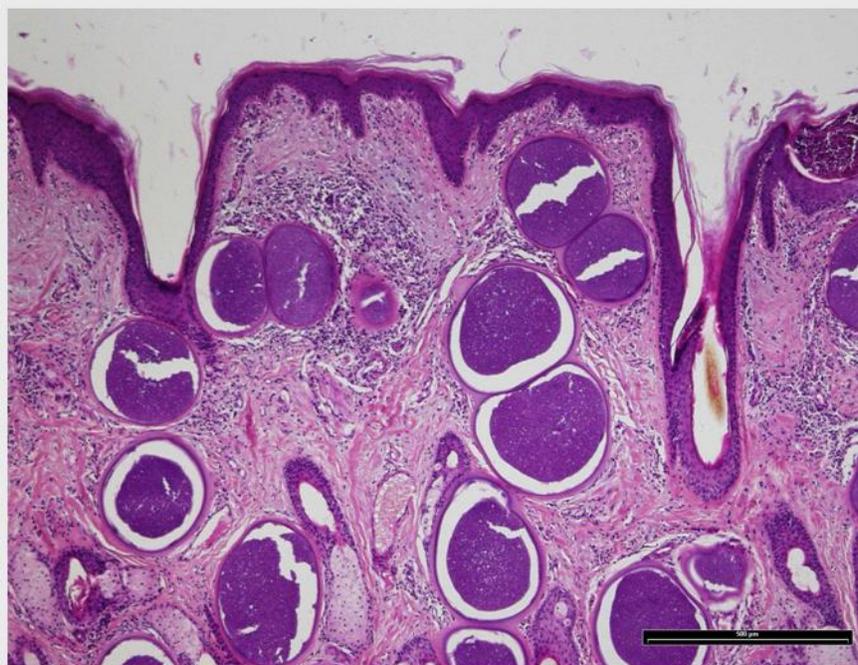


Fig. 3 – Aspecto microscópico da pele onde são visíveis numerosos quistos, alguns dos quais com exuberante reacção inflamatória periférica. H&E. Barra 500 µm.

Estes são os sintomas mais evidentes. É igualmente frequente observarem-se nesta fase, ou pouco depois, os linfonodos hipertrofiados devido a edema, sendo também, o edema constante nas extremidades dos membros. Os animais apresentam dificuldade em movimentar-se e evidenciam fotofobia, procurando refúgio nas sombras das árvores. Pode ainda observar-se anasarca, acompanhada de congestão e de focos correspondentes a necrose cutânea disseminados. Na pele observam-se petéquias, equimoses e sufusões, principalmente, nas extremidades⁵⁶. A parede dos vasos do tecido subcutâneo exhibe pequenos focos hemorrágicos. A íntima das veias e das artérias apresenta-se irregular e coberta de material de coloração rosa acinzentada a avermelhada. As veias e artérias de grande calibre exibem aspecto normal. Neste animais é frequente encontrar rinite, com petéquias disseminadas pelas fossas nasais⁵⁵. Os linfonodos encontram-se congestionados, edemaciados e hemorrágicos, surgindo também áreas localizadas de degenerescência e necrose muscular principalmente nos músculos dos membros. Os pulmões e

a traqueia encontram-se congestionados e com edema, apresentando algumas petéquias disseminadas de forma irregular por todo o parênquima pulmonar. Nestes animais podem-se encontrar pequenas áreas hemorrágicas nos mais diversos tecidos, predominantemente, no coração, rim, glândulas adrenais, abomaso, laringe e faringe⁵⁶.

Nos animais que não sucumbem a esta fase da doença, ocorre recuperação da temperatura normal, a afecção respiratória é ultrapassada, e ao edema generalizado segue-se o espessamento cutâneo, com formação de grande número de quistos na derme. É, assim, atingida a fase crónica da doença que, com progressiva gravidade, acompanhará o animal durante toda a sua vida.

Se na fase aguda estão presentes taquizoítos que invadem todo o tipo de células, em especial fibroblastos e células endoteliais onde se multiplicam (o que resulta na rápida destruição das células hospedeiras, com libertação de taquizoítos que invadem novas células), na fase crónica, por mecanismos ainda não esclarecidos, estas células de rápida multiplicação dão origem a quistos de grande dimensão especialmente na derme³, tecido subcutâneo, esclera^{57,58}, mucosa nasal, perióstio⁵⁵ e escroto^{56,59}. A patogenia e sinais clínicos observados na fase crónica da doença, estão assim directamente relacionados com o que *per se* representa o número e localização de quistos no animal³⁷.

O número de quistos é muito elevado em toda a extensão da pele. Em consequência do grande espessamento cutâneo e da perda de elasticidade, surgem soluções de continuidade na pele, com o aparecimento de feridas, principalmente na proximidade das articulações, onde se forma exsudado sero-sanguinolento (figura 4). Quebrada a integridade cutânea, estas feridas são alvo de proliferação bacteriana e, de acordo com a área geográfica e a época do ano, observam-se frequentemente miíases por deposição de larvas de insectos. No conjunto, as alterações cutâneas

descritas são acompanhadas da rarefacção da cobertura pilosa e de elevada friabilidade da pele. A dimensão do traumatismo cutâneo depende quer da violência da agressão quer da condição cutânea. Desta relação, pode resultar a simples queda de pêlo e descamação superficial ou, então, solução de continuidade muitas vezes complicada por infecção secundária³¹.



Fig. 4 – Aspecto macroscópico das lesões na fase crónica da doença.

A formação de quistos sub-conjuntivais possibilita a sua identificação a olho nu, tendo este aspecto sido considerado como meio de diagnóstico da doença⁵⁷ e alvo de trabalho publicado por Sannusi⁵⁸ que o propõe como forma prática de diagnosticar a infecção em bovinos (figura 5).



Fig. 5 – Quistos sub-conjuntivais na fase crónica da doença.

Nas fêmeas gestantes que padecem de besnoitiose, é frequente que o processo infeccioso resulte em aborto⁴⁹. Em animais cuja gestação ocorre no estado crónico da besnoitiose, a gestação e o parto decorrem normalmente, salvo se a condição corporal estiver muito degradada. Aquando da amamentação, verificam-se lesões ao nível dos tetos, uma vez que estes também apresentam elevado número de quistos. A característica espuma branca que normalmente se observa em redor da boca do vitelo em cada amamentação, aparece com cor avermelhada, devido a hemorragias, manifestando a progenitora relutância em amamentar. Após a primeira toma de colostro, estes vitelos, dada a ingestão de anticorpos maternos, apresentam um título de anticorpos anti-*B. besnoiti* igual ao da progenitora⁶⁰.

No touro, as alterações necróticas e congestivas ocorrem também ao nível do testículo, onde se salienta o aparecimento de focos de necrose que atingem muitos tubos seminíferos e são,

em parte, responsáveis por infertilidade nos machos^{56,59,61}. Para além disso, as lesões cutâneas presentes nas extremidades dos membros nestes animais dificultam a cobrição natural com consequente infertilidade pela inviabilização da cópula.

Apesar do dramático quadro clínico que ocorre na fase aguda, a mortalidade nesta fase não é elevada. Quando tal acontece, é na maioria dos casos, resultado da instalação de uma infecção oportunista³⁷. A mortalidade encontrada ocorre principalmente na fase crónica como corolário quer da caquexia, resultado do comprometimento da mobilidade do animal e consequente diminuição da ingestão de alimento, quer de infecções secundárias que entretanto se instalam³¹. É significativo o número de animais em que ocorre diminuição do processo inflamatório, embora se mantenha a esclerodermia por toda a vida, com dificuldades de deslocação. Nestes indivíduos cronicamente infectados é muito elevado o número de quistos com bradizoítos viáveis, o que constitui elevado risco de transmissão do parasita. Ainda que alguns animais aparentem total recuperação, pode-se assistir à manutenção de um elevado número de quistos na pele, sobretudo nas zonas inferiores (extremidade distal dos membros, escroto), ou seja, aquelas que aquando da fase aguda da doença foram maior alvo de edema.

Em animais com primo-infecção ocorrida há 10 anos foi possível encontrar bradizoítos viáveis³¹, presumindo-se que assim permaneçam ao longo da vida do hospedeiro. Nestes animais pode-se observar crescimento do pêlo, e os quistos presentes na pele ou não apresentam qualquer reacção inflamatória em seu redor ou esta, a existir, é muito reduzida.

I.6. Distribuição geográfica da besnoitiose bovina

Apesar de as primeiras descrições de besnoitiose bovina terem sido europeias, foi em África que a doença recebeu destacada atenção. A primeira referência de besnoitiose bovina no continente africano surgiu em 1941⁴⁶. Várias comunicações pessoais surgem na bibliografia, onde se assinala a ocorrência da doença na África do Sul³¹, na Nigéria^{61,62} e no Sudão⁶³. Também do Ruanda apareceram relatos da doença⁶⁴. Nas antigas Províncias Ultramarinas Portuguesas são conhecidos os trabalhos de Ferreira^{41,59,65} na sequência da observação de casos de besnoitiose bovina em Moçambique. Inúmeros são os relatos orais da ocorrência da doença em Angola embora até à data, não tenha sido encontrada qualquer publicação que com ela se relacione (Victor Paes Caeiro, comunicação pessoal). Da Ásia surgiram, igualmente, comunicações científicas que referem a doença no Kazaquistão^{38,66,67}. No Médio Oriente são conhecidos casos de besnoitiose bovina em Israel^{52,68,69}, distribuindo-se a morbilidade por todo o País, o que motivou intensa investigação da doença e do seu agente por Shkap⁷⁰⁻⁷⁴.

I.7. Distribuição geográfica da besnoitiose bovina na Europa

A observação de casos de besnoitiose bovina em Portugal ocorreu ao mesmo tempo que as primeiras observações realizadas em França^{1,2}. Os investigadores Enrico Franco e Ildefonso Borges publicaram o primeiro trabalho sobre besnoitiose bovina em Portugal^{3,4}. Neste relevante trabalho, citação de referência para todos os que escreveram sobre besnoitiose bovina, encontram-se considerações epidemiológicas importantes, salientando-se a preponderância de casos clínicos durante o Verão. Constata-se que as recomendações sanitárias relativamente aos casos de besnoitiose bovina de então correspondem *ipsis verbis* às recomendações actuais do

manual da FAO destinado à inspecção de carnes nos países em vias de desenvolvimento⁷⁵. Neste trabalho, para além de serem referidas as dificuldades no acto de inspecção sanitária em matadouro, regista-se que a besnoitiose bovina se apresenta limitada às regiões do Alentejo e Ribatejo.

Em 1949, a doença é novamente alvo de notícia⁴⁸. É referido o aparecimento desta morbilidade nos matadouros e as consequentes reprovações totais daí resultantes.

Estranhamente, ao período acima referido segue-se um longo hiato, durante o qual nada foi publicado ou referido em Portugal sobre a doença. Este longo intervalo, que lançou no esquecimento a existência da própria doença, foi interrompido pelo diagnóstico de um caso de besnoitiose bovina na região de Montemor-o-Novo, em 1991, pelos médicos veterinários Malta & Silva⁷⁶. Desde essa altura, são inúmeros os relatos de novos casos da doença no Alentejo onde, até ao momento, parece estar circunscrita⁷⁷⁻⁸⁰.

I.8. Diagnóstico da infecção por *Besnoitia besnoiti* em bovinos

O diagnóstico de besnoitiose bovina nem sempre é possível em termos clínicos. Ainda que a manifestação cutânea seja evidente, confunde-se por vezes com processos de sarna ou tinha³¹. Assim, é imperativo recorrer a métodos auxiliares de diagnóstico que permitam validar a suspeita clínica⁴⁹.

É importante referir que nem todos os animais infectados apresentam sinais clínicos. Apesar de infectados, os animais poderão nunca manifestar doença, o que não lhes retira importância epidemiológica, uma vez que podem ser portadores de quistos na pele³⁷.

I.8.1. Diagnóstico clínico

Na fase inicial e aguda da doença é difícil concluir estar-se perante um caso de besnoitiose bovina, pelo facto de a sintomatologia se assemelhar à de uma pneumonia. Nesta fase observa-se, principalmente, febre e dispneia. Assim sendo, e para que se possa de alguma maneira confirmar a possibilidade de se estar perante um caso de besnoitiose, é de especial importância atender ao conhecimento das doenças que afectam a exploração e qual a sua frequência. Primeiramente, a constatação de que se está numa exploração ou numa área geográfica onde ocorrem animais com besnoitiose é o principal factor para a inclusão da besnoitiose na lista de diagnósticos diferenciais. A suspeita é confirmada pela generalização do processo, que poderá permitir o reconhecimento de quistos na conjuntiva.

No estado crónico da doença e em algumas das situações de infecção subclínica podem, como vimos, observar-se macroscopicamente pequenas formações nodulares na conjuntiva, correspondentes a quistos do parasita, com dimensões de 300 a 500 μm ^{37,58}. Quando os quistos se encontram muito próximos, formam verdadeiros cachos, que no seu conjunto adquirem dimensões superiores a um milímetro. Tal informação constitui um auxílio importante no diagnóstico clínico a olho nu, embora não dispense a observação microscópica. As lesões cutâneas generalizadas por todo o organismo são mais notórias e evidentes. Destaca-se o espessamento cutâneo, que dificulta ou mesmo inviabiliza a realização de uma prega de pele. Em muitas e mais ou menos extensas áreas cutâneas, observa-se alopecia, e a pele apresenta-se muito friável. A besnoitiose bovina não origina qualquer prurido e aquando de choques ou de traumatismos em qualquer superfície ocorre queda de pêlo, descamação cutânea e formação de ferida. Esta situação é muito frequente quando os animais entram nas mangas de contenção que nos dias de hoje equipam a maior parte das explorações pecuárias.

I.8.2. Diagnóstico laboratorial

Embora o quadro clínico da besnoitiose seja relativamente evidente e, conhecendo-o, seja improvável não o considerar, é exigível que se proceda a um diagnóstico diferencial para afastar a possibilidade de se estar perante qualquer outra afecção, com consequências na pele e no estado geral do animal.

I.8.2.1. Diagnóstico serológico

A detecção de anticorpos específicos constitui um importante meio de diagnóstico da infecção por *B. besnoiti*. A prova serológica mais utilizada no diagnóstico de infecção é o teste de imunofluorescência indirecta (IFI)^{68,69}. A IFI, caracterizando-se por sensibilidade e especificidade elevadas⁶⁹, é frequentemente sugerida como prova serológica de referência^{81,82}. O antígeno mais utilizado é constituído por taquizoítos inteiros de *B. besnoiti* provenientes de culturas *in vitro*.

I.8.2.2. Histopatologia

Reconhecido o tropismo de *B. besnoiti* para a derme, é igualmente este o órgão de eleição para o diagnóstico da doença. Em situações de besnoitiose no estado crónico, é muito elevado o número de quistos de *B. besnoiti* presentes na pele. A observação de cortes histopatológicos ao microscópio óptico, permite distinguir com facilidade os quistos dos de outros géneros de Apicomplexa que infectam bovinos. Essa constatação levou a que desde as primeiras observações se recorresse à histopatologia de biópsias de pele como forma de diagnóstico da doença²⁻⁴. Contudo, nas formas sub-clínicas o diagnóstico histopatológico poderá ter limitações. Para estes casos, Cortes *et al.* desenvolveram um método mais sensível para o diagnóstico da infecção, recorrendo à amplificação das sequências ITS1 rDNA por RT-PCR a partir de biópsias de pele⁸³.

I.9. Controlo da infecção por *B. besnoiti* em bovinos

Muitos fármacos foram testados em culturas celulares infectadas com *B. besnoiti*^{73,74,84}. Contudo e até ao momento, não é conhecido qualquer tratamento com resultados satisfatórios em animais infectados^{49,85,86}. Deste modo, o controlo da infecção poderá, em determinadas situações, depender da vacinação com *B. besnoiti* cujo elevado número de passagens *in vitro*, atenuou a sua virulência^{87,88} ou com *B. besnoiti* isoladas de antílope⁸⁹. Por último, a identificação e eliminação de animais infectados³¹ bem como a luta contra os vectores³⁷ asseguram, em parte, o controlo da infecção por *Besnoitia* em bovinos.

I.9.1. Eliminação de reservatórios

A eliminação de animais infectados, principalmente os doentes, reveste-se da maior importância. Tais animais possuem um número elevado de quistos, o que os torna epidemiologicamente importantes na propagação da infecção^{37,58}, pela acrescida probabilidade de insectos vectores ingerirem e transmitirem bradizoítos no momento da picada.

I.9.2. Luta contra vectores

O controlo de vectores constitui um factor importante no controlo da afecção. O banho, a aspersão dos animais com insecticidas ou a aplicação “pour-on” de lactonas macrocíclicas são de grande importância, principalmente, nas épocas de maior densidade de vectores para reduzir a disseminação da infecção na manada.

I.9.3. Terapêutica

Ainda que alguns ensaios terapêuticos com antibióticos tenham demonstrado êxito na inviabilização da infecção por *B. besnoiti* em culturas celulares^{73,74,90}, os ensaios *in vivo* têm-se revestido de insucesso. Alguns autores utilizaram no passado abordagens bem mais agressivas. Leitão⁴⁸ recomendava três injeções de 30 ml de formol a 10% por via endovenosa em intervalos de três dias. Por seu lado, Herin e Thienpont⁹¹ sugeriram a administração de 30 ml de formol a 1% na fase aguda da doença. Para animais na fase crónica da doença, estes últimos autores recomendaram a administração por via endovenosa de 20 a 40 ml de solução iodada de Lugol, duas vezes ao dia, com quatro a sete dias de intervalo. Embora nenhuma avaliação criteriosa dos resultados tenha sido referida, Herin e Thienpont⁹¹ referiam uma contribuição benéfica no curso da doença, o que para ambas as abordagens está manifestamente longe de se poder considerar como forma terapêutica. Foram utilizados diversos protocolos terapêuticos³¹, que incluíam entre outros fármacos, a pentamidina, aureomicina, formalina, iodeto de sódio, sulfamerazina, sulfamezatina, micostatina e terramicina, não correspondendo a qualquer das abordagens referidas, sucesso no tratamento da besnoitiose. Até aos dias de hoje não se conhece procedimento terapêutico bem sucedido para o controlo da afecção em bovinos.

I.9.4. Vacinação

Apesar da utilização de culturas de *B. besnoiti* ser aplicada com algum sucesso em vacinações em Israel⁸⁸ e na África do Sul^{89,92}, este procedimento não deixa de resultar em infecção e na formação de quistos nos animais inoculados, sendo também imprecisa ou duvidosa a utilidade da mesma^{36,93} quando aplicada em programas vacinais.

I.10. Infecção parasitária e inflamação

As principais funções do sistema imunitário são a defesa contra organismos infectantes e a eliminação de células neoplásicas com potencial maligno. Nos últimos anos foram feitos inúmeros progressos no estudo dos mecanismos de resposta imunitária, particularmente, no estudo dos mecanismos moleculares da inflamação⁹⁴.

A resposta imunitária tem, essencialmente, três objectivos: controlar a infecção inicial, eliminar os parasitas residuais e prevenir a re-infecção. Os mecanismos envolvidos nestes três objectivos são diferentes, sendo contudo, a resposta inflamatória um dos mecanismos efectores primordiais e decisivos no decurso de uma infecção.

Podemos definir resposta inflamatória como uma reacção do organismo caracterizada por alterações dos vasos sanguíneos, que levam à acumulação de exsudado e leucócitos nos tecidos, com objectivo de destruir e eliminar o agente agressor, bem como de promover os processos de reparação para se atingir novamente o equilíbrio homeostático. Nela participam os leucócitos, as plaquetas, as células endoteliais, as células do tecido conjuntivo (mastócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos) e os constituintes da matriz extra-celular, como as proteínas estruturais (colagénio e elastina), as glicoproteínas (fibronectina, tenascina, etc.), os proteoglicanos e a membrana basal⁹⁵.

A inflamação é, classicamente, dividida em dois padrões de resposta: a inflamação aguda, de curta duração, onde predominam os fenómenos exsudativos e a presença de neutrófilos, e a inflamação crónica, de duração arrastada e onde predominam os linfócitos e macrófagos, fenómenos de necrose, fibrose ou outros mecanismos de reparação.

A complexidade do ciclo de vida dos protozoários e a necessidade de tempo para a sua multiplicação constituem as razões para o desenvolvimento de estratégias de evasão ao sistema

imunitário, particularmente aos mecanismos da resposta inflamatória.

Besnoitia besnoiti, tal como outros Apicomplexa, ao infectar uma célula hospedeira e ao multiplicar-se no interior de um vacúolo parasitóforo, desenvolveu um eficaz mecanismo de evasão ao sistema imunitário, assegurando a capacidade de longa permanência no hospedeiro intermediário^{96,97}. Contudo, esses mecanismos de evasão não impedem totalmente o estabelecimento de uma resposta imunitária. As lesões da besnoitiose bovina, quer na fase aguda, quer na fase crónica, são disso exemplo.

O estudo da resposta inflamatória na besnoitiose bovina é escasso. Basson⁵⁵ *et al.* num extenso trabalho dedicado ao estudo da patogénese da besnoitiose bovina refere apenas a existência de um infiltrado mononuclear rodeando os quistos na fase crónica doença. Ferreira descreve a existência de quistos na derme e o facto de suscitarem uma resposta inflamatória crónica, maioritariamente, granulomatosa. Cortes *et al.*⁹⁸, num artigo dedicado ao estudo da doença em Portugal e em que são descritas as lesões histopatológicas encontradas em cinco bovinos de uma exploração localizada no distrito de Évora, refere a ocorrência de uma infiltração inflamatória peri-quística constituída por macrófagos, linfócitos, eosinófilos e plasmócitos. Neste trabalho foi também constatado que a resposta inflamatória celular apresenta várias intensidades, tendo-a classificado como ligeira, moderada e abundante.

Por outro lado, a marcação imunohistoquímica de células de resposta inflamatória de bovino, em cortes de parafina, encontra-se ainda numa fase muito incipiente. Apenas tem sido possível marcar algumas sub-populações celulares recorrendo a cortes de congelação, o que traz, naturalmente, algumas limitações⁹⁹.

I.11. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) é um conjunto de técnicas que permite a identificação individual de constituintes celulares *in situ*, isto é, no próprio corte histológico. A aplicação dos métodos imunohistoquímicos ao estudo das doenças parasitárias, e em especial no estudo da resposta celular inflamatória, pode contribuir decisivamente para a compreensão da patogenia destas afecções, nomeadamente, dos aspectos relacionados com a resposta do hospedeiro ao parasita.

A especificidade da reacção antígeno-anticorpo constitui a base molecular das técnicas de IHQ. Os antígenos são detectados por anticorpos associados a substâncias (marcadores) que tornam visíveis os locais onde ocorre a reacção antígeno-anticorpo.

O sucesso de qualquer técnica de IHQ depende de dois factores cruciais e, por vezes, antagónicos: a adequada preservação morfológica dos tecidos/células e a retenção da antigenicidade das moléculas a pesquisar. A preservação dos detalhes estruturais pode ser obtida por congelamento dos tecidos em azoto líquido ou através da utilização de fixadores químicos. Existem vários tipos de soluções fixadoras, salientando-se as aldeídicas (formaldeído, paraformaldeído, glutaraldeído, etc.), as alcoólicas (Carnoy, Metacarn, etc.) e as que contêm metais pesados, como zinco e mercúrio. A fixação química, nomeadamente, a realizada com o formaldeído a 3,7%, permite uma melhor preservação da morfologia tecidular, sendo utilizada como rotina na maioria dos laboratórios de Anatomia Patológica.

A antigenicidade perdida pela acção do fixador poder ser, eventualmente, restaurada com a aplicação de técnicas de recuperação antigénica, as quais, por princípio, não devem comprometer a estrutura do tecido. O processo de recuperação antigénica pode ser realizado através de métodos enzimáticos e não enzimáticos. Os processos enzimáticos empregam

proteases como a tripsina, a pronase, a proteinase K ou a pepsina. Os métodos de recuperação antigénica não enzimáticos envolvem o aquecimento a altas temperaturas das lâminas contendo os cortes dos tecidos em soluções tampão. Actualmente, as metodologias de aplicação de calor variam desde o uso de microondas até à panela de pressão, autoclave ou banho-maria. O sucesso da recuperação antigénica pelo calor depende, essencialmente, das condições de aquecimento, por sua vez relacionadas com a temperatura e o tempo de recuperação, e do pH da solução de recuperação antigénica utilizada¹⁰⁰. Apesar da popularidade das técnicas de recuperação antigénica, os mecanismos moleculares do processo permanecem por explicar¹⁰¹.

Desde o seu aparecimento, com a introdução da técnica de imunofluorescência por Coons em 1941, a IHQ tem evoluído no melhoramento dos métodos que utiliza. São, essencialmente, dois os métodos empregues em IHQ: o método directo e o método indirecto. No método directo, o antigénio é detectado por um anticorpo (anticorpo primário) associado a uma marcador (*e.g.* fluorocromos, enzimas). No método indirecto, a detecção do antigénio é feita a partir da acção sequencial de dois anticorpos, em que o primeiro (anticorpo primário) é dirigido contra o antigénio e o segundo (anticorpo secundário) contra o primeiro anticorpo. Neste caso, o anticorpo secundário está associado a um marcador que permite a visualização do local da reacção antigénio-anticorpo. Para além destes métodos, existem outros que possibilitam amplificar a visualização da reacção antigénio-anticorpo recorrendo ao uso de complexos moleculares, como o complexo avidina-biotina. O método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) é, actualmente, a técnica imunohistoquímica mais difundida devido à sua grande sensibilidade e versatilidade. O método ABC baseia-se na excepcional afinidade existente entre a avidina, uma glicoproteína de 68 kDa extraída da clara do ovo, e a biotina, uma vitamina (vitamina H) e coenzima de 244,3 Da presente em muitos tecidos. Cada molécula de avidina contém quatro locais de ligação para a biotina. Por sua vez, a biotina pode ligar-se não só à avidina como

também a outras moléculas, como enzimas e anticorpos.

Nesta técnica, o anticorpo primário é adicionado ao tecido seguido de um anticorpo secundário biotinilado. Posteriormente, são adicionados complexos de avidina-biotina-peroxidase que se vão ligar à biotina dos anticorpos secundários. Estes complexos são formados pela ligação de uma molécula de avidina a várias de biotina associadas, por seu lado, a uma enzima (peroxidase). Este procedimento possibilita a localização de várias moléculas de enzima de local do antígeno. A peroxidase possui como função converter um cromogénio incolor (diaminobenzidina – DAB) num produto de cor castanha que se deposita nos locais onde ocorreu a reacção antígeno-anticorpo. A avidina tem vindo, actualmente, a ser substituída pela estreptavidina devido ao facto de aquela possuir resíduos de oligossacáridos responsáveis pela sua ligação a estruturas tecidulares de carga eléctrica negativa. Tal fenómeno produz como resultado, o aparecimento de marcação inespecífica, isto é, uma marcação que não resulta da reacção antígeno-anticorpo.

As ligações inespecíficas entre proteínas tecidulares e anticorpos são outra causa de marcação inespecífica. A inclusão de proteínas inertes (*e.g.* albumina sérica bovina) na solução de diluição pode ajudar a minimizar este problema. Outra forma de o conseguir, é a incubação dos cortes com soro normal produzido na mesma espécie animal em que foi produzido o anticorpo secundário, sendo este aplicado antes do anticorpo primário.

O bloqueio da actividade da peroxidase endógena constitui um procedimento de rotina quando se utilizam enzimas como a peroxidase. Regra geral, este bloqueio é efectuado pela incubação dos cortes com uma solução de peróxido de hidrogénio em metanol.

I.12. Objectivos

A compreensão dos mecanismos de resposta imunitária do hospedeiro constitui um passo importante para a obtenção de estratégias vacinais e/ou terapêuticas. A importância do desenvolvimento de estratégias de protecção imunitária contra infecções, neste caso devido a *B. besnoiti*, é ressaltada pelo facto de se ter vindo a assistir à emergência desta doença.

O objectivo geral deste trabalho foi o estudo morfológico da resposta celular inflamatória peri-quística que ocorre na pele de bovinos com besnoitiose crónica, recorrendo para isso ao exame histológico e imunohistoquímico de biópsias de pele de bovinos infectados.

Para além da classificação morfológica do tipo de resposta inflamatória pretendeu-se avaliar de forma qualitativa e quantitativa as diferentes células envolvidas, bem como o número de quistos presentes na pele por fragmento de biópsia.

CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Recolha de dados para o estudo de casos no período de 2001-2006

O presente trabalho teve início com a avaliação dos dados relativos à casuística disponível no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, sendo incluídos no estudo os casos positivos de besnoitiose bovina diagnosticados por biópsia de pele entre 2001 e 2006.

As informações disponíveis eram constituídas pelo número de registo de identificação animal, localização geográfica da exploração, raça e sexo. Foram, igualmente, disponibilizadas informações relativas ao exame clínico do animal e terapêuticas efectuadas.

Foram então consideradas 52 biópsias de pele (provenientes de 52 animais), a partir das quais se realizaram os estudos de histometria e de imunohistoquímica.

II.2. Técnica de biópsia de pele

Todos os fragmentos de pele estudados foram obtidos através da realização de biópsia de pele com utilização de biótomo de 8 mm, também designado por “punch”.

Depois de se proceder à contenção do animal em manga apropriada, procedeu-se à tricotomia de uma área de pele lesionada com cerca de 4 cm² localizada na tábua do pescoço. Não foi efectuado nenhum método de assepsia nesta fase. Realizou-se anestesia local subcutânea com injeção de 1ml de lidocaína a 2%, com agulha de 20 G. Após cinco minutos, foi aplicado o biótomo sobre a pele fazendo ligeira pressão e rodando continuamente numa única direcção até a lâmina estar totalmente inserida na espessura da pele. O fragmento foi removido com o auxílio de tesoura e de pinça bico de pato. A amostra foi colocada em frasco com formaldeído a 3,7%, em

quantidade superior a dez vezes o volume da peça. A sutura da pele foi realizada através de ponto simples com fio de seda 3/0 e procedeu-se à aplicação tópica de solução de iodopovidona e repelente de insectos.

II.3. Técnica histológica – Processamento e corte de tecidos

Após fixação, o processamento e inclusão em parafina dos tecidos foram efectuados de forma automática, em processador de tecidos LEICA TP 1020[®], de acordo com o seguinte protocolo:

A – Álcool etílico 70°, durante 1 hora.

B – Álcool etílico 95°, durante 1 hora e 30 minutos.

C – Álcool etílico 95°, durante 1 hora e 30 minutos.

D – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora.

E – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora e 30 minutos.

F – Álcool etílico absoluto, durante 1 hora e 30 minutos.

G – Xilol, durante 1 hora.

H – Xilol, durante 1 hora.

I – Xilol, durante 1 hora.

J – Inclusão em Histosec Merck[®] a 65 °C, durante 2 horas.

L – Inclusão em Histosec Merck[®] a 65 °C, durante 2 horas.

O corte dos blocos de parafina foi realizado em micrótomos rotativo LEICA RM 2135[®] e de correção LEICA SM 2000R[®], tendo-se efectuado cortes com cerca de 4 µm de espessura para os exames histológicos e para imunohistoquímica

II.4. Coloração de Hematoxilina & Eritrosina (H&E)

A coloração de H&E foi efectuada a todas as biópsias de pele efectuadas. Esta coloração foi utilizada na contagem do número de quistos por fragmento, na classificação do tipo de resposta inflamatória, bem como na contagem diferencial dos principais grupos de células envolvidos.

A coloração de H&E foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

A – Xilol, durante 15 minutos.

B – Álcool etílico absoluto, três passagens.

C – Álcool etílico 90°, três passagens.

D – Álcool etílico 70°, três passagens.

E – Água destilada, lavar bem.

F – Hematoxilina de Ehrlich, durante 10 minutos.

G – Água destilada, uma passagem.

H – Álcool clorídrico 1% (em álcool a 70°), uma passagem.

I – Água destilada, uma passagem.

J – Água comum até escurecer, cerca de 2 minutos.

L – Eritrosina, durante 2 minutos.

M – Água destilada, uma passagem.

N – Álcool etílico 70°, três passagens.

O – Álcool etílico 90°, três passagens.

P – Álcool etílico absoluto, três passagens.

Q – Xilol, durante 5 minutos.

R – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

II.5. Coloração de Van Gieson

A coloração de Van Gieson foi efectuada de acordo com o seguinte protocolo:

- A – Xilol, durante 15 minutos.
- B – Álcool etílico absoluto, três passagens.
- C – Álcool etílico 90°, três passagens.
- D – Álcool etílico 70°, três passagens.
- E – Água destilada, lavar bem.
- F – Hematoxilina de Weigert, durante 10 minutos.
- G – Lavagem em água tépida.
- H – Álcool clorídrico 1% (em álcool a 70°), uma passagem.
- I – Lavagem em água tépida.
- J – Van Gieson, durante 3 minutos.
- L – Água destilada, lavar bem.
- M – Álcool etílico 70°, três passagens.
- N – Álcool etílico 90°, três passagens.
- O – Álcool etílico absoluto, três passagens.
- P – Xilol, durante 5 minutos.
- Q – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

II.6. Coloração de P.A.S. (Ácido Periódico de Shiff)

A coloração de P.A.S. foi efectuada de acordo com o seguinte protocolo:

- A – Xilol, durante 15 minutos.
- B – Álcool etílico absoluto, três passagens.
- C – Álcool etílico 90°, três passagens.
- D – Álcool etílico 70°, três passagens.
- E – Água destilada, durante 5 minutos.
- F – Solução aquosa de ácido periódico a 1%, durante 10 minutos.
- G – Lavagem em água destilada.
- H – Reagente de Shiff, durante 15 minutos.
- I – Lavagem em água corrente, durante 10 minutos.
- J – Hematoxilina de Gill 2, durante 30 minutos.
- L – Lavagem em água corrente tépida.
- M – Álcool etílico 70°, três passagens.
- N – Álcool etílico 90°, três passagens.
- O – Álcool etílico absoluto, três passagens.
- P – Xilol, durante 5 minutos.
- Q – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

II.7. Coloração do Vermelho do Congo

A coloração de Vermelho do Congo foi efectuada de acordo com o seguinte protocolo:

- A – Xilol, durante 15 minutos.
- B – Álcool etílico absoluto, três passagens.
- C – Álcool etílico 90°, três passagens.
- D – Álcool etílico 70°, três passagens.

E – Água destilada, durante 5 minutos.

F – Solução de vermelho do Congo, durante 5 minutos.

G – Diferenciar com solução de hidróxido de potássio, durante 3 a 10 segundos.

H – Lavagem em água destilada.

I – Hematoxilina de Mayer, durante 3 minutos.

J – Lavagem em água corrente.

L – Álcool etílico 70°, três passagens.

M – Álcool etílico 90°, três passagens.

N – Álcool etílico absoluto, três passagens.

O – Xilol, durante 5 minutos.

P – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

II.8. Contagem do número de quistos por fragmento

Devido ao seu elevado diâmetro, a contagem do número de quistos por fragmento de biópsia foi efectuada de forma directa através da observação das lâminas em microscópio fotónico de transmissão, modelo OLYMPUS BX 51, utilizando uma objectiva de ampliação de 10X e ocular de ampliação de 10X (valor total da ampliação do microscópio de 100X).

Foram estabelecidos três intervalos: número de quistos entre um e dez por fragmento, número de quistos entre onze e quarenta por fragmento e número de quistos superior a quarenta por fragmento.

II.7. Contagem diferencial dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória peri-quística

Para a contagem diferencial das diferentes células envolvidas na resposta inflamatória peri-quística foram definidos quatro tipos celulares, de acordo com os seguintes critérios:

A - Macrófagos: células grandes, arredondadas, com núcleo oval ou reniforme, de aspecto vesiculoso, de cromatina pouco condensada com um ou dois nucléolos. O citoplasma apresenta-se eosinófilo e finamente granuloso, contendo por vezes material fagocitado no seu interior. As células gigantes, resultado da fusão de macrófagos, exibem numerosos núcleos dispostos no citoplasma de forma desorganizada ou à periferia de forma organizada (células gigantes de Langhans).

B - Linfócitos e plasmócitos: possuem núcleo de contorno circular, por vezes com pequena chanfradura, de aspecto homogéneo e cromatina condensada. Nos linfócitos o citoplasma é escasso surgindo como um halo basófilo perinuclear. As dimensões variam entre os 7 e os 10 μm . Os plasmócitos possuem núcleo de disposição excêntrica com citoplasma abundante e intensamente basófilo.

C - Polimorfonucleares eosinófilos: possuem núcleo característico bilobado, podendo apresentar-se mais raramente trilobado. O citoplasma é caracterizado pela presença de grânulos grandes, redondos e acidófilos. As dimensões variam entre os 12 e os 16 μm .

D - Polimorfonucleares neutrófilos: possuem núcleo polilobado (dois a cinco lóbulos). O citoplasma possui grânulos azurófilos e acidófilos de dimensão pequena. As dimensões variam entre os 10 e os 12 μm .

A contagem diferencial propriamente dita foi efectuada a partir de fotografias digitais obtidas com ampliação de 400 X e em resolução *standard*, através de câmara fotográfica

OLYMPUS DP 11 incorporada no microscópio OLYMPUS BX 51. Para todas as biópsias foram tiradas duas fotografias de campos diferentes abrangendo a região peri-quística de forma a impedir a sobreposição de campos e evitando assim, a repetição da contagem das mesmas células em fotos distintas.

A contagem de células foi realizada através do registo em fotografias digitais, recorrendo ao programa informático Image J - Image Processing and Analysis in Java[®] (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e de acordo com os seguintes critérios:

a) A contagem para cada uma das fotografias foi realizada em área pré-definida de 36159 μm^2 (212,7 μm x 170,0 μm).

b) As células cuja totalidade não se apresentava no interior do limite da fotografia foram rejeitadas.

c) As células cuja morfologia não se enquadrasse nas características descritas anteriormente não foram contabilizadas.

d) O autor foi o responsável por todas as contagens, de forma a uniformizar a técnica e os critérios de contagem, evitando assim diferenças entre operadores.

O registo das contagens foi efectuado em folha de cálculo com recurso ao programa *Excel 2003* do *Microsoft Office*[®].

II.8. Técnica de imunohistoquímica

Das 52 biópsias estudadas foram seleccionadas 12, considerando apenas aquelas em que o material se encontrava melhor preservado para realizar este tipo de técnica, atendendo às exigências de conservação da estrutura antigénica e de forma a assegurar bons resultados. Assim, analisaram-se casos em que o período de fixação não excedeu as 24 horas de forma a prevenir a

sobrefixação do material.

As imunomarcações foram realizadas em cortes histológicos com 4 µm de espessura colocados em lâminas adesivadas com revestimento de gelatina.

Os anticorpos disponíveis no mercado são, normalmente, os utilizados nos exames de rotina da espécie humana, podendo apresentar reactividade cruzada com a espécie bovina. Para a imunohistoquímica foram testados 9 anticorpos primários, dos quais foi somente conseguida marcação positiva para os anticorpos referidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados e para os quais foi obtida marcação positiva.

Especificidade Ac. Primário	Origem	Clone	Referência	Isotipo	Esp. Produtoras
CD79 <i>acy</i>	Dako	HM57	M 7051	IgG1	Rato (anti-hum.)
CD3	Dako	Policlonal	A 0452	---	Rato (anti-hum.)
WC1	Serotec	CC15	MCA838G	IgG2	Rato (anti-bov.)
Macrófagos/ Monócitos (Calprotectina)	Serotec	MAC387	MCA874G	IgG1	Rato (anti-hum.)

Para os anticorpos primários CD4 e CD8 não foi obtida qualquer marcação. Por forma a resolver este problema foram testados vários clones, efectuados vários métodos de recuperação antigénica e utilizadas múltiplas diluições conforme especificações referidas na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo utilizado para imunomarcção de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Anticorpo Primário			Recuperação Antigénica		Anticorpo Primário								
Nome	Origem	Ref.	Técnica	Meio/Tempo	Diluição/Tempo								
CD 4	VMRD	BAT82A	Microondas	Tampão Citrato de Sódio a pH=6,2 3 ciclos de 5 min.	1:50 - <i>Overnight</i>								
					1:200 - <i>Overnight</i>								
					1:500 - <i>Overnight</i>								
					EDTA a pH=9,0 3 ciclos de 5 min.	1:50 - <i>Overnight</i>							
						1:200 - <i>Overnight</i>							
						1:500 - <i>Overnight</i>							
			Proteinase K	Temp. Ambiente 10 min.	1:50 - <i>Overnight</i>								
					1:200 - <i>Overnight</i>								
					1:500 - <i>Overnight</i>								
					* Novocastra	NCL-L -CD4-368	Banho Maria 100 °C	Tampão TRIS/ EDTA pH=9,0 15 min.	1:40 - 60 min.				
									**	NCL-L -CD4-1F6	Panela de Pressão	Tampão TRIS/ EDTA a pH=9,0 2 min. após pressão máxima	1:15 - 30 min.
													CD 8
CD 8	VMRD	ILA 11	Microondas	Tampão Citrato de Sódio a pH=6,2 3 ciclos de 5 min.	1:50 - <i>Overnight</i>								
					1:200 - <i>Overnight</i>								
					1:500 - <i>Overnight</i>								
					EDTA a pH=9,0 3 ciclos de 5 min.	1:50 - <i>Overnight</i>							
						1:200 - <i>Overnight</i>							
						1:500 - <i>Overnight</i>							
			Proteinase K	Temp. Ambiente 10 min.	1:50 - <i>Overnight</i>								
					1:200 - <i>Overnight</i>								
					1:500 - <i>Overnight</i>								
					* Novocastra	NCL-L -CD8-295	Banho Maria 100 °C	Tampão TRIS/EDTA pH=9,0 15 min.	1:40 - 60 min.				
									**	Panela de Pressão	Tampão TRIS/ EDTA a pH=9,0 2 min. após pressão máxima	1:10 - 30 min.	

A técnica assinalada com * foi realizada no Laboratório de Técnicas Especiais-Imunocitoquímica do Serviço de Anatomia Patológica do I.P.O.L.F.G., E.P.E.. Para recuperação antigénica foi utilizado o tampão TRIS-EDTA (Dako S2367[®]), em banho-maria a 100 °C durante 15 minutos, seguido de arrefecimento à temperatura ambiente durante 20 minutos. Para visualização, utilizou-se o Dako Real EnVision Detection System[®], Peroxidase/DAB+, referência K5007[®] (Método do Polímero). A técnica foi efectuada no aparelho automático TechMate 500[®]. Como controlo positivo foi utilizada amígdala humana. Os controlos negativos foram todos efectuados por omissão do anticorpo primário.

A técnica assinalada com ** foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São José /C.H.L.C., E.P.E.. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogénio a 3% em água destilada após aplicação do antocorpo primário anti-CD4, ao contrário de todos os outros (*vide* protocolo de imunohistoquímica adiante). Para visualização, utilizou-se o Dako Real EnVision Detection System[®], Peroxidase/DAB+, referência K5007[®] (Método do Polímero). Como controlo positivo foi utilizado apêndice íleo-cecal humano. Os controlos negativos foram todos efectuados por omissão do anticorpo primário.

A determinação da diluição óptima de trabalho para cada anticorpo primário fez-se mediante ensaio inicial da técnica, testando várias diluições, seguindo-se a avaliação dos resultados e a selecção da diluição ideal.

Considera-se marcação positiva quando as zonas alvo das células (núcleo, citoplasma ou membrana citoplasmática) surgem bem coradas de castanho-escuro, devido à acção da peroxidase sobre o revelador, a diaminobenzidina, a qual forma polímeros quando oxidada na presença do substrato, o peróxido de hidrogénio. Os núcleos, membranas celulares e/ou citoplasma mostram-

se bem evidentes pelo contraste marcado que ocorre com os restantes componentes celulares corados pela hematoxilina de Mayer.

Em cada técnica de imunohistoquímica realizada e para todos os grupos de casos processados, foram sempre incluídos dois cortes de linfonodo de bovino sem patologia e apêndice íleo-cecal humano, usados como controlo externo de especificidade do anticorpo primário. Tal abordagem permite validar os resultados obtidos, garantindo que as marcações observadas se devem a uma ligação específica do anticorpo primário ao antigénio em análise.

Passemos à descrição detalhada do protocolo da técnica de coloração imunohistoquímica utilizado, para material incluído em parafina, pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (EBP):

A – Executaram-se cortes de 4 μm de espessura que foram colhidos em lâminas adesivadas (Superfrost Plus[®]).

B – Os cortes foram desparafinados em xilol durante 10 minutos.

C – Rehidratação: álcool etílico absoluto (duas vezes, durante 5 minutos).

álcool etílico 95° (durante 5 minutos).

álcool etílico 70° (durante 5 minutos).

D – Realizou-se a inibição da peroxidase endógena através de incubação na solução de bloqueio (4 ml de H_2O_2 a 33% p/v adicionados a 236 ml de CH_3OH), em agitação constante e durante 30 minutos.

E – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

F – Recuperação antigénica. Procedeu-se de acordo com o descrito na Tabela 3.

G – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

H – Bloqueio das reacções inespecíficas recorrendo à *Blocking Solution* (solução A) do *kit* Histostain Plus® (Zymed Laboratories Inc.®), durante 30 minutos.

Tabela 3 – Métodos de recuperação antigénica, diluições e tempos de incubação dos anticorpos primários utilizados.

Especificidade do Anticorpo Primário	Recuperação Antigénica		Anticorpo Primário
	Técnica	Meio /Tempo	
CD79 <i>acy</i>	Microondas 750 W	Tampão Citrato de Sódio a pH=6,2 3 ciclos de 5 min.	1:25 - 120 min.
CD3	Tripsina	37°C – 30 min.	1:100 - 60 min.
WC1	Tripsina	37°C – 30 min.	1:100 - <i>Overnight</i>
Macrófagos/ Monócitos (Calprotectina)	Proteinase K	Temp. ambiente 10 min.	1:100 - 120 min.

I – Incubação com os anticorpos primários, em concentrações e tempos de incubação variáveis (de acordo com as especificações constantes na Tabela 3). A incubação foi feita à temperatura ambiente e em câmara húmida.

J – Incubação com o anticorpo secundário biotilado recorrendo a *Broad Spectrum Second Antibody* (solução B) do *kit* Histostain Plus® (Zymed Laboratories Inc.®), durante 30 minutos.

L – Lavagem em PBS (por três vezes durante 5 minutos).

M – Incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase recorrendo a *HRP Streptavidin* (solução C) do *kit* Histostain Plus® (Zymed Laboratories Inc.®), durante 30 minutos.

N – Lavagem em PBS (três vezes durante 5 minutos).

O – Revelação com diaminobenzidina, durante 3 minutos, recorrendo ao *kit DAB Plus Substrate Kit*[®] (Zymed Laboratories Inc.[®]).

P – Lavagem em PBS seguida de lavagem em água corrente durante 5 minutos.

Q – Coloração de fundo pela Hematoxilina de Mayer, durante 10 segundos.

R – Lavagem em água corrente (azular).

S – Desidratação dos cortes por passagens em álcool etílico com graduação crescente (inversa do ponto C).

T – Passagem por xilol.

U – Montagem em resina sintética (Entellan[®]).

II.9. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada com recurso ao programa *SAS System*[®] (*Version 9.1.3*, Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Foram calculadas as medidas de tendência central para as contagens diferenciais dos diferentes tipos celulares envolvidos nas respostas inflamatórias classificadas.

Para análise das médias obtidas e respectivos desvios-padrão, foram realizados o teste paramétrico *Student t Test* e o teste não-paramétrico *Wilcoxon Rank Sun Test*, considerando um nível de significância de 0,05.

CAPÍTULO III - RESULTADOS

III.1. Resposta inflamatória

III.1.1. Classificação do tipo de resposta inflamatória

Foram seleccionadas 52 biópsias de pele positivas efectuadas a bovinos com besnoitiose, identificadas nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período considerado.

Após observação microscópica, observou-se que a resposta inflamatória que ocorre em torno do quisto é crónica granulomatosa, tendo sido classificada em três tipos com base na sua organização morfológica: nodular, nodular discreta e difusa intensa.

Considerou-se reacção granulomatosa nodular, aquela em que há elevado número de macrófagos e linfócitos, dispendo-se de forma organizada ou formando agregados compactos em torno do quisto. Os fenómenos exsudativos estão ausentes ou presentes de forma muito subtil. Considerou-se ainda, uma divisão em resposta granulomatosa nodular discreta quando o número de células em torno do quisto, embora mantendo organização nodular, surge em número reduzido.

Como resposta granulomatosa difusa intensa, considerou-se aquela em que as células inflamatórias surgem dispersas, isto é, sem organização definida e em número elevado.

Das 52 biópsias de pele observadas, 34 apresentavam reacção inflamatória granulomatosa de tipo nodular (figuras 5, 6 e 7), 15 reacção inflamatória granulomatosa nodular discreta (figura 8) e 3 reacção inflamatória granulomatosa difusa intensa (figura 9).

O gráfico 1 representa a distribuição dos diferentes tipos de resposta inflamatória na totalidade das biópsias estudadas.

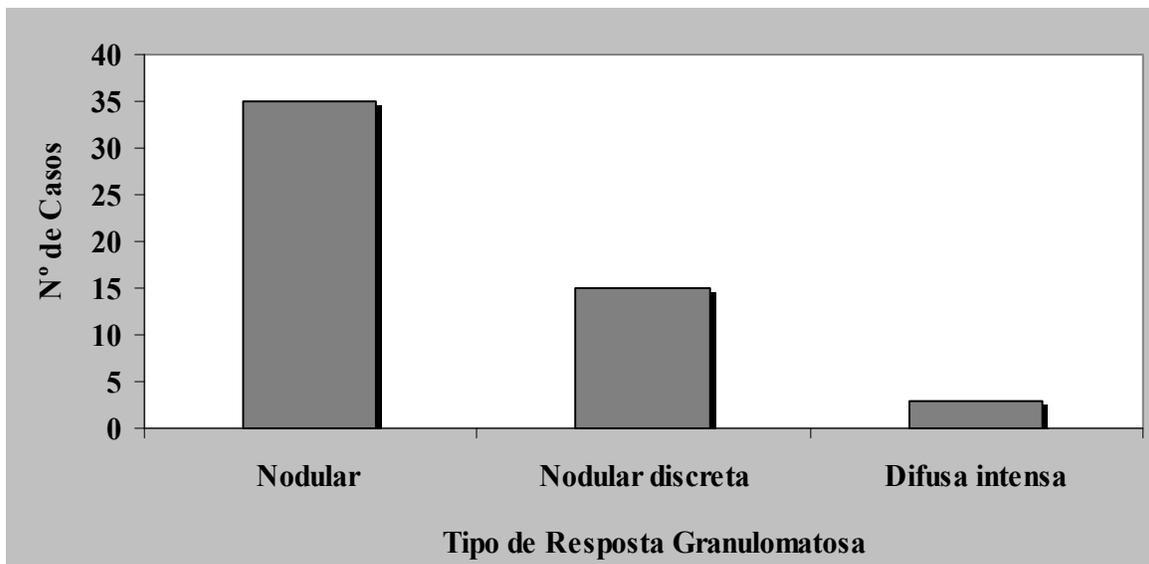


Gráfico 1 – Distribuição das diferentes manifestações morfológicas da resposta granulomatosa.

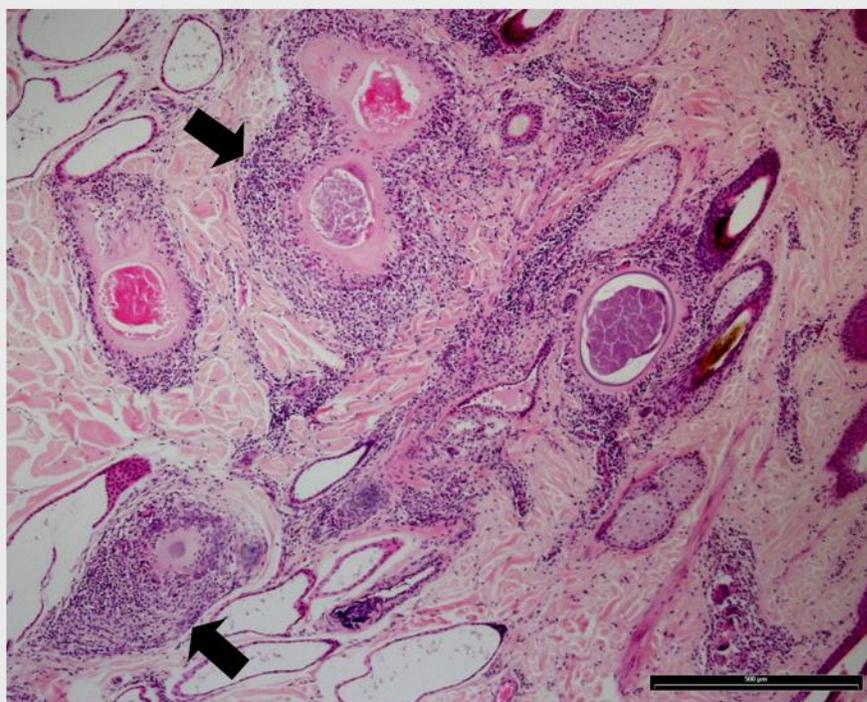


Fig. 6 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Observe-se a formação de granulomas em torno dos quistos (setas). H&E. Barra 500 μ m.

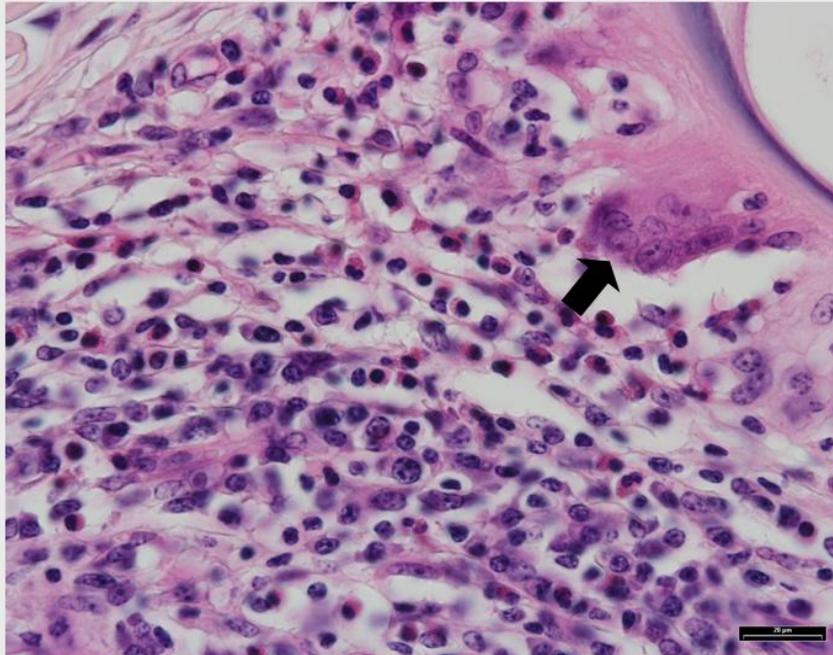


Fig. 7 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Observe-se o intenso infiltrado celular e a formação de células gigantes em torno do quisto (seta). H&E. Barra 20 μ m.

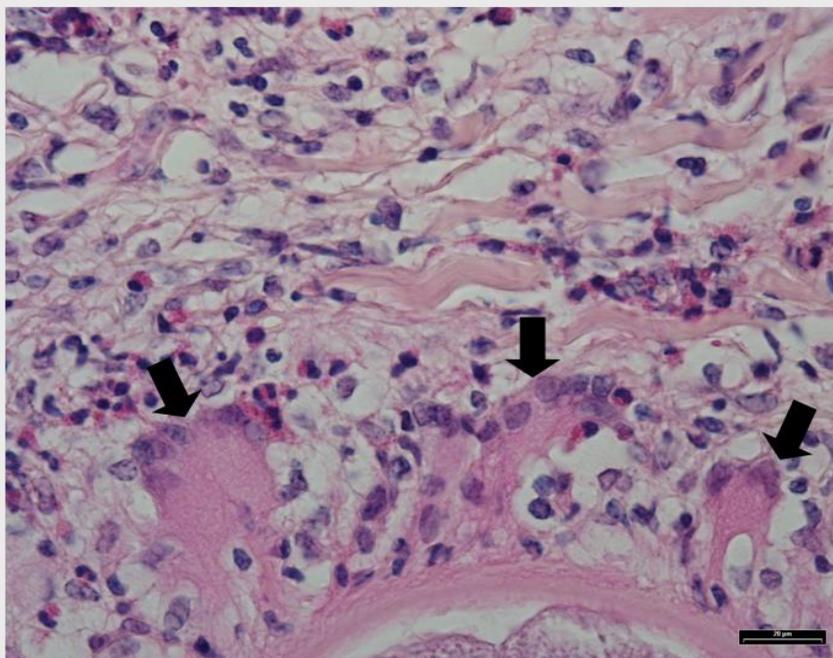


Fig. 8 – Reacção granulomatosa de tipo nodular. Observe-se a formação de células gigantes (setas) em torno do quisto. H&E. Barra 20 μ m.

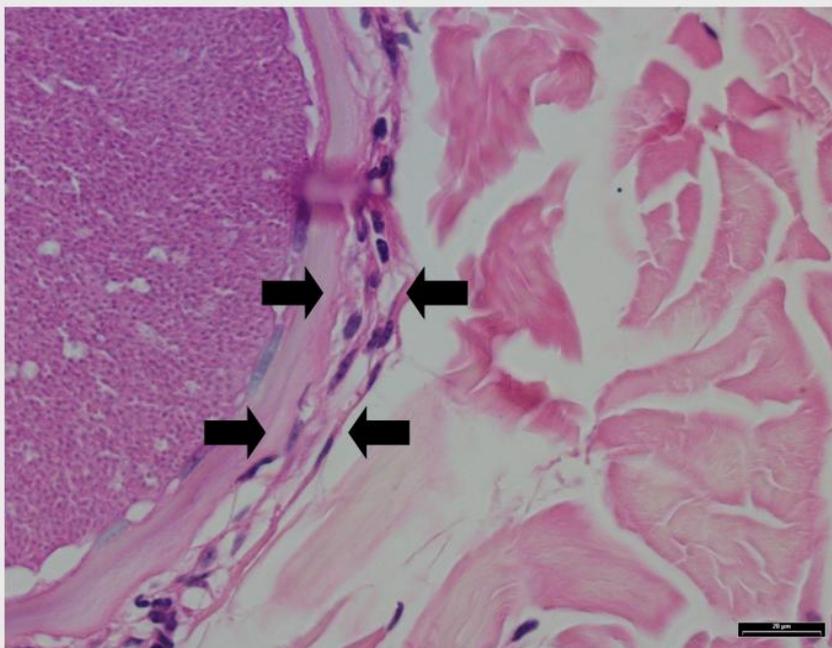


Fig. 9 – Reacção granulomatosa de tipo nodular discreto. Observe-se a escassez de células em torno do quisto (zona delimitada pelas setas). H&E. Barra 20 µm.

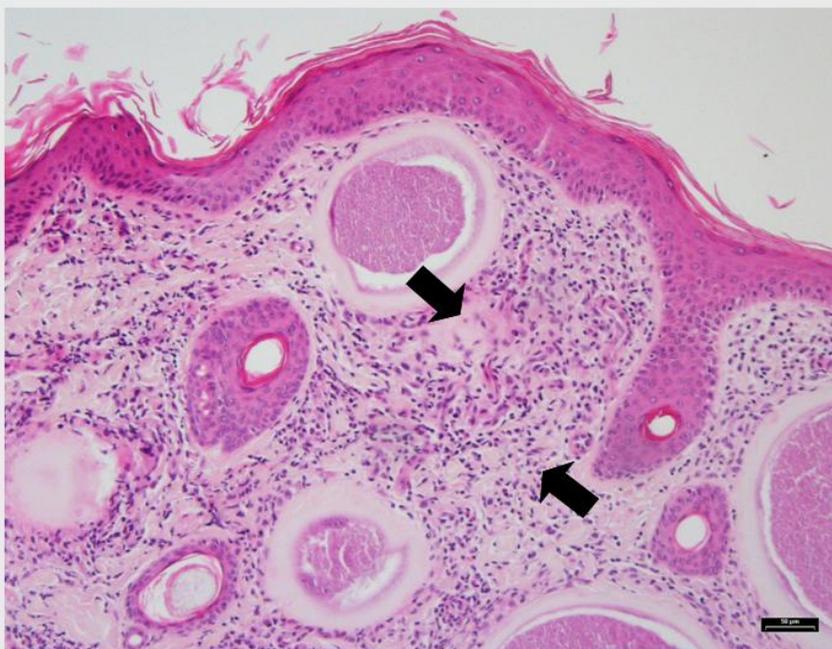


Fig. 10 – Reacção granulomatosa difusa intensa. Observe-se a infiltração difusa por células inflamatórias, neste caso sub-epidérmica, sem organização definida (setas). H&E. Barra 50 µm.

III.1.2. Estudo da parede do quisto

O estudo da parede do quisto, utilizando colorações especiais, revelou a presença de material PAS positivo (hidratos de carbono) na camada mais interna, cuja quantidade apresenta tendência para diminuir à medida que o quisto vai evoluindo. A segunda camada, contendo parte da célula hospedeira, nomeadamente o seu citoplasma, apresenta-se também fortemente positiva ao PAS (figuras 11 e 12). A coloração de Van Gieson (colagénio) revelou-se bastante discreta marcando apenas uma delgada camada periférica da parede e em continuidade com o colagénio dérmico (figuras 13 e 14). Não obtivemos marcação para o Vermelho do Congo (amilóide) (figura 15).

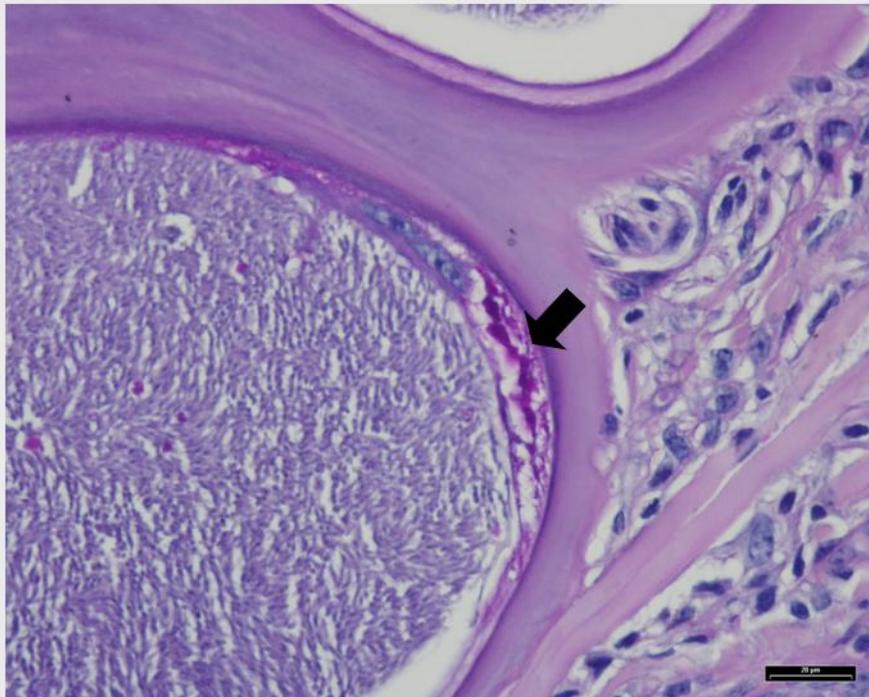


Fig. 11 – Coloração pelo PAS. Observe-se a positividade das camadas mais internas da parede do quisto, nomeadamente, para a camada contendo a célula hospedeira (seta). Barra 20 μ m.

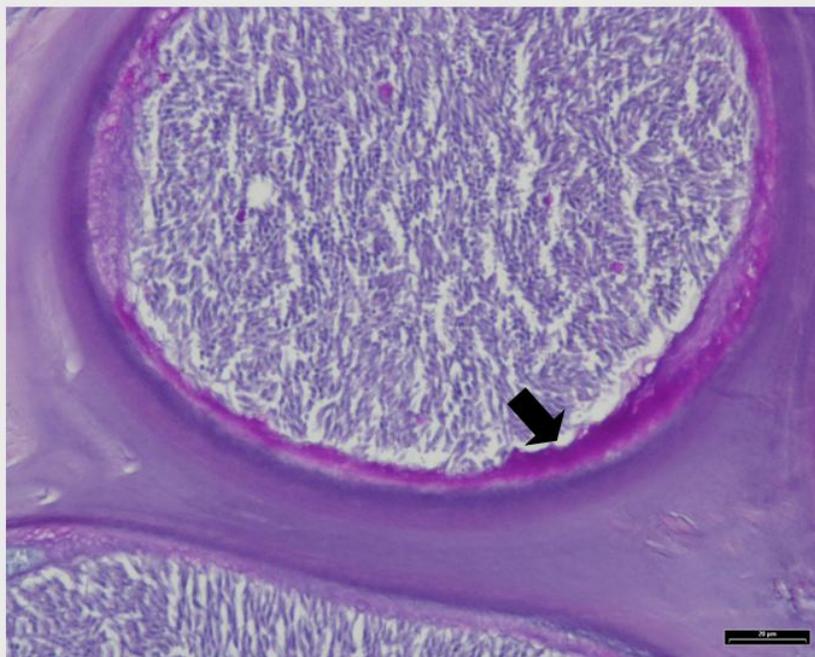


Fig. 12 – Coloração pelo PAS. Observe-se a positividade para as camadas mais internas da parede do quisto, nomeadamente, para a camada contendo a célula hospedeira (seta). Barra 20 µm.

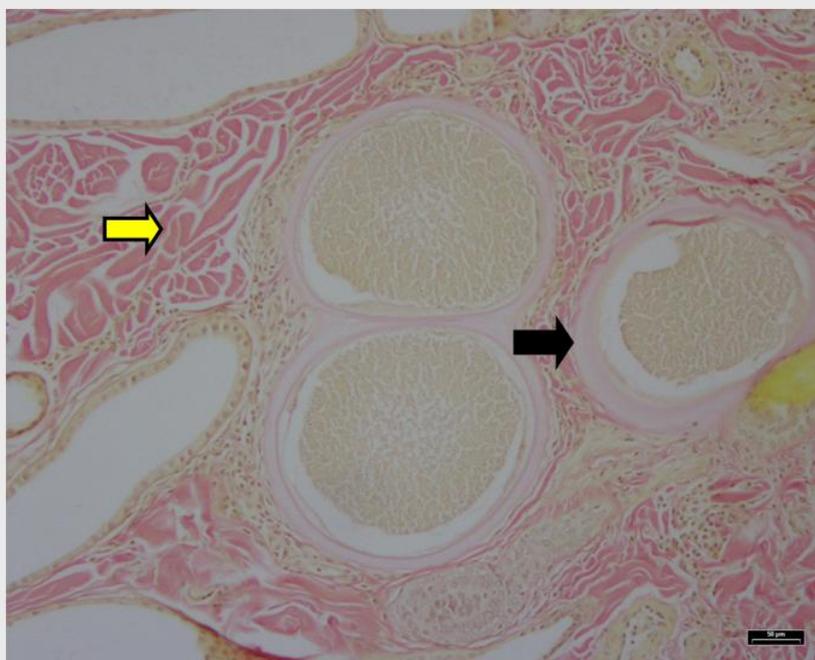


Fig. 13 – Coloração pelo Van Gieson. Observe-se a discreta afinidade da parede do quisto para esta coloração (seta preta). O colagénio apresenta coloração avermelhada (seta amarela). Barra 50 µm.

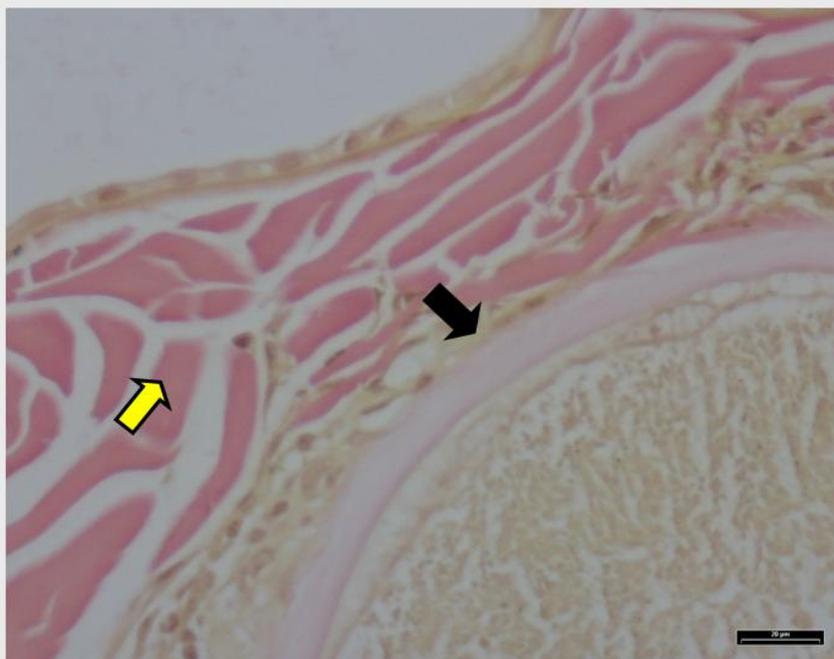


Fig. 14 – Coloração pelo Van Gieson (pormenor da figura 13). Observe-se a discreta afinidade da parede do quisto para esta coloração (seta preta). O colagénio apresenta coloração vermelha (seta amarela). Barra 20 μm .

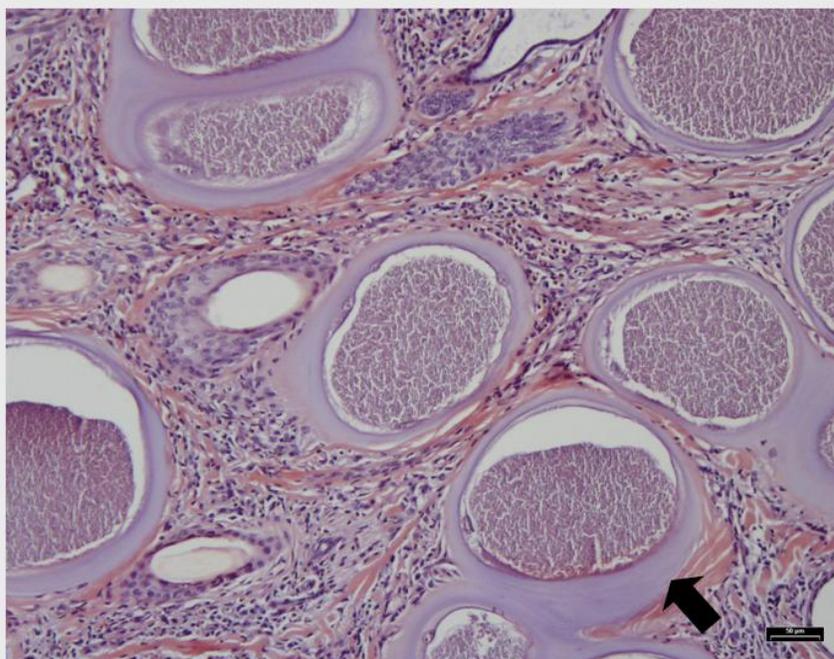


Fig. 15 – Coloração pelo Vermelho do Congo. A parede do quisto não apresenta afinidade para esta coloração (seta). Barra 50 μm .

III.2. Número de quistos por fragmento

O número de quistos por fragmento de biópsia variou entre 1 e 88 quistos por fragmento. Para a análise quantitativa do número de quistos por fragmento foram estabelecidos os seguintes intervalos: número de quistos entre um e dez por fragmento; número de quistos entre onze e quarenta (inclusive) por fragmento e número de quistos superior a quarenta por fragmento.

Das 52 biópsias de pele analisadas, 24 casos apresentavam um número de quistos por fragmento entre um e dez, 19 casos um número de quistos por fragmento entre onze e quarenta (inclusive) e 9 casos um número de quistos por fragmento superior a quarenta. O gráfico 2 representa a distribuição do número de quistos na totalidade das biópsias estudadas.

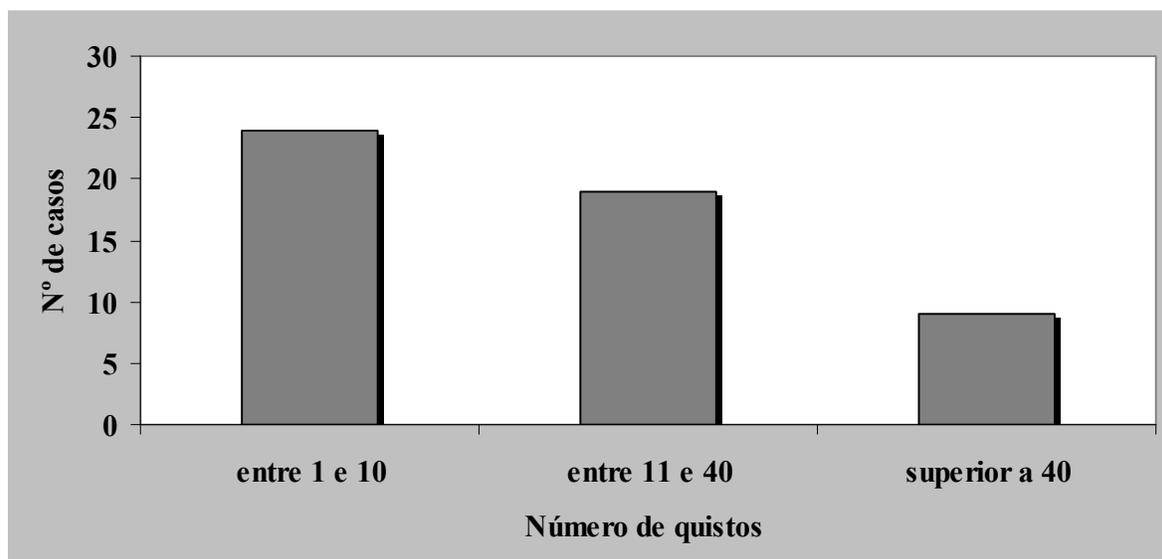


Gráfico 2 – Distribuição do número de quistos por fragmento de biópsia.

A análise dos dados obtidos revela que cerca de metade dos casos analisados possuem um número de quistos por fragmento superior a dez, o que é indicador de uma elevada carga parasitária na pele.

Analisando a distribuição do número de quistos por fragmento relativamente ao padrão morfológico de resposta (Tabela 4), verificou-se que dos 34 casos com resposta granulomatosa nodular, 19 casos apresentavam um número de quistos por fragmento entre um e dez, 11 casos um número de quistos por fragmento entre onze e quarenta (inclusive) e 4 casos um número de quistos por fragmento superior a quarenta. Dos 15 casos com resposta granulomatosa nodular discreta, 5 casos apresentavam um número de quistos por fragmento entre um e dez, 7 casos um número de quistos por fragmento entre onze e quarenta (inclusive) e 3 casos um número de quistos por fragmento superior a quarenta. Dos 3 casos com resposta granulomatosa difusa intensa, 1 caso apresentava um número de quistos por fragmento entre onze e quarenta (inclusive) e 2 casos um número de quistos por fragmento superior a quarenta.

Tabela 4 – Distribuição do número de quistos por padrão morfológico de resposta

Distribuição do Número de Quistos por Fragmento			
Resposta Inflamatória Granulomatosa	1 – 10	11 – 40	superior a 40
Nodular (n=34)	19 (56%)	11 (32%)	4 (12%)
Nodular discreta (n=15)	5 (33%)	7 (47%)	3 (20%)
Difusa Intensa (n=3)	-	1 (33%)	2 (64%)

III.3. Contagem diferencial dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória peri-quística

Para a contagem diferencial das células envolvidas na resposta inflamatória peri-quística foram considerados quatro tipos celulares: macrófagos (figura 16), polimorfonucleares eosinófilos (figura 17), linfócitos e plasmócitos (figura 18) e polimorfonucleares neutrófilos (figura 19).

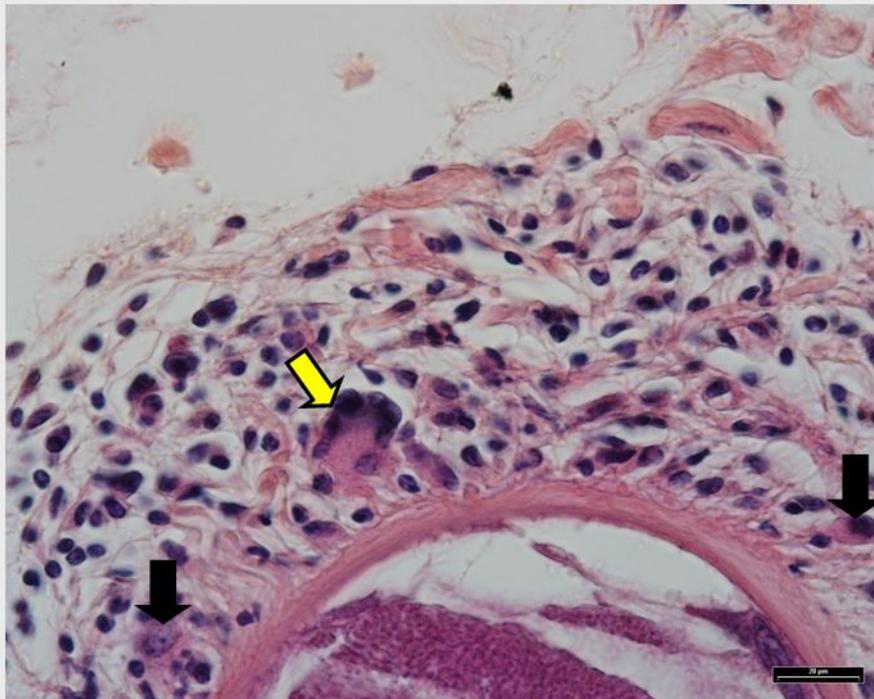


Fig. 16 – Macrófagos (setas pretas) e célula gigante de Langhans (seta amarela). As células gigantes de Langanhs, resultado da fusão de macrófagos, exibem numerosos núcleos dispostos à periferia de forma organizada. H&E. Barra 20 μ m.

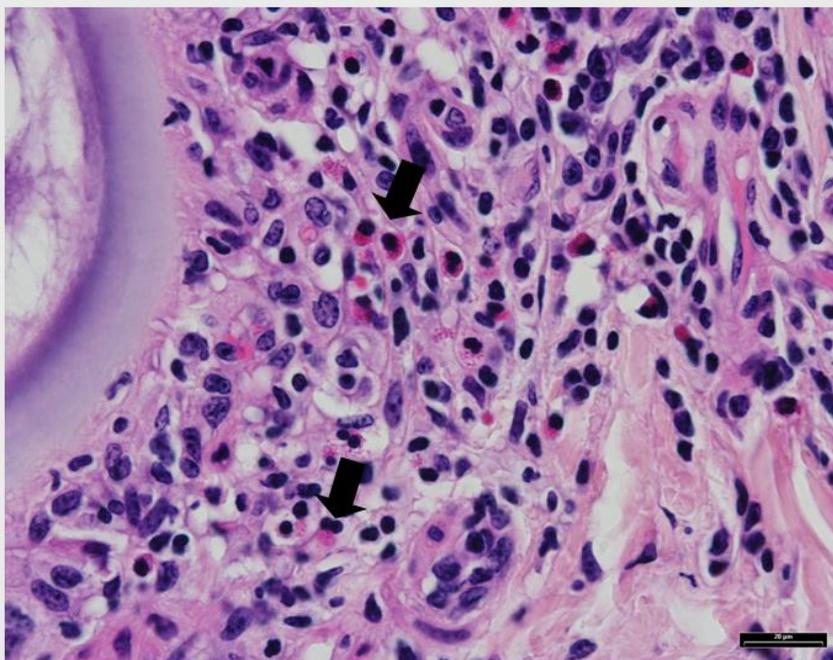


Fig. 17 – Eosinófilos (setas). O citoplasma contém grânulos grandes, redondos e acidófilos. H&E. Barra 20 μm .

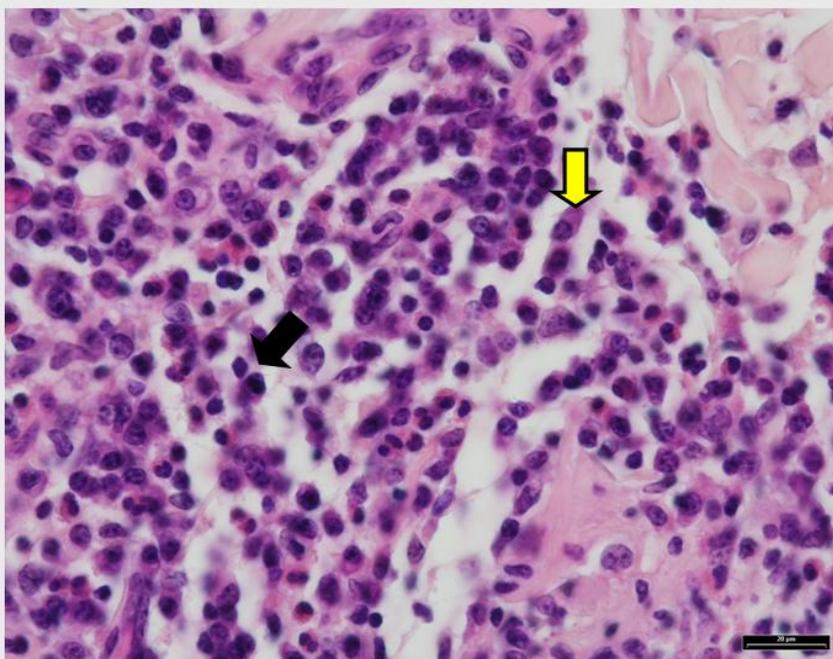


Fig. 18 – Linfócitos e plasmócitos . Os linfócitos possuem núcleos de aspecto homogêneo e cromatina condensada (seta preta). Os plasmócitos possuem citoplasma basófilo e núcleo de disposição excêntrica (seta amarela). H&E. Barra 20 μm .

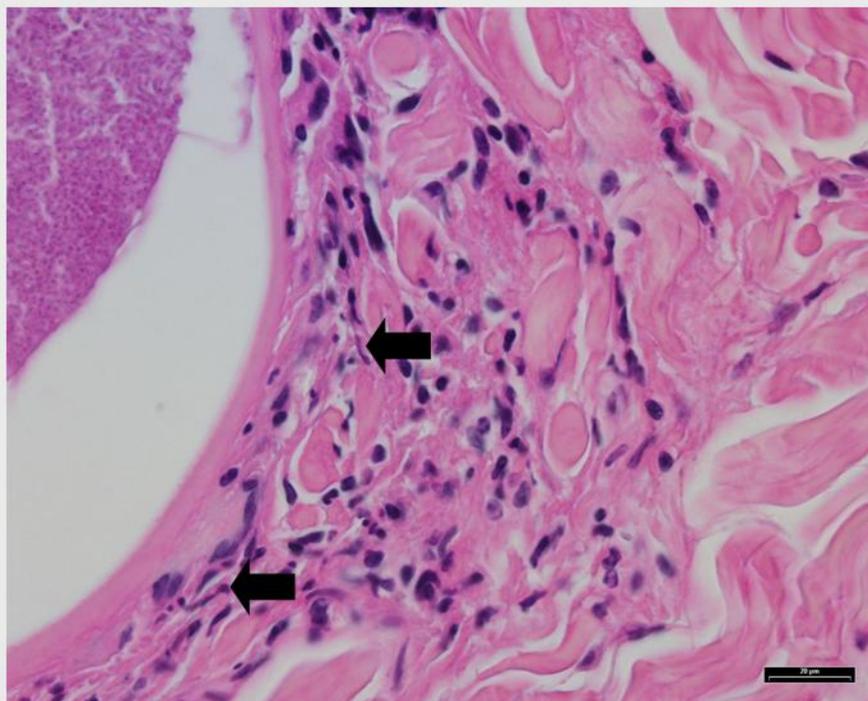


Fig. 19 – Neutrófilos (setas). O núcleo é polilobado (dois a cinco lóbulos) e o citoplasma possui grânulos azurófilos de pequena dimensão. H&E. Barra 20 µm.

Conforme referido anteriormente, a contagem diferencial propriamente dita foi efectuada a partir das fotografias digitais obtidas para todos os casos, com ampliação de 400 X, semelhantes às figuras 16, 17, 18 e 19. A contagem de células foi realizada, recorrendo ao programa informático Image J - Image Processing and Analysis in Java[®]. Após registo em folha de cálculo do programa *Excel 2003* do *Microsoft Office*[®] e aplicados os testes estatísticos *Student t Test* e *Wilcoxon Rank Sun Test*, observou-se que os valores médios (e desvios-padrão), em percentagem, de eosinófilos para as respostas granulomatosa nodular, granulomatosa nodular discreta e granulomatosa difusa intensa eram, respectivamente, 20,13 (\pm 10,07), 20,39 (\pm 13,89) e 13,22 (\pm 7,56); para os linfócitos e plasmócitos observamos, respectivamente, 73,39 (\pm 11,68),

Tabela 5 – Medidas de tendência central (média e desvio padrão) para as contagens diferenciais dos diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória.

Células de Resposta Inflamatória				
Resposta Inflamatória	Eosinófilos	Linf./Plasmócitos	Macrófagos	Neutrófilos
Inflamatória Granulomatosa				
Nodular (n=34)				
Média	20,13	73,39	5,23	1,24
Desvio Padrão	10,07	11,68	4,21	2,75
Nodular discreta (n=15)				
Média	20,39	74,97	3,72	0,91
Desvio Padrão	13,89	14,67	3,81	1,64
Difusa Intensa (n=3)				
Média	13,22	70,60	15,21	0,97
Desvio Padrão	7,56	20,59	20,06	1,68

74,97 (\pm 14,67) e 70,60 (\pm 20,59); para os macrófagos verificou-se, respectivamente, 5,23 (\pm 4,21), 3,72 (\pm 3,81) e 15,21 (\pm 20,06) e para os neutrófilos observámos, respectivamente, 1,24 (\pm 2,75), 0,91 (\pm 1,64) e 0,97 (\pm 1,68), conforme descrito na Tabela 5. Face aos valores observados, conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes padrões de reacção inflamatória granulomatosa para um nível de significância de 0,05.

Esta constatação permite-nos inferir que as diferentes manifestações morfológicas da resposta inflamatória parecem obedecer a um padrão celular comum, independentemente, do seu arranjo organizacional.

Os histogramas seguintes (gráfico 3) representam, de forma comparativa, a distribuição em percentagem do número de células de resposta inflamatória em função do seu valor médio para cada um dos diferentes tipos de organização inflamatória e ilustram, à semelhança da Tabela 5, essa similitude.

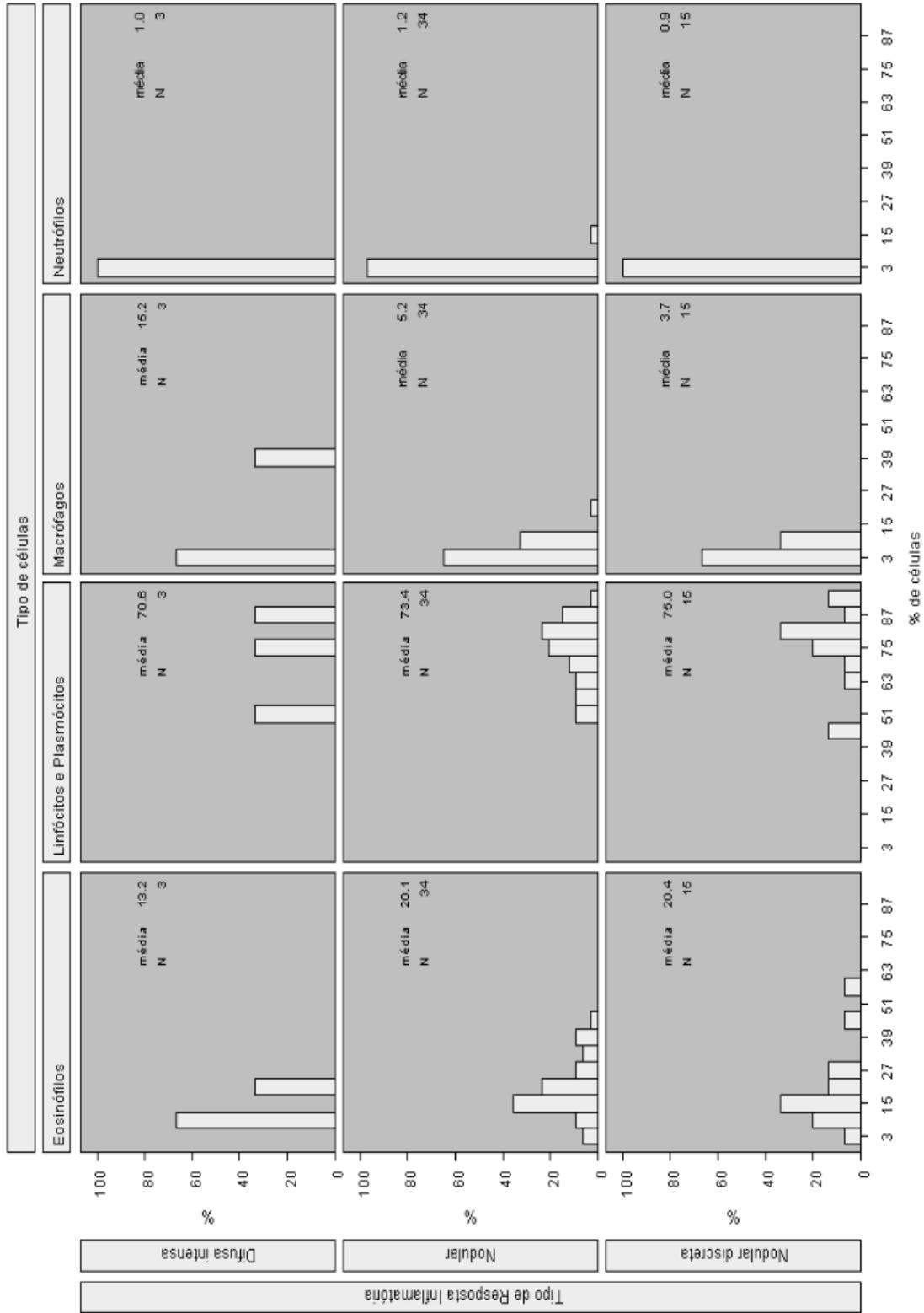


Gráfico 3 – Distribuição em percentagem do número de células de resposta inflamatória em função do seu valor médio, para cada um dos diferentes tipos de resposta granulomatosa.

III.4. Imunohistoquímica

As imunomarcações foram realizadas a 12 biópsias, atendendo às exigências de conservação da estrutura antigénica, indispensável para realizar este tipo de técnica, de forma a assegurar uma boa marcação. As biópsias seleccionadas correspondiam aos três tipos de resposta granulomatosa considerada, apresentando a seguinte distribuição: 7 casos de reacção granulomatosa de tipo nodular, 4 casos de reacção granulomatosa nodular discreta e 1 caso de reacção granulomatosa difusa intensa.

Para as imunomarcações foram utilizados os 4 anticorpos primários especificados na Tabela 1. Assim, para a imunomarcação dos linfócitos T foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CD3, para a imunomarcação dos linfócitos B foi utilizado o anticorpo policlonal anti-CD79 α cy, para imunomarcação da sub-população de linfócitos T $\gamma\delta$ foi utilizado o anticorpo anti-WC1 e para imunomarcação de macrófagos foi utilizado o anticorpo anti-macrófagos/monócitos-calprotectina (MAC387).

Atendendo ao facto de a resposta inflamatória obedecer a um mesmo padrão celular, independentemente do seu arranjo organizacional, foi apenas realizada a análise qualitativa dos fenótipos celulares envolvidos na resposta. Assim, para cada imunomarcação, foi observada a totalidade da biópsia recorrendo a várias ampliações do microscópio e descrito se as células marcadas se distribuíam isoladamente, em pequenos ou grandes grupos.

Não foi obtida marcação para as sub-populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ apesar das várias tentativas efectuadas.

III.4.1. Linfócitos T (CD 3 +)

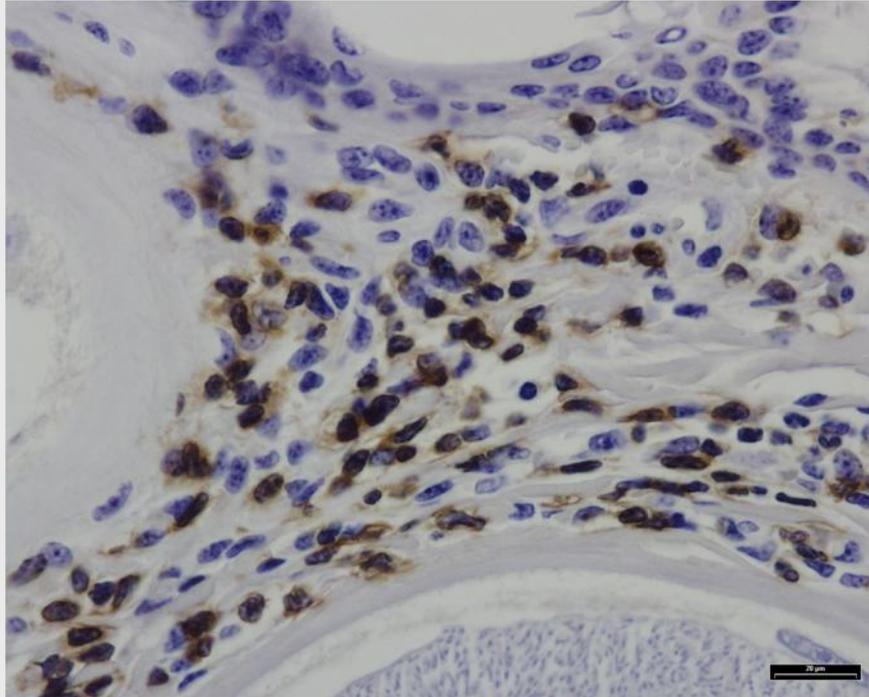


Fig. 20 – Infiltrado celular peri-quístico com numerosos linfócitos T (CD 3+). Imunohistoquímica: anticorpo policlonal anti-CD 3, EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 μm.

O infiltrado celular inflamatório revelou-se predominantemente constituído por linfócitos T, os quais se distribuíam de forma compacta em torno do quisto. Este padrão manteve-se constante para todos os tipos de resposta granulomatosa, independentemente da sua densidade ou do número de quistos por fragmento. Nas figuras 20 e 21 pode constatar-se que os linfócitos T se encontram em contacto directo com a parede dos quistos, envolvendo-os na sua totalidade.

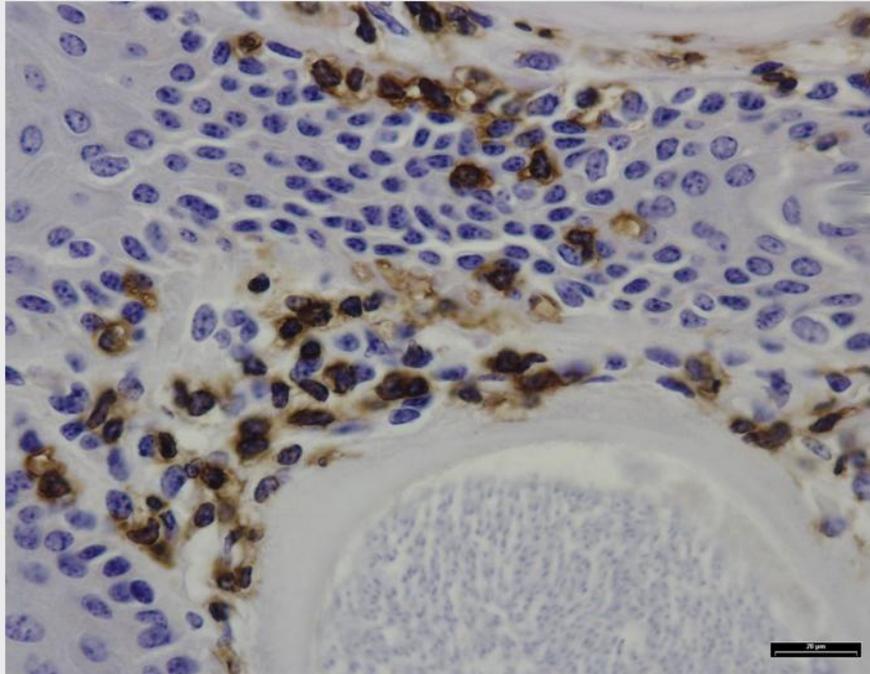


Fig. 21 – Infiltrado celular peri-quístico com numerosos linfócitos T (CD 3+). Imunohistoquímica: anticorpo policlonal anti-CD 3, EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 µm.

III.4.2. Linfócitos B (CD 79 α cy+)

Os linfócitos B surgiram em número reduzido e formando pequenos grupos com distribuição mais afastada da parede do quisto. Este padrão manteve-se constante para todos os tipos de resposta inflamatória granulomatosa, independentemente da sua densidade ou do número de quistos por fragmento. As células apresentavam padrão de diferenciação plasmocitóide, isto é, citoplasma abundante e núcleo de disposição periférica excêntrica (figuras 22 e 23).

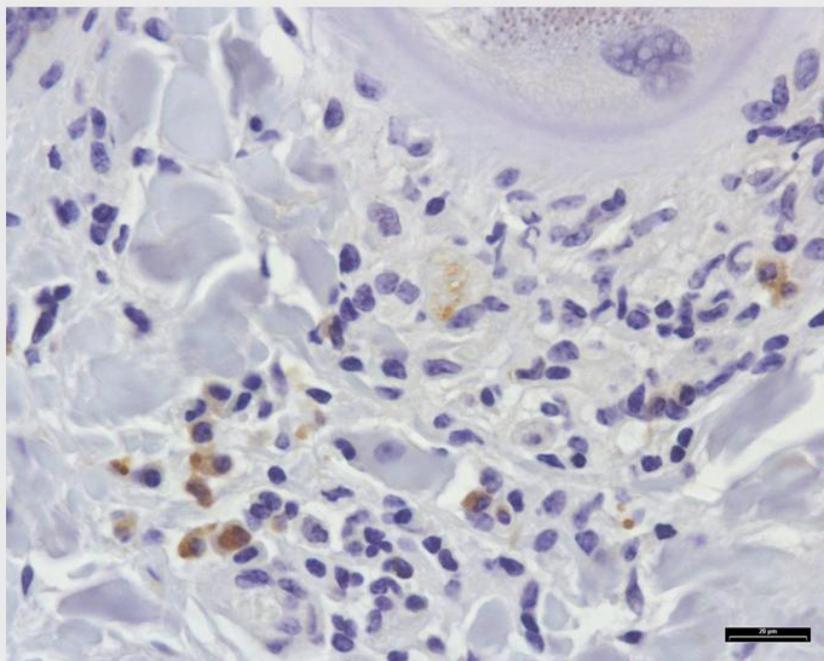


Fig. 22

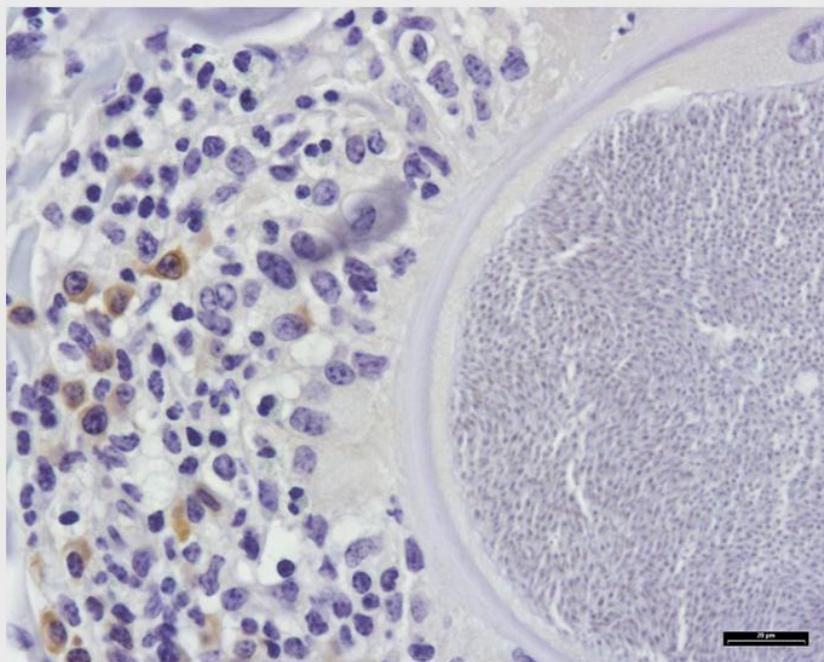


Fig. 23

Figuras 22 e 23 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos B (CD 79 α cy+) com distribuição predominantemente periférica e com diferenciação plasmocitóide. Imunohistoquímica: anticorpo policlonal anti-CD 79 α cy, EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 μ m..

III.4.3. Linfócitos T $\gamma\delta$ (WC1+)

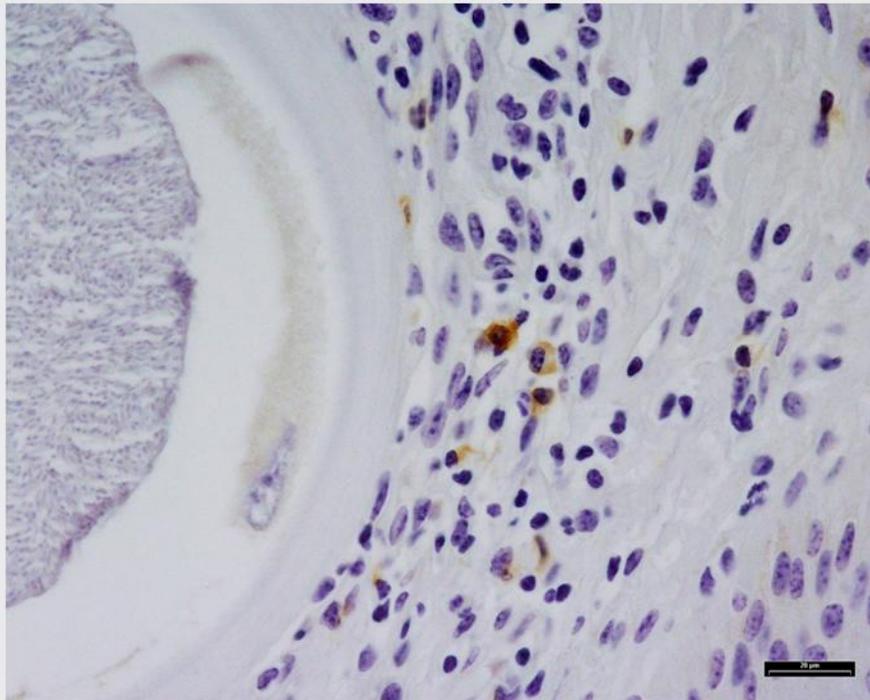


Fig. 24 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ (WC 1+), com distribuição difusa, de forma isolada e no seio da resposta inflamatória. Imunohistoquímica: anticorpo anti-WC 1, EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 μm .

A sub-população de linfócitos T $\gamma\delta$ mostrou-se distribuída de forma dispersa no seio do infiltrado celular peri-quístico. Algumas células surgiram à periferia da reacção inflamatória (figura 24) enquanto que outras surgiram muito próximo da parede do quisto (figura 25). Este padrão manteve-se constante para todos os tipos de reacção inflamatória granulomatosa, independentemente da sua densidade ou do número de quistos por fragmento.

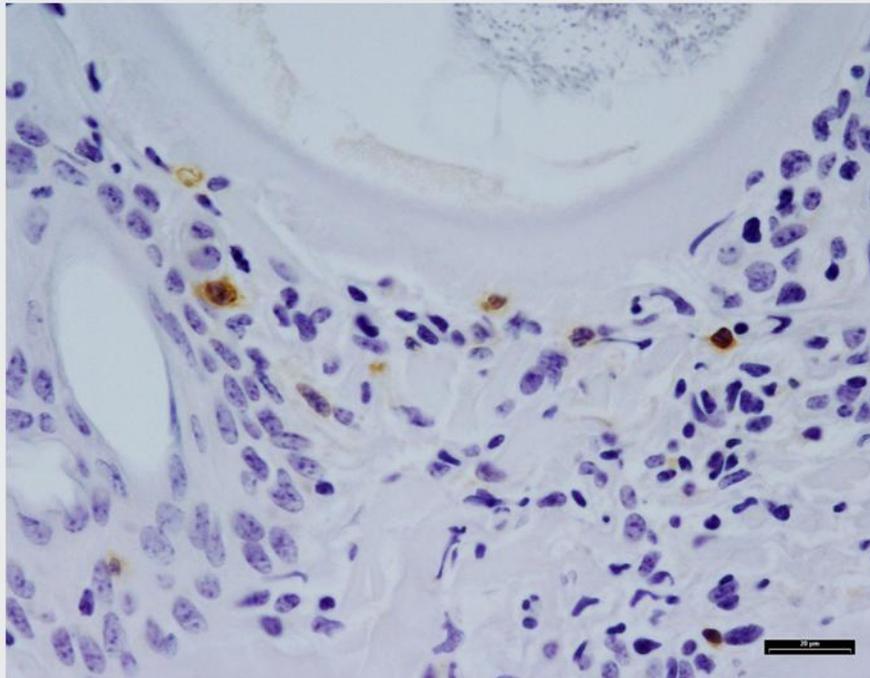


Fig. 25 – Infiltrado celular peri-quístico com pequena quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ (WC 1+), com distribuição difusa, de forma isolada e muito próximo da parede do quisto. Imunohistoquímica: anticorpo anti-WC 1, EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 μm .

III.4.4. Macrófagos

A população de macrófagos surgiu em número elevado, por vezes sob a forma de células gigantes multinucleadas. Estas, conforme se pode observar nas figuras 26 e 27, apresentavam grande proximidade com a parede do quisto, à semelhança dos linfócitos T. Os macrófagos surgiram também de forma dispersa e isolados. Este padrão manteve-se constante para todos os tipos de reacção granulomatosa em que se observou este tipo de células, independentemente da sua densidade ou do número de quistos por fragmento.

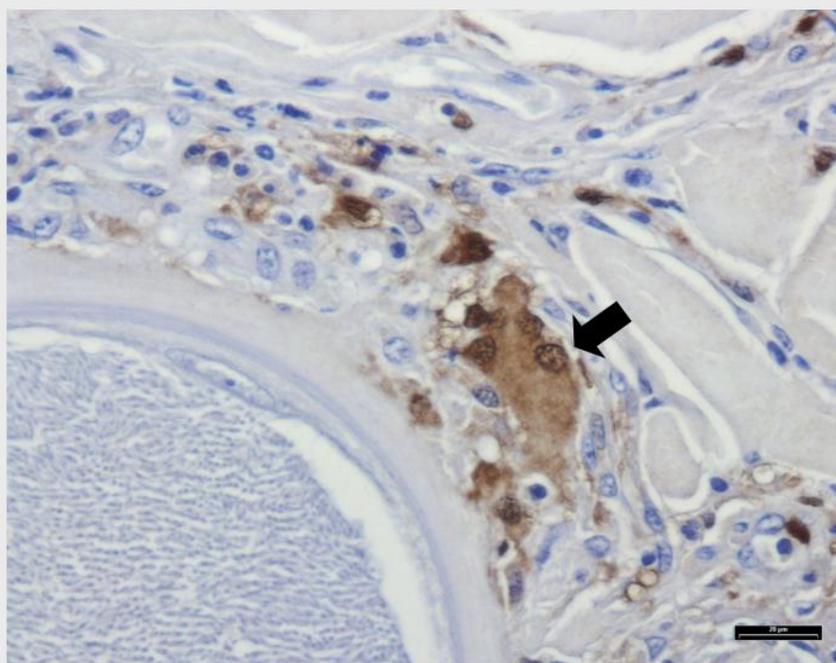
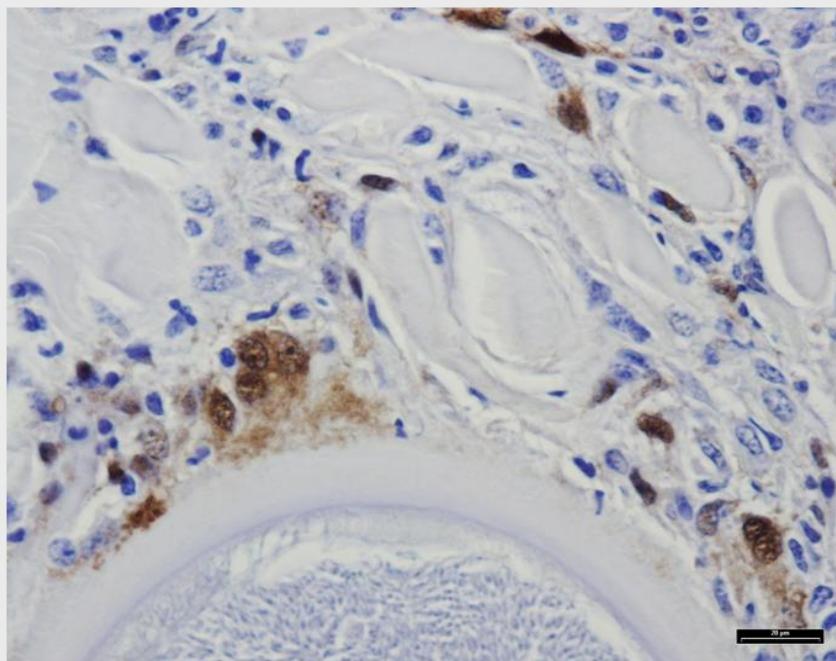


Fig. 27

Figuras 26 e 27 – Infiltrado celular revelando numerosos macrófagos (ac. anti-macrófagos/monócitos+) com distribuição predominantemente peri-quística e sob a forma de células gigantes multinucleadas (célula gigante de Langhans, seta). Imunohistoquímica: anticorpo policlonal anti-macrófagos (MCA874G), EBP, hematoxilina de Mayer. Barra 20 µm.

CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO

IV. Discussão

O presente trabalho ao propor-se estudar do ponto de vista microscópico e imunohistoquímico as lesões cutâneas da fase crónica da besnoitiose bovina, vem constituir uma novidade no estudo desta doença.

A compreensão dos mecanismos de resposta imunitária do hospedeiro face aos agentes infecciosos constitui um passo importante para a obtenção de estratégias vacinais, terapêuticas e de diagnóstico. Recorde-se que, até ao momento, não é conhecido qualquer tratamento eficaz para a besnoitiose bovina. O controlo da infecção depende de estratégias de identificação e consequente, eliminação de animais doentes (reservatórios) e de luta contra vectores (insectos hematófagos e via iatrogénica) uma vez que a vacinação não sendo segura, só deverá ser aplicada em situações particulares.

A premência do desenvolvimento de estratégias de protecção imunitária contra infecções por *Besnoitia besnoiti* é ressaltada pelo facto de se ter vindo a assistir à reemergência desta doença na última década.

Considerando a organização morfológica da reacção inflamatória granulomatosa registada nas 52 biópsias de pele estudadas, 34 apresentavam um padrão nodular, 15 um padrão nodular discreto e somente 3 um padrão difuso intenso. Contudo, na análise estatística das contagens celulares dos diferentes padrões morfológicos não foram encontradas diferenças significativas, o que nos permitiu concluir pela existência de um padrão celular de resposta comum, independente da sua organização. De facto, qualquer que fosse o padrão de resposta em torno do quisto, este era tipicamente constituído por cerca de 20% de eosinófilos, 75% de linfócitos e plasmócitos, 4% de macrófagos e 1% de neutrófilos.

A instalação de uma inflamação crónica é um processo gradual e dinâmico onde ocorrem simultaneamente vários fenómenos, como destruição e reparação celular e/ou focos de inflamação aguda⁹⁴. A observação de várias manifestações morfológicas da resposta granulomatosa na besnoitiose, não evidencia que estejamos perante três manifestações independentes do processo inflamatório, facto este, que é suportado pelo padrão celular quantitativo comum a todos os casos.

Aspecto curioso e assinalável foi a observação de que, por vezes, no mesmo fragmento de biópsia, alguns quistos suscitaram reacção inflamatória discreta a par de outros com inflamação exuberante.

Foram observadas várias formas parasitárias livres (provavelmente, bradizoítos) fora dos quistos no seio da resposta inflamatória (resultados não apresentados). A consulta das referências bibliográficas disponíveis não registou esta ocorrência. Contudo, e como constatado no nosso trabalho, a carga parasitária expressa em número de quistos por fragmento foi muito elevada na maioria das biópsias. Este facto reveste-se de primordial importância, pois para além das alterações anatómicas e funcionais da pele lesionada, a presença de elevado número de parasitas na pele representa um factor epidemiológico relevante devido à transmissão mecânica que ocorre na besnoitiose bovina. Em mais de metade dos casos analisados (28/52), o número de quistos por fragmento de biópsia foi superior a dez.

Ao compararmos a reacção inflamatória que ocorre na fase crónica da besnoitiose bovina, com as respostas desencadeadas por outros Apicomplexa formadores de quistos, nomeadamente *Sarcocystis* sp. e *Toxoplasma gondii*, verifica-se que esta é diferente revestindo-se de características muito particulares. Assim, na sarcocistose raramente são observadas células inflamatórias em contacto com as formas quísticas. Contudo, alguns hospedeiros desenvolvem

graves lesões de miosite eosinofílica e necrose muscular associada a vasculite¹⁰². Na toxoplasmose a infecção induz a secreção de várias citocinas por células da microglia, astrócitos e neurónios, as quais promovem uma supressão da resposta imunitária. Esta supressão é essencial para a manutenção da infecção num estado de latência¹⁰³⁻¹⁰⁶. Os linfócitos T representam um papel fundamental nesta regulação, assim como a produção de IFN- γ ^{107,108}.

A classificação da inflamação granulomatosa nem sempre foi fácil para os patologistas, devido às várias características morfológicas que esta pode oferecer⁹⁴.

A resposta inflamatória granulomatosa constitui-se como um tipo distinto de resposta inflamatória em que existe uma preponderância particular das células do sistema mononuclear fagocitário, nomeadamente, macrófagos activados, células epitelióides e células gigantes multinucleadas⁹⁵. O desenvolvimento e a regulação da inflamação granulomatosa requerem múltiplos factores, entre os quais se destacam, a persistência do antigénio, a intensa resposta imunitária mediada por linfócitos T e a interacção entre as várias citocinas produzidas pelas células intervenientes⁹⁴.

Os monócitos com origem na medula óssea migram do sangue para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos, constituindo o sistema mononuclear fagocitário. Este sistema constitui-se como parte integrante das imunidades inata e adaptativa.

Na resposta inflamatória crónica os macrófagos acumulam-se e permanecem nos locais onde há persistência de antigénio, sejam estes agentes microbianos, corpos estranhos e/ou agressão repetida⁹⁴.

Os macrófagos e os monócitos produzem grande variedade de mediadores da inflamação, nomeadamente quimiocinas, citocinas e óxido nítrico. Estão localizados em pontos estratégicos dos tecidos com o objectivo de sinalizar precocemente a resposta inflamatória aguda, migrar

rapidamente em resposta ao estímulo quimiotáctico, fagocitar agentes e/ou partículas e processar antígenos para apresentação às células efectoras da resposta imunitária adaptativa.

Alguns mediadores, como as quimiocinas e o factor quimiotáctico para os monócitos/macrófagos, promovem a migração do sangue para as zonas de inflamação, nomeadamente, o MCP-1 (CCL-2)¹⁰⁹.

A activação dos monócitos/macrófagos ocorre por diferentes vias. As vias principais são, por um lado, a via clássica, que é mediada pelo IFN- γ , IL-12 e resposta linfocitária Th 1, e por outro, a via alternativa, mediada pela IL-4 e pela IL-13 durante a resposta linfocitária Th 2¹¹⁰.

No nosso trabalho, o elevado número de macrófagos tornou-se rapidamente perceptível, em parte devido à sua diferenciação em células gigantes multinucleadas. Após imunomarcação com o anticorpo anti-macrófagos/monócitos (MAC 387) confirmou-se a sua estreita proximidade com a parede do quisto, à semelhança do observado com os linfócitos T. Estes, surgiram também em elevado número no seio da resposta inflamatória.

Os eosinófilos constituíram-se como o segundo grupo celular mais numeroso na infiltração inflamatória peri-quística. Em 1939, foi postulado que os eosinófilos possuíam um papel importante na resposta imunitária contra parasitas. Em 1970, foi reconhecido que as doenças parasitárias e as doenças alérgicas eram responsáveis por eosinofilia. Os eosinófilos possuem vários mediadores da inflamação no interior dos seus grânulos intra-citoplasmáticos, tais como proteínas básicas, citocinas, quimiocinas, proteases e radicais livres. Este conjunto de mediadores da inflamação é libertado nas infecções parasitárias, nomeadamente, a proteína *major* básica, a proteína cationica eosinofílica, a neurotoxina derivada dos eosinófilos e as enzimas peroxidase eosinofílica e catalase⁹⁴. É de registar o facto deste conjunto de mediadores possuir elevada capacidade lesiva para os diferentes tecidos do organismo, em especial para o

colagénio, o que poderá explicar as extensas lesões observadas na pele dos bovinos na fase crónica da doença. Os factores quimiotáticos para os eosinófilos incluem a histamina e o factor A quimiotáctico (produzido pelos mastócitos), a C5a, as interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-13) e as quimiocinas CCL-5 (RANTES) e CCL-11 (eotaxina), estas últimas produzidas na infecção parasitária¹¹¹.

A resposta Th2 promove um aumento da produção de citocinas, como a IL-5 e a eotaxina provocando elevadas concentrações de eosinófilos¹¹¹.

Os linfócitos desempenham um papel de extrema importância na resposta inflamatória crónica. São atraídos, tal como as outras células, por citocinas, quimiocinas e outros estímulos locais. A imunomarcação com o anticorpo policlonal anti-CD3 revelou que o infiltrado mononuclear é, maioritariamente, constituído por linfócitos T, os quais, se distribuem de forma compacta em torno do quisto e em contacto directo com a sua parede.

Na imunomarcação da sub-população linfocitária T $\gamma\delta$, utilizou-se o anticorpo anti-WC 1. Esta marcação permitiu revelar uma distribuição celular isolada no seio do infiltrado celular peri-quístico, surgindo algumas células à periferia da resposta inflamatória, enquanto que outras surgiram muito próximo da parede do quisto. Os linfócitos T $\gamma\delta$ possuem um papel importante na resposta inflamatória crónica, contribuindo para a formação de granulomas. Este mecanismo é suportado pelo facto de ratinhos geneticamente modificados, sem linfócitos T $\gamma\delta$, não desenvolverem granulomas⁹⁴. Contudo, o papel dos linfócitos T $\gamma\delta$ na manutenção e persistência do granuloma não se encontra totalmente esclarecido. Os bovinos possuem um elevado número de linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes quando comparados com a proporção relativa dos outros linfócitos T, chegando a constituir 50% da população de linfócitos T em animais jovens. De facto, nos primatas e nos roedores os linfócitos T $\gamma\delta$ constituem apenas cerca de 5% dos linfócitos

circulantes¹¹². Por esta razão, o bovino constitui um modelo muito interessante para o estudo do papel destas células na resposta granulomatosa.

Os linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4/CD8) são a chave para a regulação da resposta imunitária adaptativa, particularmente, no estabelecimento de respostas Th1, Th2 ou Th0 e na formação de granulomas¹¹⁰. A ausência de marcação positiva para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 deveu-se, provavelmente, à sua incapacidade de reconhecer os respectivos antígenos nos linfócitos de bovinos nas amostras utilizadas. A perda de antigenicidade tecidual é comumente consequência dos processos de fixação em formaldeído e inclusão em parafina. Com efeito, os antígenos CD4 e CD8 são moléculas lábeis, sensíveis à fixação e, por isso mesmo, dificilmente detectáveis em tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina. Gutierrez *et al.*¹¹³ foram bem sucedidos na marcação de ambos os antígenos em tecidos de bovino fixados em dicromato de formaldeído. Não se encontrou qualquer referência na literatura à sua detecção em tecidos de bovino fixados com formaldeído a 3,7%. A detecção deste tipo celular de linfócitos em tecidos de bovino é igualmente bem conseguida em tecidos criopreservados e fazendo uso de anticorpos espécie-específicos.

As respostas Th1 e Th2 na inflamação crónica, bem como na formação de granulomas, diferem nas células envolvidas e também no grau de fibrose. Nos granulomas Th1 e Th2 verifica-se que 30% a 60% dos linfócitos T são específicos para o antígeno que suscitou este tipo de resposta, independentemente da origem deste¹¹⁰.

As moléculas co-estimulatórias são importantes na activação dos linfócitos T. A molécula CD48 é necessária para o recrutamento de linfócitos T CD4+ para o granuloma e para a produção de IFN- γ . Os linfócitos T CD8+ possuem um papel importante na lise de macrófagos contendo agentes infecciosos fagocitados. Estes acontecimentos celulares promovem a libertação

do agente permitindo o estabelecimento de uma resposta Th1 ou Th2¹¹⁰.

Os linfócitos B contribuem para a inflamação crónica por duas vias: apresentação de antígenos e diferenciação em células produtoras de imunoglobulinas (plasmócitos). Estas são responsáveis pela opsonização de antígenos facilitando a fagocitose. No nosso estudo, após imunomarcagem com o anticorpo policlonal anti-CD79 α , constatámos que estas células surgiram em número reduzido e formando pequenos grupos com distribuição mais afastada da parede do quisto. As células apresentaram um padrão de diferenciação plasmocitóide, isto é, revelaram citoplasma abundante e núcleo de disposição periférica excêntrica o que é claramente indicador de intensa produção de imunoglobulinas.

A distribuição celular observada, com excepção do elevado número de eosinófilos, assemelha-se, em parte, aos granulomas provocados pela infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos^{114,115}. Estes apresentam, igualmente, predominância de linfócitos T, formação de células gigantes multinucleadas, distribuição dispersa dos linfócitos T $\gamma\delta$ e distribuição periférica de linfócitos B^{114,115}.

CAPÍTULO V - CONCLUSÕES

V. Conclusões

V.1. Conclusões e perspectivas futuras

Podemos concluir que o padrão lesional que ocorre na pele de bovinos infectados na fase crónica da doença é de uma reacção inflamatória granulomatosa.

O infiltrado inflamatório que rodeia o quisto é maioritariamente constituído por linfócitos T, seguindo-se os eosinófilos e os macrófagos. Os linfócitos B surgem perifericamente, em pequenos grupos e com diferenciação plasmocitóide. A sub-população T $\gamma\delta$ surge isolada e dispersa por todo o infiltrado.

A imunomarcação de células de bovino, recorrendo a tecidos fixados pelas técnicas correntes em Anatomia Patológica (nomeadamente, em formaldeído a 3,7%), encontra-se ainda numa fase inicial. No futuro, seria importante caracterizar a sub-população T CD4/CD8 uma vez que estas células são a chave para a regulação da resposta imunitária adaptativa, nomeadamente no estabelecimento de respostas Th1, Th2 ou Th0 e na formação de granulomas.

Para compreensão mais rigorosa da imunologia associada à infecção por *Besnoitia besnoiti*, particularmente na fase crónica, seria importante não só caracterizar mais exhaustivamente as diferentes células envolvidas, como também caracterizar o perfil de citocinas, quimiocinas e outros mediadores da inflamação participantes na formação de resposta granulomatosa.

De acordo com consulta bibliográfica, não existem referências quanto a estudos/inquéritos serológicos em humanos relativamente à possibilidade de infecção por parasitas do género *Besnoitia*. Contudo, não nos podemos esquecer que *Besnoitia besnoiti* é um protozoário intra-

celular obrigatório, pertencente à família *Toxoplasmatidae* da qual fazem parte os parasitas do género *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Neospora*. O primeiro é reconhecidamente um agente causador de doença no Homem e o último, apontado como uma das principais causas de aborto em bovinos¹¹⁶ foi, recentemente, motivo de preocupação devido ao facto de terem sido encontrados humanos infectados pelo VIH serologicamente positivos, questionando-se ainda a possibilidade de este poder causar doença no Homem^{117,118}. Assim sendo, afigura-se-nos pertinente aprofundar o estudo deste parasita, cuja proximidade filogenética com os géneros *Toxoplasma* e *Neospora* é elevada.

Esperamos que o nosso trabalho possa contribuir para a compreensão dos mecanismos de resposta imunitária do hospedeiro intermediário, bem como para o esclarecimento do quadro anatomo-histopatológico da besnoitiose bovina, e que possa servir de base para estudos futuros de aprofundamento do conhecimento sobre a reacção inflamatória granulomatosa.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. Referências Bibliográficas

- 1 - Cadéac. 1884. Identité de l'éléphantiasis et de l'anasarque du boeuf. Description de cette maladie. *Rev Vét* 521.
- 2 - Besnoit, C., Robin, V. 1912. Sarcosporidioses cutanée chez une vache. *Rec Vet* 37, 649.
- 3 - Franco, E. E., Borges, I. 1915. Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária*. XIV, 255-268.
- 4 - Franco, E. E., Borges, I. 1915. Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária*. XIV, 287-298.
- 5 - Henry. 1912. Sarcosporidiose cutanée chez une Vache. *Recueil de Médecine Vétérinaire* XC, 327.
- 6 - Marotel, M. 1912. Discussion of paper by Besnoit and Robin. *Bull. et Mém. de la Société de Sciences Veterinaires de Lyon et de la Société de Médecine Vétérinaire de Lyon et du Sud-Est*. 15, 196-217.
- 7 - Eckert, J., Rommel, M., Kutzer, E. 1992. Systematik und Taxonomie. *Veterinarmedizinische Parasitologie*, edited by J. Eckert, E. Kutzer, M. Rommel, H. Burger, & W. Korting, pp. 4-22. Berlin: Paul Parey.
- 8 - Dubey, J. P., Gendron-Fitzpatrick, A. P., Lenhard, A. L., Bowman, D. 1988. Fatal toxoplasmosis and enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* in a Pallas cat (*Felis manul*). *J Protozool* 35, 528-530.
- 9 - Dubey, J. P., Speer, C. A. 1991. *Sarcocystis canis* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), the

etiologic agent of generalized coccidiosis in dogs. *J Parasitol* 77, 522-527.

10 - Dubey, J. P., Lindsay, D. S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67, 1-59.

11 - Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Saville, W. J., Reed, S. M., Granstrom, D. E., Speer, C. A. 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol* 95, 89-131.

12 - Frenkel, J. K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J Parasitol* 63, 611-628.

13 - Tenter, A. M., Johnson, A. M. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol* 39, 69-139.

14 - Ellis, J. T., Holmdahl, O. J., Ryce, C., Njenga, J. M., Harper, P. A., Morrison, D. A. 2000. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist* 151, 329-336.

15 - Sheffield, H. G. 1966. Electron microscope study of the proliferative form of *Besnoitia jellisoni*. *J Parasitol* 52, 583-594.

16 - Shkap, V., Yakobson, B. A., Pipano, E. 1988. Transmission and scanning electron microscopy of *Besnoitia besnoiti*. *Int J Parasitol* 18, 761-766.

17 - Njenga, J. M., Bwangamoi, O., Kangethe, E. K., Mugeru, G. M., Mutiga, E. R. 1995. Comparative ultrastructural studies on *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia caprae*. *Vet Res Commun* 19, 295-308.

18 - Dubey, J. P. 1976. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats

and dogs. *J Am Vet Med Assoc* 169, 1061-1078.

19 - Kirkpatrick, C. E., Dubey, J. P. 1987. Enteric coccidial infections. *Isospora, Sarcocystis, Cryptosporidium, Besnoitia, and Hammondia*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 17, 1405-1420.

20 - Dubey, J. P. 1993. Protozoal abortion in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 203, 1250-1251.

21 - Grisard, E. C., Elsaid, M. M., Tafuri, W. L., Lima, J. D., Pinto, C. J., Steindel, M., Vitor, R. W. 1997. *Besnoitia* sp. (Protozoa: Toxoplasmatinae) from *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae) in Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol* 83, 314-316.

22 - Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Rosenthal, B. M., Sreekumar, C., Hill, D. E., Shen, S. K., Kwok, O. C., Rickard, L. G., Black, S. S., Rashmir-Raven, A. 2002. Establishment of *Besnoitia darlingi* from opossums (*Didelphis virginiana*) in experimental intermediate and definitive hosts, propagation in cell culture, and description of ultrastructural and genetic characteristics. *Int J Parasitol* 32, 1053-1064.

23 - Dubey, J. P., Sreekumar, C., Rosenthal, B. M., Lindsay, D. S., Grisard, E. C., Vitor, R. W. 2003. Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodoni* n.sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent *Akodon montensis* in Brazil. *Parassitologia* 45, 61-70.

24 - Dubey, J. P., Sreekumar, C., Rosenthal, B. M., Vianna, M. C., Nylund, M., Nikander, S., Oksanen, A. 2004. Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Int J Parasitol* 34, 1273-1287.

25 - Dubey, J. P., Sreekumar, C., Donovan, T., Rozmanec, M., Rosenthal, B. M., Vianna, M. C., Davis, W. P., Belden, J. S. 2005. Redescription of *Besnoitia bennetti* (Protozoa: Apicomplexa)

- from the donkey (*Equus asinus*). *Int J Parasitol* 35, 659-672.
- 26 - Tadros, W., Laarman, J. J. 1982. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst- forming eimeriid coccidia. *Adv Parasitol* 20, 293-468.
- 27 - Smith, D. D., Frenkel, J. K. 1977. *Besnoitia darlingi* (Protozoa: Toxoplasmatinae): cyclic transmission by cats. *J Parasitol* 63, 1066-1071.
- 28 - Smith, D. D., Frenkel, J. K. 1984. *Besnoitia darlingi* (Apicomplexa, Sarcocystidae, Toxoplasmatinae): transmission between opossums and cats. 1. *J Protozool* 31, 584-587.
- 29 - Dubey, J. P., Sreekumar, C., Lindsay, D. S., Hill, D., Rosenthal, B. M., Venturini, L., Venturini, M. C., Greiner, E. C. 2003. *Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits. *Parasitol* 126, 521-539.
- 30 - Dubey, J. P., Lindsay, D. S. 2003. Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites. *Int J Parasitol* 33, 807-819.
- 31 - Pols, J. W. 1960. Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort J Vet Res* 28, 265-356.
- 32 - Cortes, H. C., Reis, Y., Waap, H., Vidal, R., Soares, H., Marques, I., Pereira da Fonseca, I., Fazendeiro, I., Ferreira, M.L., Caeiro, V., Shkap, V., Hemphill, A., Leitão, A. 2006. Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet Parasitol* 141(3-4), 226-33.
- 33 - Dubey, J. P., Shkap, V., Pipano, E., Fish, L., Fritz, D. L. 2003. Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol* 50, 240-244.
- 34 - Wallace, G. D., Frenkel, J. K. 1975. *Besnoitia* species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): recognition of cyclic transmission by cats. *Science* 188, 369-371.

- 35 - Diesling, L., Heydorn, A. O., Matuschka, F. R., Bauer, C., Pipano, E., de Waal, D. T., Potgieter, F. T. 1988. *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitol Res* 75, 114-117.
- 36 - Bigalke, R. D. 1981. Besnoitiosis and globidiosis, Diseases of Cattle in Tropics, edited by M. Ristic & I. McIntyre, pp. 429-442. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers.
- 37 - Bigalke, R. D. 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort J Vet Res* 35, 3-138.
- 38 - Peteshev, V. M., Galuzo, I. G., Polomoshov, A. P. 1974. Cats - definitive hosts *Besnoitia* (*Besnoitia besnoiti*). *Izvestiae Akademii Nauk Kazakheskan SSR B*, 33-38.
- 39 - Levine, N. D. 1977. Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and on fecal Coccidia of the dog and cat. *J Parasitol* 63, 36-51.
- 40 - Soulsby, E. J. L. 1982. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7 Edition, Ed Baillière Tindall, London.
- 41 - Ferreira, M. L. 1985. Besnoitiose Bovina. Aspectos Anátomo-Clínicos. Tipografia Minerva Central: Maputo, R.P. Moçambique. pp 110.
- 42 - Rommel, M. 1989. Recent advances in the knowledge of the biology of the cyst-forming coccidian. *Angew Parasitol* 30, 173-183.
- 43 - Bussiéras, J., Chermette, R. 1992. Abrégé de Parasitologie Vétérinaire. Fascicule II: Protozoologie Vétérinaire Service de Parasitologie - École Nationale de Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort.
- 44 - Bigalke, R. D. 1960. Preliminary observation on the mechanical transmission of cyst

organisms of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis* Newstead, 1910. *J S Afr Vet Med Ass* 31, 37-44.

45 - Marsh, A. E., Barr, B. C., Packham, A. E., Conrad, P. A. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol* 983-991.

46 - Hofmeyr, C. F. B. 1945. Globidiosis in cattle. *J S Afr Vet Med Ass* 16, 102-109.

47 - Pols, J. W. 1954. Preliminary notes on the behaviour of *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) in the rabbit. *J S Afr Vet Med Ass* 25, 45-48.

48 - Leitão, J. L. S. 1949. Globidiose bovina por *Globidium besnoiti* (Marotel 1912). *Revista de Medicina Veterinária* 330, 152-158.

49 - Juste, R. A., Cuervo, L. A., Marco, J. C., Oregui, L. M. 1990. La besnoitiosis bovina: desconocida en España? *Medicina Veterinária* 7, 613-618.

50 - Irigoien, M., Del Cacho, E., Gallego, M., Lopez-Bernad, F., Quilez, J., Sanchez-Acedo, C. 2000. Immunohistochemical study of the cyst of *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol* 91, 1-6.

51 - Pols, J. W. 1954. The artificial transmission of *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) to cattle and rabbits. *J S Afr Vet Med Ass* 25, 37-44.

52 - Neuman, M. 1972. Serological survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence. *Zentralbl Veterinarmed* 19, 391-396.

53 - Bigalke, R. D. 1967. The artificial transmission of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from chronically infected to susceptible cattle and rabbits. *Onderstepoort J Vet Res* 34, 303-316.

54 - Neuman, M., Nobel, T. A. 1981. Observations on the pathology and besnoitiosis in

experimental animals. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 28, 345-354.

55 - Basson, P. A., van Niekerk, J. W., McCully, R. M., Bigalke, R. D. 1965. Besnoitiosis in South African antelopes: a preliminary note on the occurrence of *Besnoitia* cysts in the cardiocascular system. *J S Afr Vet Med Ass* 36, 578.

56 - Basson, P. A., McCully, R. M., Bigalke, R. D. 1970. Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *Onderstepoort J Vet Res* 37, 105-126.

57 - Bigalke, R. D., Naude, T. W. 1962. The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis. *J S Afr Vet Med Ass* XXXIII, 21-27.

58 - Sannusi, A. 1991. A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. *Vet Parasitol* 39, 185-188.

59 - Ferreira, M. L., Nunes Petisca, J. L., Dias, O. H. 1982. Alterações testiculares em touros de Moçambique assintomáticos e com sintomas clínicos de besnoitiose. *Rep Trab I N V* XIV, 97-108.

60 - Shkap, V., Pipano, E., Marcus, S., Krigel, Y. 1994. Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort J Vet Res* 61, 273-275.

61 - Kumi-Diaka, J., Wilson, S., Sannusi, A., Njoku, C. E., Osoru, D. I. K. 1981. Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. *Theriogenology* 16, 523-530.

62 - Oduye, O. 1974. Occurrence of inapparent cutaneous besnoitiosis in cattle in Nigeria. *Journal of Nigerian Veterinary Medical Association* 3, 92-96.

- 63 - Hussein, M. F., Haroun, E. M. 1975. Bovine cutaneous besnoitiosis in Sudan: a case report. *Br Vet J* 131, 85-88.
- 64 - Herin, V. V. 1952. Bovine globidiosis in Ruanda-Urundi. *Ann Soc Belg Med Trop* 32, 155-159.
- 65 - Ferreira, M. L., Dias, O. H. 1984. Importancia de la besnoitiosis en la fertilidad de los toros. *10 International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*.
- 66 - Krasov, V. M., Omarov, Z. K., Uvaliev, I. U., Khvan, M. V. 1975. Besnoitiosis in animals. *Veterinarya* 2, 65-70.
- 67 - Vsevolodov, B. P. 1961. On besnoitiosis of cattle in Kazakhstan., Vol. 3, Natural focuses of disease and problems of parasitology, Kazakh, SSR: Academy of Sciences.
- 68 - Goldman, M., Pipano, E. 1983. Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Trop Anim Health Prod* 15, 32-38.
- 69 - Shkap, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L., Baszler, T. 2002. Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol* 106, 35-43.
- 70 - Shkap, V., Pipano, E., Zwernemann, B. 1995. Activity of a monoclonal antibody against *Besnoitia besnoiti* endozoites. *Vet Res* 26, 328-334.
- 71 - Shkap, V., Matuschka, F. R., Yakobson, B., Perl, S., Frank, M., Pipano, E. 1995. Differentiating between *Besnoitia besnoiti* from cattle and *Sarcocystis hoarensis* from rodents. *Parasitol Res* 81, 490-493.
- 72 - Shkap, V., Bin, H., Lebovich, B., Pipano, E. 1991. *Besnoitia besnoiti*: quantitative in vitro studies. *Vet Parasitol* 39, 207-213.

- 73 - Shkap, V., de Waal, D. T., Potgieter, F. T. 1985. Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits. *Onderstepoort J Vet Res* 52, 289.
- 74 - Shkap, V., Ungar-Waron, H., Pipano, E., Greenblatt, C. 1985. Specific antibodies to *Besnoitia besnoiti* precipitated from serum of cattle by live parasites and by soluble antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 9, 53-57.
- 75 - Herenda, D. 2000. Parasitic diseases, manual on meat inspection for developing countries. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 76 - Malta, M., Silva, M. 1991. Besnoitiose no Alentejo. *XIV Jornadas de Medicina Veterinária "Bovinos de Carne"*.
- 77 - Caeiro, V., Ferreira, M. L., Branco, S. 2001. Besnoitiose bovina no Alentejo, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa* 8, 143.
- 78 - Cortes, H., Ferreira, M. L., Vidal, R., Pereira da Fonseca, I., Fazendeiro, I., Leitão, A., Caeiro, V. 2003. Besnoitiose, uma realidade na bovinicultura portuguesa, VII Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria.
- 79 - Cortes, H., Leitão, A., Vidal, R., Reis, Y., Waap, H., Pereira da Fonseca, I., Fazendeiro, I., Ferreira, M. L., Caeiro, V. 2004. Bovine besnoitiosis, one approach for a better understanding of its importance in Portugal. Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, pp. 35-36.
- 80 - Cortes, H., Vila-Viçosa, M. J., Ferreira, M. L., Vidal, R., Caeiro, V. 2003. Besnoitiose bovina em Portugal: mais um caso recente. *Acta Parasitológica Portuguesa* 10, 70-71.
- 81 - Shkap, V., Ungar-Waron, H., Pipano, E., Greenblatt, C. 1984. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop Anim*

Health Prod 16, 233-238.

82 - Cortes HC, Nunes S, Reis Y, Staubli D, Vidal R, Sager H, Leitão A, Gottstein B. 2006. Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Vet Parasitol* 141, 216-25.

83 – Cortes, H. C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitão, A., Müller, N. 2007. Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet Parasitol* 146 (3-4), 352-6.

84 - Elsheikha, H. M., Mansfield, L. S. 2004. Determination of the activity of sulfadiazine against *Besnoitia darlingi* tachyzoites in cultured cells. *Parasitol Res* 93, 423-426.

85 - Shkap, V., Pipano, E., Greenblatt, C. 1987. Cultivation of *Besnoitia besnoiti* and evaluation of susceptibility of laboratory animals to cultured parasites. *Vet Parasitol* 23, 169-178.

86 - Shkap, V., Pipano, E., Ungar-Waron, H. 1987. *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 40, 259-264.

87 - Pipano, E. 1995. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet Parasitol* 57, 213-231.

88 - Pipano, E. 1997. Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop Anim Health Prod* 29, 86S-90S.

89 - Bigalke, R. D., Schoeman, J. H., McCully, R. M. 1974. Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. Studies on rabbits. *Onderstepoort J Vet Res* 41, 1-5.

90 – Cortes, H. C., Mueller, N., Esposito, M., Leitão, A., Naguleswaran. A., Hemphill, A. 2007.

In vitro efficacy of nitro and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitol* 134, 975-85.

91 - Herin, V. V., Thienpont, D. 1954. Pathogenesis of globidiosis in cattle. *Ann Soc Belg Med Trop* 34, 111-112.

92 - Bigalke, R. D., Prozesky, L. 2004. Besnoitiosis, Vol. 1, Infectious Diseases of Livestock, edited by J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, Cape Town: Oxford university Press Southern Africa. pp. 331-359.

93 - Bigalke, R. D., Basson, P. A., McCully, R. M., Bosman, P. P. 1973. Studies in cattle on the development of a live vaccine against bovine besnoitiosis, Biennial Scientific Congress, South African Veterinary Association, Pretoria, pp. 2-3.

94 - Ackermann, M. R. 2007. Chronic inflammation and wound healing. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. McGavin, J. Zachary, Mosby Elsevier Inc., St. Louis Missouri, pp 153-191.

95 - Collins, T. 1999. Acute and chronic inflammation. In *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Cotran, Kumar, Collins, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 50-88.

96 - Sibley, L. D. 2004. Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304, 248-253.

97 - Soldati, D., Foth, B. J., Cowman, A. F. 2004. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol* 20, 567-574.

98 - Cortes, H., Ferreira, M. L., Silva, J. F., Vidal, R., Serra, P., Caeiro, V. 2003. Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98 (545), 43-46.

99 - Niku, M., Ekman, A., Pessa-Morikawa, T., Livanainen, A. (2006). Identification of major

cell types in paraffin sections of bovine tissues. *BMC Veterinary Research* 2:5 (published online <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/5>, acedido em Janeiro de 2007).

100 - Shi, S., Cote, R., Taylor, C. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. *J Histochem Cytochem* 45: 327-344.

101 - Sompuram, S., Vani, K., Messana, E., Bogen, S. 2004. A Molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol* 121 (2), 190-199.

102 - Fayer, R. 2004. *Sarcocystis* spp. in Human infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 894-902.

103 - Suzuki, Y. 2002. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185 (Suppl 1), 58–65.

104 - Carruthers, V.B., Yasuhiro S. 2007. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull* 33, 745–751.

105 - Bhopale, G.M. 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26, 213–222.

106 - Hiramoto, R. M., Galisteo, A. J., Nascimento, N. Andrade, H. F. 2002. 200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine* 20, 2072–2081.

107 - Wang, X., Kang, H., Kikuchi, T., Suzuki, Y. 2004. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. *Infect Immun* 72, 4432–4438.

108 - Kasper, L., Courret., N., Darce, S., Luangsay, S., Mennechet, F., Minns, L., Rachinel, N.,

Ronet, C., Dominique Buzoni-Gatel, D. 2004. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol* 34, 401–409.

109 - Rottman, J.B. 1999. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia and infectious disease. *Vet Pathol* 36, 357-367.

110 - Alves, C.R., Benevolo-de-Andrade, T. C., Alves, J.L., Pirmez, C. 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 26, 127–135.

111 - Yang, D., Biragyn, A. & Hoover, D. M. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Ann Rev Immunol* 22, 181-215.

112- Daubenberger, C. A., Taracha. E. L., Gaidulis, L., Davis, W. C., McKeever, D. J. 1999. Bovine gammadelta T-cell responses to the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *Infect Immun* 67, 2241-9.

113 - Gutierrez, M., Forster, F.I., McConnell, S.A., Cassidy, J.P., Pollock, J.M., Bryson, D.G. 1999. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 321-334.

114 - Liebana, E., Marsh, S., Gough, J., Nunez, A., Vordermeier, H. M., Whelan, A., Spencer, Y., Clifton-Hardley, R., Hewinson, G., Johnson, L. 2007. Distribution and Activation of T-lymphocyte Subsets in Tuberculous Bovine Lymph-node Granulomas. *Vet Pathol* 44,366–372.

115 - Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C. 2007. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with

Mycobacterium bovis. *Vet Pathol* 44, 863-74.

116 - Omata, Y., Kano, R., Masukata, Y., Kobayashi, Y., Igarashi, M., Maeda, R., Saito, A. 2005. Development of *Neospora caninum* cultured with human serum in vitro and in vivo 4. *J Parasitol* 91, 222-225.

117 - Tranas, J., Heinzen, R. A., Weiss, L. M., McAllister, M. M. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diag Lab Immunol* 6, 765-767.

118 - Lobato, J., Silva, D. A., Mineo, T. W., Amaral, J. D., Segundo, G. R., Costa-Cruz, J. M., Ferreira, M. S., Borges, A. S., & Mineo, J. R. (2006). Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol* 13, 84-89.