



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI* EM MODELO
MURINO E ESTUDO DA EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DO BENZNIDAZOL

JOÃO LUÍS GOMES PEREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Berta Maria Ferreira Fernandes São Braz

Doutor Marcelo de Sousa da Silva

ORIENTADOR

Doutor Marcelo de Sousa da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2013

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI* EM MODELO
MURINO E ESTUDO DA EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DO BENZNIDAZOL

JOÃO LUÍS GOMES PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Berta Maria Ferreira Fernandes São Braz

Doutor Marcelo de Sousa da Silva

ORIENTADOR

Doutor Marcelo de Sousa da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira

da Fonseca de Sampaio

2013

LISBOA

À minha família, por me terem feito como eu sou, e sem a qual não teria chegado onde estou.

Agradecimentos

Ao meu orientador do IHMT, o Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva, por me ter dado a conhecer o mundo da investigação em Doenças Tropicais, por todo o apoio dado durante a realização deste trabalho e pelo constante incentivo para ir mais longe.

À minha coorientadora, a Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, por toda a paciência, disponibilidade e palavras de encorajamento durante o estágio e a realização da dissertação.

Aos Professores Doutores Jorge Atouguia e Jorge Seixas, aos Doutores Sónia Lima e Nuno Rolão e à D. Formosa Figueiredo por tão bem me terem acolhido na UCDT, e por toda a disponibilidade.

À Ana Filipa Teixeira, que me desmistificou o laboratório e que sempre me apoiou e ajudou em todos os passos, e em todas as dificuldades deste.

À Ruth Medeiros, ao Jay Querido, à Karina de Sousa, à Adalgiza Ramos, à Vanessa Martins e à Sónia Pestana, por não só terem partilhado comigo a vossa experiência valiosa, mas por todos os risos, brincadeiras e alcunhas que alegraram dias, muitas vezes bem cinzentos.

À Daniela, ao Rúben, à Filipa Ferreira, à Isa, à Mónica, à Marta e à Lis pela simpatia e companhia durante o meu estágio no IHMT.

À Dra. Lídia Gomes, por todo o apoio que me deu antes e durante do estágio, e por ter alimentado o meu “bichinho” da parasitologia.

À Professora Doutora Anabela Santos Moreira, ao Professor Miguel Saraiva Lima e ao Professor Doutor José Ferreira da Silva pela ocasional palavra de apoio que tanto me ajudou.

À Professora Conceição Peleteiro, pelo apoio dado.

À Cláudia Ramos pelo apoio e amizade.

Aos meus colegas de turma que sempre tiveram uma palavra amiga ou de ajuda, em especial a Inês Guimarães, o Nuno Freitas, a Gabriela Koch e o Francisco Malcata.

À Susana Mendes, uma afilhada impecável e ao meu “neto” Ricardo Lopes, pelo apoio dado este ano.

À Rita Ferreira e à Rita Telhada por terem estado lá para mim desde quase o início do curso.

Ao corpo clínico do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, em especial ao Dr. Gonçalo Vicente, à Dra. Maria Inês Marques, à Dra. Alexandra Basso e às auxiliares Carla Silva e Sofia Caldeira por me terem recebido tão bem e por tudo o que me ensinaram no curto estágio que realizei.

Aos meus colegas de estágio no Hospital Escolar, pela ajuda e companheirismo.

Ao corpo clínico do Hospital Veterinário Vasco da Gama, em especial aos Drs. Bruno Oliveira, Ana Sofia Alves, Susana Vítor, Carla Pedroso, Patrícia Ginja e Ana Loureira, e às auxiliares Joana Gomes, Aline Almeida e Helena Mesquita por todo o apoio e amizade que me deram ao longo destes quase dois anos que nos conhecemos.

Ao David Ramilo, Cátia Marques, Ana Lopes, António Crespo e Bernardo Cabaço por todos os bons momentos passados no Laboratório de Parasitologia.

Aos meus amigos de sempre David Pinto, Pedro Ribeiro, Maria São Pedro, Isabel Pinto, Adriana Delgado, Rita Porto, Tânia Pinto, Catarina Russo e Maria do Valle pela amizade que já dura há anos e nunca enfraquece.

À Dulce Sanches pela amizade que também não se altera, quem me ajudou a entrar no curso e quem me apoiou desde o início ao fim deste.

Às Dras. Paula Santana e Rosalinda Preza, talvez as pessoas que desde cedo mais me impulsionaram e me desafiaram a ser melhor nas ciências da vida.

Ao Nuno Rombo, pois o meu melhor amigo é o melhor amigo do mundo.

À minha madrinha, por estar sempre lá para mim mesmo estado longe.

À minha grande e cada vez maior família, pelo carinho e apoio.

Às minhas irmãs por sempre terem estado comigo e apoiado as minhas decisões até hoje.

Ao Dinis e ao Guilherme, os sobrinhos mais lindos que alguém pode pedir.

Aos meus animais, que embora não falem nem pensem como nós, são parte da família e é para eles e por eles que trabalho.

Ao meu Pai por ter possibilitado que eu me tornasse veterinário.

À minha Mãe por ser a melhor mãe do Mundo.

INFEÇÃO EXPERIMENTAL POR *TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI* EM MODELO MURINO E ESTUDO DA EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DO BENZNIDAZOL

Resumo

A Tripanossomose Africana (TA) é uma doença parasitária provocada por várias espécies de *Trypanosoma*, transmitidas por dípteros do género *Glossina*, vulgo moscas tsé-tsé. Esta doença afeta humanos e animais, tomando nos humanos o nome de Doença do Sono, e nos animais o nome de *Nagana*. O diagnóstico pode ser realizado por meio de técnicas de visualização parasitária, técnicas serológicas e técnicas moleculares. A terapêutica depende da fase da doença, da espécie do parasita e da espécie do hospedeiro, tendo em atenção a elevada toxicidade dos fármacos. Este facto aliado à inexistência de uma vacina eficaz surge como justificativa deste trabalho, o estudo de alternativas terapêuticas para a TA. Os objetivos deste trabalho foram a determinação da eficácia farmacológica do Benznidazol (BNZ), um antichagásico da família dos nitroimidazóis, bem como a determinação de uma dose infetante por via oral.

Para este trabalho foram utilizados 25 murganhos (*Mus musculus*) BALB-C e 37 murganhos CD-1, e parasitas da espécie *Trypanosoma brucei brucei* estirpe GVR35 distribuídos por três ensaios. Em dois ensaios de eficácia farmacológica os animais foram infetados por via IP com 500 parasitas por animal. Foi então administrado 10mg/kg BNZ SID PO, durante 5 dias no primeiro ensaio e 11 dias no segundo. Foram medidas parasitémias, pesos, e taxas de sobrevivência. Na segunda experiência foram medidos ainda títulos de IgG total, IgM total e subclasses de IgG anti-*T.b.brucei*, parâmetros hematológicos e concentração das citocinas IL-4, IFN- γ , NO e TGF- β 1.

Num terceiro ensaio pretendeu-se determinar a dose infetante por via oral, e consistiu na administração de 500 parasitas por animal, em suspensão de PBS-Glucose a um grupo de animais e a administração de 2×10^5 parasitas por animal a outro grupo.

A análise estatística foi realizada recorrendo aos testes *Wilcoxon rank-sum*, Correlação de Spearman, Análise de regressão linear, *Mantel-Cox log-rank test* e *Two-way ANOVA*.

Os resultados dos ensaios revelaram que não foi possível estabelecer infeção por via oral até uma dose de 2×10^5 parasitas/animal em veículo aquoso. Foi também possível determinar que o BNZ foi ineficaz nos protocolos estudados não controlando significativamente a parasitemia nem aumentando a sobrevivência. Relativamente a achados hematológicos o tratamento falhou em controlar a anemia, evidenciando-se uma tendência significativa para a macrocitose no grupo tratado. Os animais tratados apresentavam maiores títulos de subclasses de IgG, especialmente de IgG2a e IgG3, assim como uma maior libertação de IFN- γ , com significância confirmada por teste estatístico (*Two-way ANOVA*).

É possível concluir que embora o BNZ não seja um bom candidato para a terapêutica de TA, é um bom imunomodulador, estimulando uma resposta Th1. É também possível concluir que com uma dose inferior a 2×10^5 parasitas/animal em veículo aquoso não se desenvolve infeção por via oral.

Palavras-chave: Tripanossomose africana, *Trypanosoma brucei brucei*, Doença do Sono, ELISA, citocinas, infeção *per os*, *Mus musculus*, imunoestimulação Th1, Benznidazol.

TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI MURINE EXPERIMENTAL MURINE INFECTION AND STUDIES ON PHARMACOLOGICAL EFFECTIVENESS OF BENZNIDAZOLE

Abstract

African Trypanosomiasis (AT) is a parasitic disease caused by several species of *Trypanosoma*, transmitted by diptera of the *Glossina* genus, also known as the tsetse flies. This disease affects humans and animals, in humans takes the name of Sleeping Sickness, and in animals takes the name of *Nagana*. Diagnosis can be performed by parasite visualization, serology and molecular techniques. The treatment depends on the stage of the disease, the species of parasite and host species, knowing that all the drugs for AT are very toxic. With this knowledge, and due to the lack of an effective vaccine, the justification of this work is to find new therapeutic approaches for AT. The objectives of this study were to determine the pharmacological effectiveness of Benznidazole (BNZ), a nitroimidazole antichagasic drug, and ascertaining an infective dose for oral infection, that may be important in carnivores.

For this purpose, 25 (*Mus musculus*) BALB-C and 34 CD-1 mice, and *Trypanosoma brucei brucei* strain GVR35 parasites were used in this study divided by three experiments. In two of these experiments the pharmacological effectiveness was tested. The animals were treated with 10mg/kg of BNZ, once a day for 5 days for the first experiment and 11 days for the last. Parasitemias, weight gain and survival rates were measured. In the final experiment, anti-*T.b.brucei* antibody titers, hematological parameters and concentration of cytokines (IL-4, IFN- γ , NO and TGF- β 1) were also measured.

In the remaining experiment, which tested an infective dose *per os*, two groups of mice were exposed, using a feeding probe, to a dose of 500 parasites per animal and 200 000 (2×10^5) parasites per animal, suspended in Glucosed PBS, respectively.

Statistical analysis was performed using the Wilcoxon rank-sum test, Mantel-Cox log-rank test, Two-way ANOVA, Spearman's correlation and Linear regression analysis.

The results of these experiments revealed that it was not possible to establish oral infection with dose of up to 2×10^5 parasites per animal in an aqueous medium. It was also possible to determine that BNZ was ineffective in the protocols studied, due to a lack of control of parasitemia or a significant increase of host survival. As for hematological values the anemia was not controlled, showing a significant trend for macrocytosis in the treated group. Treated animals had higher titers of IgG subclasses, especially IgG2a and IgG3, as well as increased release of IFN- γ , with significance confirmed by statistical testing (Two-way ANOVA).

It was concluded that although BNZ is not a good candidate for therapy of AT, it is a good immunostimulator, enhancing a Th1 response. It is also possible to conclude that a dose 2×10^5 parasites per animal in an aqueous medium does not establish oral infection.

Keywords: African trypanosomiasis, *Trypanosoma brucei brucei*, Sleeping Sickness, ELISA, cytokines, *per os* infection, Th1 immunostimulation, *Mus musculus*, Benznidazole.

Índice

Parte I – Relatório das atividades de estágio.....	1
Parte II – Revisão bibliográfica.....	4
1. Tripanossomoses.....	5
1.1. Definição de Tripanossomose e enquadramento taxonómico.....	5
2. Tripanossomoses nos mamíferos.....	10
2.1. Tripanossomose Africana.....	10
2.1.1. Hospedeiros suscetíveis.....	11
2.1.2. Epidemiologia e Ciclo de Vida.....	12
2.1.3. Fisiopatologia, Imunopatogenia e Mecanismos de Virulência do Parasita.....	16
2.1.4. Sinais clínicos.....	21
2.1.5. Diagnóstico.....	27
2.1.6. Terapêutica e Profilaxia.....	32
2.2. Surra ou “Mal de cadeiras”.....	44
2.3. Tripanossomose venérea ou Daurina.....	46
2.4. Tripanossomose Americana ou Doença de Chagas.....	48
3. Tripanossomoses dos Animais Ectotérmicos.....	54
4. Tripanossomose em aves.....	55
5. O Murganho (<i>Mus musculus</i>) como modelo para Tripanossomose Africana.....	56
Parte III - Infecção experimental por <i>Trypanosoma brucei brucei</i> em modelo murino e estudo da eficácia farmacológica do Benznidazol.....	58
1. Enquadramento.....	58
2. Objetivos.....	58
3. Material e Métodos.....	59
3.1. Animais utilizados.....	59
3.2. Parasitas utilizados e via de infecção.....	60
3.3. Tratamento com BNZ.....	63
3.4. Avaliação da infecção.....	64
3.4.1. Pesagem, parasitemia e sobrevivência.....	64
3.4.2. Titulação de Anticorpos anti- <i>T. b. brucei</i>	67

3.4.3. Doseamento de Citocinas e NO.....	68
3.4.4. Hematologia	69
3.4.5. Análise estatística.....	70
4. Resultados.....	72
4.1. Ensaio de determinação da infecção com <i>T. b. brucei</i> por via oral	72
4.2. Ensaio de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por <i>T. b. brucei</i>	73
5. Discussão	83
5.1. Ensaio de determinação da infecção com <i>T.b.brucei</i> por via oral	83
5.2. Ensaio de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por <i>T. b. brucei</i> num protocolo terapêutico de 5 dias	84
5.3. Ensaio de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por <i>T. b. brucei</i> num protocolo terapêutico de 11 dias	86
6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	89
7. Bibliografia	90
Anexo A.....	97
Anexo B.....	97

Índice de Figuras

Figura 1 - Colheita de sangue de um murganho. (Imagem gentilmente cedida por Ana Filipa Teixeira – IHMT-UNL).....	2
Figura 2 - Tripomastigota e amastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i> . (Ampliação aproximada 1000x) (Fotografia do autor)	2
Figura 3 – Gametócito e trofozoíto de <i>Plasmodium</i> sp. em sangue humano. (Fotografia do autor).....	2
Figura 4 - Tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> em sangue de murganho. (Fotografia do autor)	2
Figura 5 - Caixa de transporte de animais de experimentação. (Fotografia do autor)	3
Figura 6 - Dissecção de murganho para colheita de fígado e baço. (Fotografia do autor).....	3
Figura 7 - Placa com resultado de técnica de quantificação de proteína de Bradford modificada. (Fotografia do autor)	3
Figura 8 - Resultado de titulação de subclasses de IgG anti- <i>Trypanosoma brucei brucei</i> . (Fotografia do autor)	3
Figura 9 - Tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i> num esfregaço sanguíneo corado por Giemsa. (Fotografia do autor)	5
Figura 10 - Amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> no interior de um macrófago. Esfregaço de medula óssea corado por Giemsa. (Fotografia do autor)	6
Figura 11 - Forma Promastigota de <i>Leishmania infantum</i> em meio de cultura corado por Giemsa. (Imagem gentilmente cedida por Dra. Lídia Gomes - Laboratório de Doenças Parasitárias FMV-UTL)	6
Figura 12 - Epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> . É notória a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (seta preta). (Adaptado de Ulisses de Carvalho, 2012)	7
Figura 13 - <i>Chirithidia luciliae</i> , notar o aspeto globoso e truncado próprio da forma Coanomastigota. (Fonte: Tree of Life Project Web, 2009)	7
Figura 14 - <i>Herpetomonas muscarum</i> , notar a forma alongada da Opistomastigota e a localização do cinetoplasto (Fonte: Ardelean, 2006)	7
Figura 15 - Sistemática do género <i>Trypanosoma</i> e respetivos subgéneros. (Stevens & Brisse, 2004 e Gonçalves, 2011)	8
Figura 16 - Árvore filogenética de Tripanossomatídeos baseada na análise de sequenciação genes que codificam SS rRNA e da enzima gliceraldeído-fosfato desidrogenase glicosómica (gGAPDH). (Hamilton, Gibson & Stevens, 2007)	9
Figura 17 - <i>Glossina</i> sp. procedendo à sua refeição de sangue. (Fonte: Enciclopaedia Britannica, 2013).....	10
Figura 18 - Área de distribuição das <i>Glossina</i> no continente africano, descrevendo o chamado "Cinturão das Tsé-tsé". (Adaptado de Michigan State University, 2013).....	10

Figura 19 - Mapa de casos reportados de THA por país em África por ano, note-se a divisão entre as subespécies de <i>Trypanosoma brucei</i> . (Adaptado de Simarro et al., 2008).....	14
Figura 20 - Diferenciação Slender/Stumpy num pico de parasitémia, e Stumpy/Forma Procíclica dentro do hospedeiro invertebrado. (Adaptado de Matthews, Ellis & Paterou, 2004)	15
Figura 21 - Tripomastigota de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> Slender em divisão (Seta) com forma Stumpy acima (Giemsa, ampliação 1000x). (Fotografia do autor).....	15
Figura 22 - Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> , uma representação típica da transmissão vetorial dos Tripanossomas veiculados por Glossinas (Adaptado de Center for Disease Control and Prevention, 2012)	16
Figura 23 - Representação esquemática do fluxo parasitário nos picos de parasitémia verificados na Tripanossomose Africana. (Adaptado de Journal of Undergraduate Studies, 2010)	17
Figura 24 – Tripanossomose bovina. (A) Cria de zebú morta por episódio agudo de Nagana. (B) Zebús adultos afetado por Nagana, com evidente emaciação (Adaptado de Agencia Internacional de Energia Atómica (IAEA), 2002).	23
Figura 25 - Cão com opacificação da córnea devido a uveíte por <i>T. b. brucei</i> . (Fonte: Greene & Matete, 2006)	25
Figura 26 - Representação da adequação de diferentes técnicas de diagnóstico às realidades de campo e de investigação. (Adaptado de Eisler et al.,2004; Bisser & Courtioux, 2012 e Bouteille & Buguet, 2012)	27
Figura 27 - Aspeto de um esfregaço usado para diagnóstico de hemoparasitas. (Imagem gentilmente cedida por Daniela Portugal – IHMT-UNL).....	28
Figura 28 - Aspeto de infeção por <i>T. brucei brucei</i> numa ampliação aproximada de 400x, corado com Giemsa. (Fotografia original do autor)	28
Figura 29 - Aspeto de infeção por <i>T. brucei brucei</i> numa ampliação aproximada de 1000x, corado com Giemsa. (Fotografia original do autor)	28
Figura 30 - Teste CATT, evidenciando aglutinação nos poços 1, 3 4 e 9. (Fonte: Earlham College, 2003)	30
Figura 31 - Placas de ELISA para deteção de IgG e IgM totais contra <i>T. brucei brucei</i> . (Fotografia original do autor).....	31
Figura 32 - Estrutura da Pentamidina. (Adaptado de Barret et al., 2007)	32
Figura 33 - Embalagem de Pentacarinat®. (Adaptado de Université Médicalle Virtuelle Francophone em http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/maladiesommeil/site/html/6.html	33
Figura 34 - Estrutura da molécula de Suramina (Adaptado de Barret et al., 2007).....	34
Figura 35 - Germanin®, a apresentação comercial da Suramina. (Adaptado de Université Médicalle Virtuelle Francophone, 2012).....	34

Figura 36 - Estrutura da molécula de diminazeno. (adaptado de Barrett et al., 2007)	35
Figura 37 - Berenil®, a apresentação comercial de Aceturato de Diminazeno. (Adaptado de Intervet Perú, 2009)	35
Figura 38 - Chlorhomidium®, a apresentação comercial do Cloreto de Homídeo. (Adaptado de Genevet, 2013)	36
Figura 39 - Estrutura dos sais de Homídeo. (Adaptado de Chemical book, 2008)	36
Figura 40 - Estrutura do Cloreto de Isometamídeo. (Adaptado de Chemical book, 2010)	37
Figura 41 - Veridium®, a apresentação comercial do Cloreto de Isometamídeo. (Adaptado de Ceva-Africa, 2010)	37
Figura 42 - Estrutura da molécula de Melarsoprol (Adaptado de Barrett et al., 2007).	38
Figura 43 - Arsobal®, a apresentação comercial do Melarsoprol (Adaptado de Earlham College, 2003).	38
Figura 44 - Estrutura da molécula de Melarsomina (Adaptado de Chemical book, 2008). ...	39
Figura 45 - Immiticide®, a apresentação comercial da Melarsomina (Adaptado de Drugs.com, 2010).	39
Figura 46 - Estrutura da molécula de Eflornitina. (Adaptado de Barrett et al., 2007)	39
Figura 47 - Ornidyl®, a apresentação comercial da Eflornitina. (Adaptado de Université Médicale Virtuelle Francophone, 2012).....	39
Figura 48 - Estrutura molecular do Nifurtimox. (Adaptado de Barrett et al., 2007).....	40
Figura 49 - Lampit®, a apresentação comercial do Nifurtimox. (Adaptado de The Matthew's Story, 2010).....	40
Figura 50 - Trypanosoma evansi em sangue de cão, que tinha viajado à Tailândia, corado por May-Grünwald Giemsa. Um pequeno cinetoplasto é evidente no polo posterior do parasita. (Adaptado de Defontis et al., 2012)	44
Figura 51 - Tripomastigotas de Trypanosoma evansi em sangue corado por Giemsa. Nestes parasitas não são evidenciados cinetoplastos. (Adaptado de El Sawalhy, 2004).....	44
Figura 52 - Ciclo de vida de T.evansi e dos isolados de T.vivax americanos. (Fonte: Silva et al., 2002).....	45
Figura 53 - Vectores de Trypanosoma evansi. Em cima, Stomoxys calcitrans. Em baixo Tabanus sp. (Adaptado de Texas A&M University, 2012)	45
Figura 54 - Dromedário emaciado com Surra. (Fonte: El Sawalhy, 2004).....	45
Figura 55 - Uveíte anterior num cão com Surra. (Fonte: Defontis et al., 2012).....	45
Figura 56 - CATT/T.evansi realizado no cão cujo esfregaço foi apresentado na Figura 50. Os poços 1 e 2 correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente, sendo que o poço 6 corresponde a uma aglutinação fraca em LCR, e o poço 8 a uma aglutinação forte em soro. (Fonte: Defontis et al., 2012).....	46
Figura 57 - Tripomastigotas de Trypanosoma equiperdum em sangue periférico corado por Giemsa. (Adaptado de Penn University, 2008)	47

Figura 58 - Vulva edemaciada com exsudado de uma égua infetada com <i>T. equiperdum</i> . (Fonte: Vulpiani, et al., 2013)	48
Figura 59 - Placas "silver dollar" patognomónicas da daurina. (Fonte: Vulpiani, et al., 2013)	48
Figura 60 - <i>Triatoma protracta</i> , um exemplo de um reduído vetor da Doença de Chagas. (Fonte: CDC, 2012)	48
Figura 61 - Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em sangue periférico de cão, note-se a forma semilunar e o grande cinetoplasto subterminal (Wright). (Adaptado de Barr, 2006).....	49
Figura 62 - Pseudoquisto de <i>T. cruzi</i> em músculo cardíaco de um cão (H&E). (Adaptado de Barr, 2006).....	49
Figura 63 - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> . (Adaptado de CDC, 2012)	49
Figura 64 - O sinal de Romaña ou Chagoma de inoculação, é um dos principais sinais precoces de infeção no ser humano (Fonte: CDC, 2012).	50
Figura 65 - Estrutura da molécula de Benznidazol. (Adaptado de ELEA, 2013).....	53
Figura 66 - Abarax, a apresentação comercial do Benznidazol. (Adaptado de ELEA, 2013)	53
Figura 67 - Diagrama da marcação de grupo utilizada, sendo que um grupo, o Grupo 1 tem a marcação na zona cervical, enquanto o Grupo 2 está marcado na região sagrada. Esta marcação aplica-se quando os animais de ambos os grupos se encontram alojados na mesma caixa.	59
Figura 68 - Diagrama das marcações individuais de murganhos. Estas marcações são aplicáveis quando cada grupo fica alojado em caixas diferentes. A escala A aplica-se a grupos de até 10 animais por grupo e a escala B a grupos de até 12 animais por grupo.	60
Figura 69 - Diagrama da técnica utilizada para obtenção de soro.....	60
Figura 70 - Injeção via IP num murganho. (Fonte: Sirois, 2005)	61
Figura 71 - Processamento dos parasitas nas infeções experimentais.	62
Figura 72 - Diagrama da técnica de purificação dos parasitas por cromatografia de permuta aniónica.	63
Figura 73 - Diagrama da técnica de Bradford modificada para quantificação de proteínas. .	63
Figura 74 - Diagrama do protocolo para a técnica de coloração segundo Giemsa.....	64
Figura 75 - Escala semiquantitativa adaptada da utilizada por Jones et al. (2011), para um esfregaço ampliado a 40 (Imagem do autor).....	66
Figura 76 - Diagrama do protocolo da técnica de Griess	69
Figura 77 - Diagrama do processamento de dados realizados nas experiências realizadas neste trabalho de mestrado.	70
Figura 78 - Título de IgG totais anti- <i>T. b. brucei</i> , expresso em absorvência ou densidade óptica a um comprimento de onda de 490nm (OD490nm), nos grupos infetados versus	

controles positivo (soro de animal infetado com 22 dias de infecção) e negativo (soro de animal saudável). As barras de erro representam o desvio-padrão.	72
Figura 79 - Peso vivo médio em grama, dos animais que integraram os ensaios de eficácia farmacológica do BNZ. O gráfico A é referente ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ de curta duração e o gráfico B é referente ao ensaio de longa duração. As barras de erro representam o desvio-padrão.	73
Figura 80 - Parasitemia média. O gráfico A é referente à população estudada no ensaio terapêutico do BNZ no protocolo de curta duração enquanto o gráfico B é referente aos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo terapêutico de longa duração. As barras de erro corresponde ao desvio-padrão.	75
Figura 81 - Curvas de sobrevivência. O gráfico A é relativo ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo de curta duração enquanto o gráfico B é referente ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo de longa duração.....	76
Figura 82 - Eritrograma dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ num protocolo terapêutico longo. Os gráficos A, B e C são relativos à contagem de Eritrócitos, Hematócrito e Hemoglobina, respetivamente. Os gráficos D, E e F são relativos aos índices eritrócitários, VCM, CHCM e RDW, respetivamente. As barras de erro representam o desvio-padrão e nos gráficos D e E consta a indicação dos pares em que as diferenças são estatisticamente significativas.	77
Figura 83 - Leucograma dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ num protocolo terapêutico longo. O gráfico A é referente ao número de leucócitos total, enquanto os gráficos B, C e D são referentes à contagem de cada linhagem celular (Granulócitos, Linfócitos e Monócitos/Blastos, respetivamente). As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.	78
Figura 84 - Contagem de plaquetas dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração. As barras de erro representam o desvio-padrão.	79
Figura 85 - Título expreso em absorvência, ou densidade ótica a 490nm (OD490nm) de IgG total (A) e IgM total (B) nos animais utilizados no ensaio de determinação da eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico longo. As barras de erro representam o desvio-padrão. A diluição usada foi 1:400.....	79
Figura 86 - Títulos expressos em absorvência, ou densidade ótica a 490nm (OD490nm) de IgG1 (A), IgG2a (B) e IgG3 (C) nos animais utilizados no ensaio. As barras de erro representam o desvio-padrão. Em todos os gráficos consta a indicação dos pares entre os quais as diferenças são estatisticamente significativas. A diluição utilizada foi 1:200.	80
Figura 87 - Rácio Th1:Th2 dos animais utilizados no ensaio. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.	80

Figura 88 - Quantificação de Citocinas por ELISA. Os gráficos A, C e E são referentes às concentrações de IL-4, TGF- β 1 e IFN- γ em pg/mL obtidas aplicando as absorvências a 450nm (B, D e F respectivamente) a uma curva de calibração. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão. As diluições utilizadas foram 1:50 para a IL-4 e 1:25 para as restantes citocinas. Nos gráficos E e F é apresentada ainda a indicação de quais pares são significativamente diferentes entre si. 81

Figura 89 - Quantificação de NO pela técnica de Griess. O gráfico A corresponde às absorvências medidas a 490nm (OD490nm) e o gráfico B corresponde à concentração em mM de NO sérico. As barras de erro representam o desvio-padrão. A diluição utilizada foi 1:10..... 82

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies de <i>Trypanosoma</i> causadoras de Tripanossomose Africana. (Adaptado de Taylor & Authié (2004))	11
Tabela 2 - Constituição dos complexos tripanolíticos do plasma humano. (Fonte: Baral, 2010)	12
Tabela 3 - Alterações fisiopatológicas decorrentes da infecção por Tripanossomas causadores de TA. (Adaptado de Taylor & Authié, 2004 e Kubata <i>et al.</i> , 2007)	18
Tabela 4 - Fatores intrínsecos do parasita que contribuem para a fisiopatologia da TA.....	20
Tabela 5 - Correlação do quadro clínico com as espécies de <i>Trypanosoma</i> e os hospedeiros. (Fonte: Taylor & Authié (2004) e Pentreath & Kennedy (2004)).....	22
Tabela 6 - Sinais clínicos típicos da THA (Adaptado de Teixeira, 2013)	26
Tabela 7 – Novos ensaios com princípios ativos conta a TA.....	41
Tabela 8 - Candidatos vacinais para profilaxia contra <i>Trypanosoma brucei</i> e respetivos resultados em proteção (Adaptado de Teixeira, 2013).....	43
Tabela 9 - Sinais clínicos dos animais com daurina. (Adaptado de OIE, 2009).....	47
Tabela 10 - Alterações clínicas decorrentes da tripanossomose americana por hospedeiro e fase da doença.	51
Tabela 11 - Distribuição dos animais pelos ensaios realizados no decorrer do trabalho experimental.	59
Tabela 12 - Resumo da distribuição dos parasitas utilizados por cada ensaio bem como a via de infecção utilizada.	61
Tabela 13 - Resumo das doses de BNZ, duração da terapêutica e critérios de início e fim dos protocolos terapêuticos em cada ensaio de eficácia farmacológica.....	64
Tabela 14 - Resumo das medições de peso, parasitemia e sobrevivência efetuadas nos três ensaios que compõem o trabalho experimental.....	65
Tabela 15 - Parâmetros hematológicos estudados neste trabalho e respetivos valores em animais saudáveis.	69
Tabela 16 - Resumo das variáveis avaliadas em cada ensaio e teste de análise estatística utilizado para cada medição.	71
Tabela 17 - Resultados da regressão linear (R^2) do peso para cálculo e do cálculo da correlação (R) entre o peso e tempo.....	74
Tabela 18 - Estatística sumária da sobrevivência dos animais em ambos os grupos.....	76

Lista de Abreviaturas

AcD – Aceturato de Diminazeno	MAECT - <i>Mini Anion Exchange Centrifugation Technique</i>
BBB – <i>Blood-brain barrier</i>	MMP - Metaloproteínas de Matriz
BID – <i>Bis in die</i> (Duas vezes ao dia)	MPI – Meses pós-infecção
BNZ – Benznidazol	MSP – Metaloproteinase de superfície
CATT – <i>Carbord agglutination test for Trypanosomiasis</i>	NFX – Nifurtimox
CD - <i>Cluster of differentiation</i>	NO – Óxido Nítrico
cDNA – DNA complementar	OD – Densidade ótica
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média	PBS – <i>Fosfate-buffer saline</i>
CID – Coagulação Intravascular Disseminada	PCR – <i>Polymerase chain reaction</i>
DNA – Ácido desoxirribonucleico	PGD₂ – Prostaglandina D2
DPI – Dias pós-infecção	PGE₂ – Prostaglandina E2
ECF – <i>East Coast Fever</i> ou Febre da Costa Oriental	PGF_{2α} – Prostaglandina F2 alfa
ELISA – <i>Enzyme-linked Immunosorbant assay</i>	PLC – Fosfolipase C
ELISA/Ab – ELISA para detecção de anticorpos	RBC – Eritrócitos
ELISA/Ag – ELISA para detecção de antígenos	RDW – <i>Red blood cell distribution width</i>
GPI – Glicosilfosfatidilinositol	RNA – Ácido Ribonucleico
HDL – Lipoproteína de elevada densidade	rpm – Rotações por minuto
Ht – Hematócrito	SC – Via subcutânea
Hb - Hemoglobina	SID – <i>Semel in die</i> (Uma vez ao dia)
VCM – Volume corpuscular médio	SPI – Semanas pós-infecção
IFN-γ – Interferão gama	SRA – <i>Serum-Resistance associated glycoproteins</i>
IgG – Imunoglobulina G	T CD4+; CD45+; CD8+; CD8γδ+ - <i>Cluster of differentiation 4, 45, 8 or 8 gamma-delta positive T lymphocytes.</i>
IgM – Imunoglobulina M	TA – Tripanossomose Africana
IL-4 (8,10,12) – Interleucina 4 (ou 8, 10 ou 12)	TAA – Tripanossomose Animal Africana
IM – Via intramuscular	TGF-β1 – <i>Transforming growth factor beta one</i>
IP – Via intraperitoneal	THA – Tripanossomose Humana Africana
IV – Via intravenosa	TID – <i>Tris in die</i> (Três vezes ao dia)
kDNA – DNA do cinetoplasto	TLF – <i>Serum trypanolytic factor</i>
	TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
	VO – Via oral
	VSG – Glicoproteína Variável de Superfície

Parte I – Relatório de atividades de estágio

O trabalho seguidamente apresentado foi realizado no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, na Unidade de Clínica das Doenças Tropicais (UCDT) inserida no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) que compreendeu os meses de Outubro a Fevereiro, Maio e Junho, e totalizou cerca de 1130 horas.

O estágio realizou-se sob orientação do Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva, e foram desenvolvidas várias atividades dentro do grupo de investigação seguidamente mencionadas.

Houve a oportunidade de acompanhar os trabalhos experimentais dos colegas Ana Filipa Teixeira, Ruth Teixeira e Jailson Brito Querido, nas quais foi possível a realização de PCR, eletroforese de DNA, eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida, zimografia, purificação de ácidos nucleicos e proteínas, ELISA de deteção de anticorpos, *Western Blott* e administração de proteína recombinante via Subcutânea (SC) e plasmídeos vacinais via intramuscular (IM) e intraperitoneal (IP) em murganho (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Colheita de sangue de um murganho. (Imagem gentilmente cedida por Ana Filipa Teixeira – IHMT-UNL)

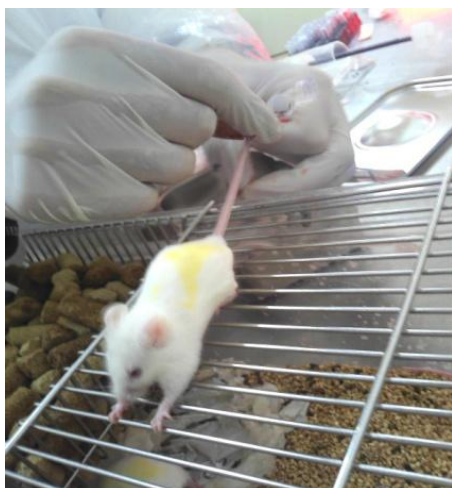
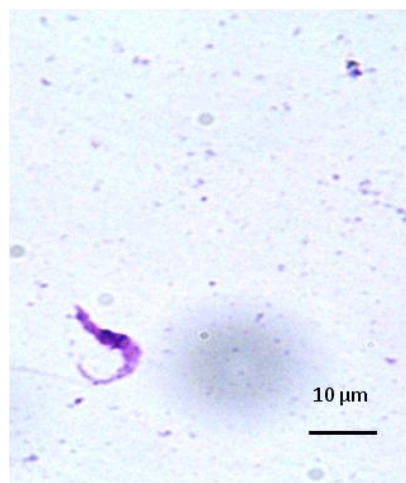


Figura 2 - Tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma rangeli*. (Ampliação aproximada 1000x) (Fotografia do autor)



Houve ainda oportunidade de acompanhar brevemente os trabalhos do Laboratório de Análises Clínicas da UCDT, com a aprendizagem de técnicas de visualização de parasitas, como *Plasmodium* e *Schistosoma* (Figuras 3 e 4), e a realização de técnicas serológicas para *Plasmodium* e *Salmonella*.

Figura 3 – Gametócito e trofozoíto de *Plasmodium* sp. em sangue humano. (Fotografia do autor)

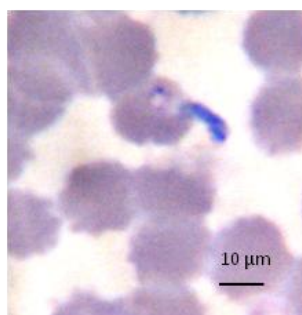
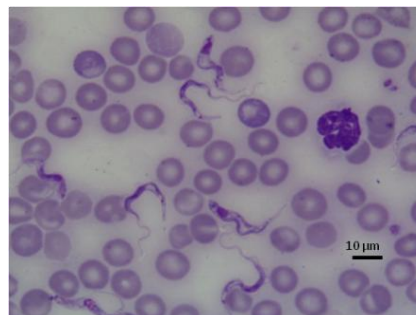


Figura 4 - Tripomastigotas de *Trypanosoma brucei brucei* em sangue de murganho. (Fotografia do autor)



No âmbito do trabalho de tese a atividade experimental compreendeu duas áreas do IHMT, o laboratório da UC DT e o Biotério. Nesta última foi realizada toda a componente de experimentação animal (infecções, colheitas e sacrifícios) (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Caixa de transporte de animais de experimentação. (Fotografia do autor)



Figura 6 - Dissecção de murgancho para colheita de fígado e baço. (Fotografia do autor)



No decurso do trabalho citado foi utilizada a técnica de coloração de esfregaço por método de Giemsa, obtenção de soro, ELISA (Figura 8) e ELISA *Sandwich* bem como as técnicas de Bradford modificada (Figura 7), Griess, cromatografia de permuta aniônica e síntese de cDNA.

Figura 7 - Placa com resultado de técnica de quantificação de proteína de Bradford modificada. (Fotografia do autor)



Figura 8 - Resultado de titulação de subclasses de IgG anti-*Trypanosoma brucei brucei*. (Fotografia do autor)



Ainda no decurso do trabalho realizado foram apresentados seminários do grupo de investigação, para discussão dos resultados obtidos. Foram também realizadas duas apresentações orais, uma nas sessões comemorativas do II Aniversário do FAUNA, núcleo da AEFMV, e outra no 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, organizado pelo IHMT-UNL. Do trabalho realizado foram ainda elaboradas duas comunicações em *poster* no congresso iMed5.0 organizado pela AEFMV-NOVA e no XI Congresso Mundial de Inflamação, organizado pela SBI (Anexo A).

Parte II – Revisão bibliográfica

1. Tripanossomoses

1.1. Definição de Tripanossomose e enquadramento taxonómico

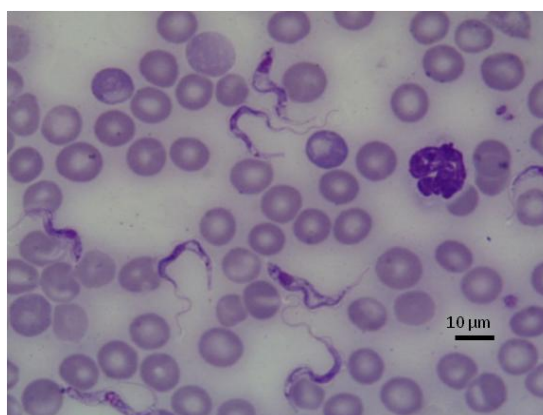
Designa-se de tripanossomose qualquer doença resultante da infeção por um protozoário do género *Trypanosoma* (Figura 9). Estas doenças manifestam-se maioritariamente nos mamíferos.

Verificam-se ainda diversas espécies que parasitam aves (*T. avium*), répteis (*T. varani*, *T. cheloni*), anfíbios (*T. rotatorium*) e peixes (*T. triglæ*, *T. granulosum*) sendo a infeção por estas espécies considerada, na maioria dos casos apatogénica (Stevens & Brisse, 2004; Telford, 2009).

Estes protozoários pertencem ao filo Sarcomastigophora, que compreende os sub-filos Mastigophora (flagelados), Sarcodina (amebas) e Opalinata (opalinas). Estão, como flagelados integrados no sub-filo Mastigophora, pertencendo à ordem Kinetoplastida (Hickman, Roberts & Larson, 2001).

Sendo os parasitas do género *Trypanosoma* pertencentes à ordem Kinetoplastida, são protozoários que possuem uma mitocôndria modificada, repleta de DNA, designada por cinetoplasto. Este cinetoplasto intervém ativamente na locomoção destes seres, sendo o ponto de inserção do flagelo (Bowman, 2009). Na zona de inserção do flagelo existe também uma região, denominada bolsa flagelar, que contém uma grande concentração de proteínas transportadoras, bem como vesículas de endo e exocitose, sendo assim encarada como a zona de trocas com o meio exterior e de integração de componentes membranares recém-sintetizados (Stevens & Brisse, 2004).

Figura 9 - Tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* num esfregaço sanguíneo corado por Giemsa. (Fotografia do autor)



A posição relativa do cinetoplasto face ao núcleo difere consoante as diferentes formas que os parasitas apresentam, bem como a presença de flagelo. Os Tripanossomatídeos, família integrada na ordem Kinetoplastida, que também inclui os géneros *Leishmania*, *Herpetomonas*, *Chrithidia*, *Blastochrithidia* e *Leptomonas*, entre outros podem assim apresentar seis formas diferenciadas pelas características supracitadas (Bowman, 2009):

- A forma Amastigota, sem flagelo visível ao microscópio ótico, intracelular e comum no hospedeiro vertebrado no género *Leishmania*, no caso das espécies *Trypanosoma cruzi*, *T.rangeli* e de outros tripanossomas apatogénicos de répteis (Figura 10);
- A forma Promastigota, flagelada, com o cinetoplasto em posição anterior ao núcleo do parasita, presente no hospedeiro invertebrado no género *Leishmania* e *Herpetomonas* (Figura 11);
- A forma Epimastigota, também flagelada, com o cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo do parasita, presente no intestino médio dos vetores invertebrados do género *Trypanosoma* (Figura 12);
- A forma Tripomastigota, em que o cinetoplasto se insere no polo posterior da célula, onde se insere um flagelo que descreve com a membrana celular do parasita uma estrutura designada membrana ondulante. Esta é a forma livre circulante dos parasitas do género *Trypanosoma* (Figura 9);
- Existem ainda as formas Coanomastigota e Opistomastigota, intermédias entre Promastigota e Epimastigota e Epimastigota e Tripomastigota, respetivamente. A forma Coanomastigota é globosa, truncada anteriormente e presente no género *Chrithidia*. A forma Opistomastigota, de perfil afilado e cinetoplasto subterminal está presente no género *Herpetomonas* (Figura 13 e Figura 14) (Telford, 2009).

Figura 10 - Amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de um macrófago. Esfregaço de medula óssea corado por Giemsa. (Fotografia do autor)

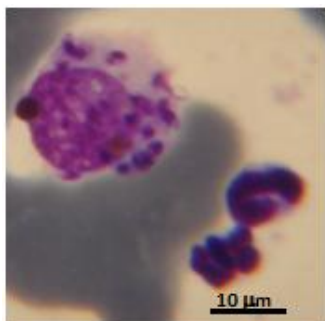


Figura 11 - Forma Promastigota de *Leishmania infantum* em meio de cultura corado por Giemsa. (Imagem gentilmente cedida por Dra. Lídia Gomes - Laboratório de Doenças Parasitárias FMV-UTL)

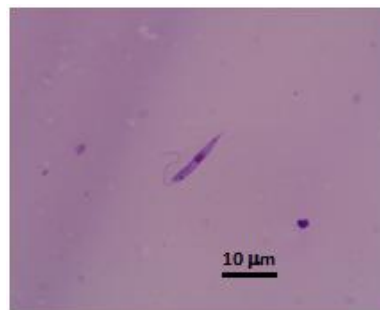


Figura 12 - Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. É notória a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (seta preta). (Adaptado de Ulisses de Carvalho, 2012)

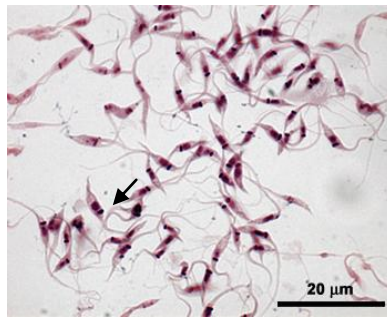
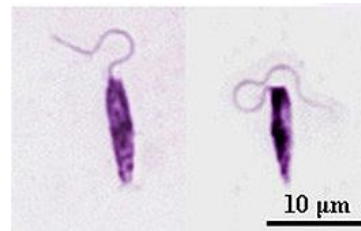


Figura 13 - *Chrithidia luciliae*, notar o aspeto globoso e truncado próprio da forma Coanomastigota. (Fonte: Tree of Life Project Web, 2009)



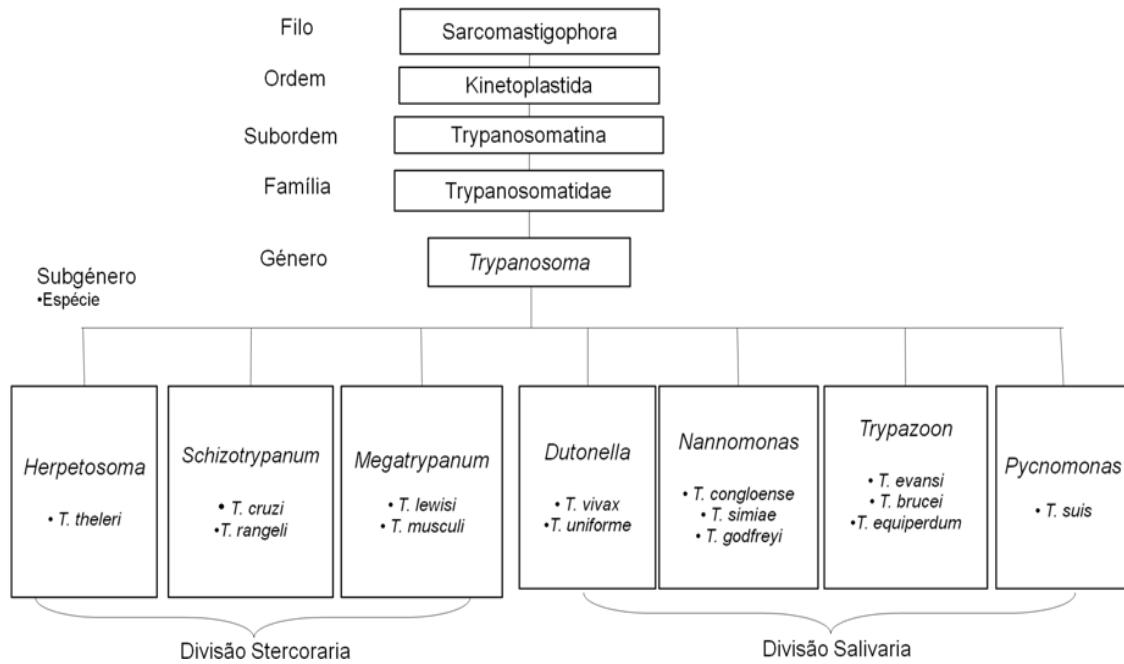
Figura 14 - *Herpetomonas muscarum*, notar a forma alongada da Opisthomastigota e a localização do cinetoplasto (Fonte: Ardelean, 2006)



O género *Trypanosoma* sofreu várias divisões. Graças a dados morfológicos e epidemiológicos este género foi dividido em duas secções: Salivaria (parasitas transmitidos pela regurgitação de saliva do vector) e Stercoraria (parasitas transmitidos pelas fezes do hospedeiro intermediário). Dentro das divisões Stercoraria e Salivaria existem ainda sete subgéneros, propostos por Hoare (1972): *Megatrypanum*, *Schizotrypanum* e *Herpetosoma*, na divisão Stercoraria, *Nannomonas*, *Pycnomonas*, *Dutonella* e *Trypazoon* na divisão Salivaria (Figura 15).

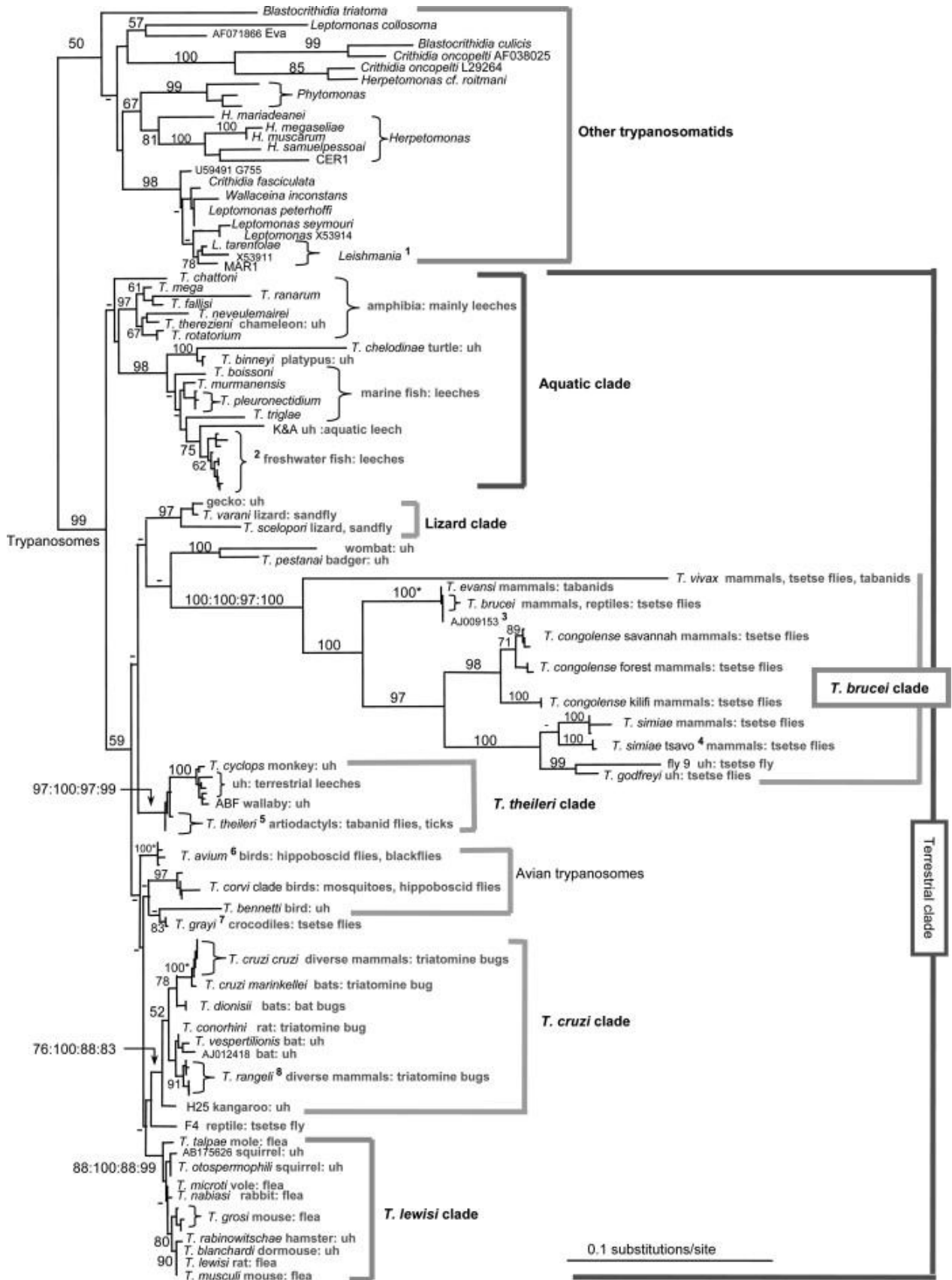
Com o advento do uso de técnicas de biologia molecular para caracterização filogenética, foram ainda criados *clades*, como o *clade* aquático (parasitas que pertencem a peixes, anfíbios e anelídeos, sendo estes últimos os principais animais implicados no papel de vetor), ou o *clade* *Trypanosoma brucei*. Estes *clades* consistem em agrupamentos de parasitas do mesmo género, geneticamente menos distanciados entre si que os restantes do género, e com características similares no que respeita aos respetivos hospedeiros (Figura 16) (Stevens & Brisse, 2004).

Figura 15 - Sistemática do género *Trypanosoma* e respetivos subgéneros. (Stevens & Brisse, 2004 e Gonçalves, 2011)



Assim, os parasitas do género *Trypanosoma* são ubíquos como parasitas de animais do filo Chordata, sendo transmitido por vetores invertebrados na maioria dos casos, como também enunciado pela Figura 16.

Figura 16 - Árvore filogenética de Tripanossomatídeos baseada na análise de sequenciação genes que codificam SS rRNA e da enzima gliceraldeído-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH). (Hamilton, Gibson & Stevens, 2007)



2. Tripanossomoses nos mamíferos

Existem diversas espécies de *Trypanosoma* cuja infecção pode causar doença no hospedeiro mamífero (Bowman, 2009). Diferentes espécies podem provocar diferentes quadros clínicos com denominações diferentes. Os quadros clínicos denominam-se Tripanossomose Africana, também conhecida por Doença do Sono ou *Nagana*, Surra ou Mal-de-Cadeiras, Daurina e Tripanossomose Americana ou Doença de Chagas.

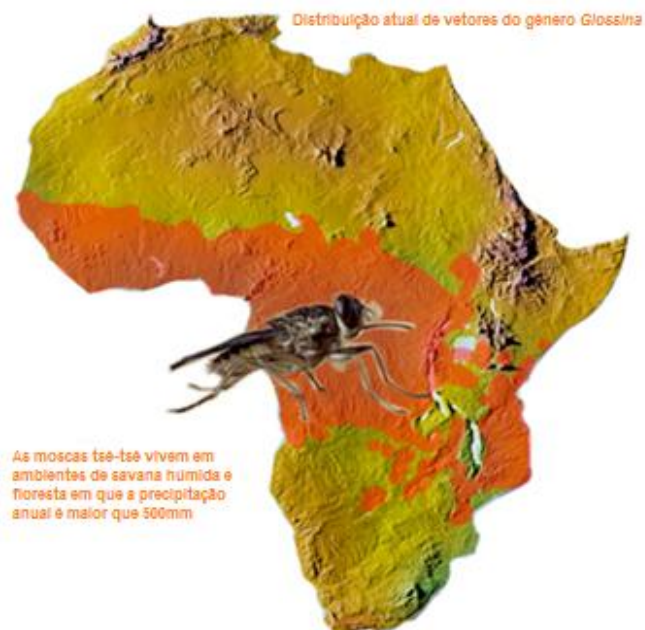
2.1. Tripanossomose Africana

A Tripanossomose Africana (TA) é a doença causada pela infecção do hospedeiro mamífero por diversas espécies de *Trypanosoma* da divisão salivaria transmitidos pelas moscas Tsé-tsé (*Glossina* spp.) (Figura 16). Estas espécies estão confinadas ao continente africano (Figura 17) com a exceção de *Trypanosoma vivax* que é transmitido de forma mecânica no continente americano (Silva, Seidl, Ramirez & Dávila, 2002; Taylor & Authié, 2004).

Figura 17 - *Glossina* sp. procedendo à sua refeição de sangue. (Fonte: Enciclopaedia Britannica, 2013)



Figura 18 - Área de distribuição das *Glossina* no continente africano, descrevendo o chamado "Cinturão das Tsé-tsé". (Adaptado de Michigan State University, 2013)



2.1.1. Hospedeiros suscetíveis

Existindo Tripanossomose Humana Africana (THA) e Tripanossomose Animal Africana (TAA) estas são designadas por Doença do Sono e *Nagana*, respetivamente (Taylor & Authié, 2004).

Na Tabela 1 estão resumidas as espécies de *Trypanosoma* causadoras de THA e TAA bem como os seus hospedeiros suscetíveis.

Tabela 1 - Espécies de *Trypanosoma* causadoras de Tripanossomose Africana. (Adaptado de Taylor & Authié (2004))

Subgénero	Espécie	Hospedeiros Suscetíveis
<i>Trypanozoon</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Ruminantes, equinos, asininos, camelídeos, suínos, cães, gatos e roedores
	<i>T. brucei rhodesiense</i>	Ruminantes, humanos (THA Aguda), roedores
	<i>T. brucei gambiense</i>	Humanos (THA crónica), roedores
<i>Nannomonas</i>	<i>Trypanosoma congolense</i>	Ruminantes, equinos, asininos, camelídeos, suínos, cães e roedores
	<i>Trypanosoma simiae</i>	Pequenos ruminantes, suínos, cães
<i>Pycnomonas</i>	<i>Trypanosoma suis</i>	Suínos
<i>Duttonella</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>	Ruminantes, equinos, asininos, camelídeos e cães

A capacidade infecciosa destes parasitas está dependente de fatores tripanolíticos existentes no plasma dos hospedeiros e da capacidade de resistência do parasita a estes. Os fatores tripanolíticos séricos estão apenas descritos em humanos e símios, não tendo sido encontradas referências a estes em animais domésticos (Pentreath & Kennedy, 2004; Baral, 2010).

No soro humano normal estão descritos dois complexos tripanolíticos TLF1 e TLF2, lipoproteína de elevada densidade (HDL) e imunocomplexo pobre em lípidos, respetivamente que mediam a lise independente do sistema imunitário de tripanossomas (Baral, 2010). A composição destes complexos está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Constituição dos complexos tripanolíticos do plasma humano. (Fonte: Baral, 2010)

Nome e tamanho do complexo tripanolítico	Constituição
TLF1 (500kDa)	<ul style="list-style-type: none"> • Apolipoproteína A-1 (ApoA-1) • <i>Haptoglobin-related protein</i> (Hpr) • Apolipoproteína L-1(ApoL-1) • <i>Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide</i> (hCAP18) • Glicosilfosfatidil inositol Fosfolipase D (GPI-PLD) • ApoA-2 • Paraoxanase
TLF2 (1000kDa)	<ul style="list-style-type: none"> • ApoA-1 • Hpr • ApoL-1 • hCAP18 • GPI-PLD • IgM

A ação tripanolítica dos TLF está principalmente atribuída à Apolipoproteína L-1 (ApoL1), onde foram descritos um domínio formador de poros, um domínio de aderência membranar, e um domínio de interação com as *Serum resistance-associated glycoproteins* (SRA), um tipo de glicoproteína variável de superfície (VSG, do inglês *Variable surface glycoproteins*) codificadas por um gene específico, o gene SRA, que conferem resistência aos TLR a *T. brucei rhodesiense*.

O efeito desta apolipoproteína é sinérgico com os restantes componentes do TLF, nomeadamente com a *Haptoglobin-related protein* (Hpr).

A remoção da cadeia C-terminal da ApoL1, equivalente ao domínio que manifesta interação com as SRA pode lisar inclusive *T. brucei rhodesiense*, resistente a esta proteína, tornando a ApoL1 deletada uma boa arma terapêutica de origem humana (Taylor & Authié, 2004; Nolan, Garcia-Salcedo, Vanhamme & Pays, 2004; Baral, 2010).

A resistência de *Trypanosoma brucei gambiense* aos fatores tripanolíticos do soro humano deve-se a mutações que alteram a conformação do recetor HbHp, diminuindo assim a interiorização de TLF pelo parasita. (Gadelha, Holden, Allison & Field, 2011)

2.1.2. Epidemiologia e Ciclo de Vida

A principal via de transmissão destes agentes é a via vetorial, estando também descritas na literatura, embora com menor relevo e apenas para *T. brucei gambiense* e *T. brucei brucei*, as infeções por via transfusional, venérea, congénita e oral. (Moloo, Losos & Kutuza, 1973; Bowman, Hendrix, Lindsay & Barr, 2001; Rocha, Martins, Gama, Brandão & Atouguia, 2004; Oba, Gahtse, Bowassaa, Nika & Obengui, 2011)

Estes agentes, sendo quase exclusivamente transmitidos pela via vetorial, estão confinados, salvo a exceção de *T. vivax* acima mencionada ao bioma das moscas Tsé-tsé, também

denominado o “cinturão das Tsé-tsé”. Este cinturão descreve a área da porção subsariana de África que vai da costa ocidental à costa oriental descrito na Figura 18

Estudos indicam que entre os anos 2000 e 2009 foram reportados cerca de 42000 casos de THA e cerca de 70 milhões de pessoas se encontram em risco de contraírem a doença. Estima-se ainda que a forma crónica da doença, provocada por *T. brucei gambiense*, ocorre em 90% dos casos, sendo que a forma aguda da THA, causada por *T. brucei rhodesiense*, é responsável por 10% dos casos. Esta última subespécie é considerada zoonótica.

Outros estudos estimam que 50 milhões de cabeças de gado bovino estão em risco de contraírem *Nagana* todos os anos assim como 70 milhões de pequenos ruminantes se encontram também em risco, nas regiões endémicas (Holmes, Eisler & Geerts, 2004; Welburn, Fèvre, Coleman & Maudlin, 2004; Simarro, Jannin & Cattand, 2008; Coustou, Plazolles, Guengan & Baltz, 2012; Simarro, *et al.*, 2012).

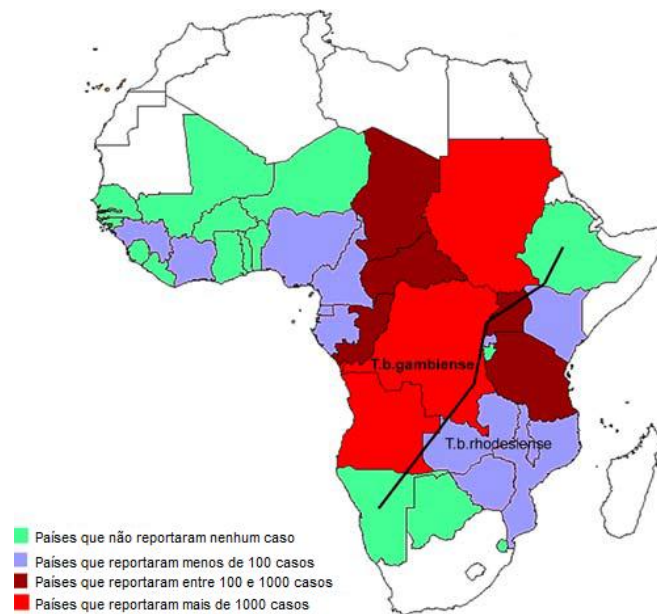
Esta doença foi considerada como a terceira doença parasitária mais frequente do continente africano, seguida da Malária e da Esquistossomose (Welburn *et al.*, 2004).

A capacidade zoonótica de *T. brucei rhodesiense* é problemática por duas razões, a infeção nos reservatórios é pouco patogénica, podendo tornar-se inaparente, e um número elevado de passagens por animais aumenta o risco de *T. brucei brucei* expressar o gene SRA, transformando-o na subespécie Rodesiense.

A existência de hospedeiros reservatórios para *T. brucei gambiense* é controversa, existindo relatos de infeção inaparente em ovinos e suínos. Os autores consideram, contudo que a doença causada por este parasita não pode ser considerada zoonótica (Welburn *et al.*, 2004; Njiokou, *et al.*, 2010; Aksoy, 2011).

Epidemiologicamente no caso da THA, pode-se distinguir uma divisão geográfica onde se consegue observar uma tendência para a presença da forma crónica da THA na costa ocidental de África e da forma aguda apenas na costa oriental (Figura 19). A razão aparente para esta divisão é a especificidade das duas subespécies de *T. brucei* para espécies de glossina diferentes, sendo que a subespécie Gambiense se encontra mais adaptada às glossinas higrófilas, como é o caso de *Glossina palpalis*, enquanto a Rodesiense apresenta melhor adaptação a glossinas xerófilas e mesófilas, nativas do ecossistema de savana, como é o caso da espécie *Glossina morsitans morsitans* (Simarro *et al.*, 2008; Aksoy, 2011).

Figura 19 - Mapa de casos reportados de THA por país em África por ano, note-se a divisão entre as subespécies de *Trypanosoma brucei*. (Adaptado de Simarro *et al.*, 2008)



A infecção dá-se na maioria dos casos durante a refeição de sangue do vetor, onde o parasita migra das glândulas salivares do artrópode até à derme por regurgitação deste. Nesta fase o parasita multiplica-se ativamente, induzindo uma resposta inflamatória tecidual. Essa resposta vai-se repercutir na formação de uma lesão nodular, o cancro de inoculação, que corresponde à porta de entrada do parasita e onde histologicamente se evidencia edema, infiltração linfocitária, mastocitária, eosinofílica e macrófagica e onde também se podem evidenciar parasitas em divisão. Seguindo-se a esta divisão os parasitas circulam pelo sistema linfático até aos linfonodos regionais onde desencadeiam uma resposta proliferativa por parte dos linfócitos B, e um aumento da migração de células das linhagens T CD4+ e CD8+.

Daí os parasitas migram através do ducto torácico até à circulação sanguínea, desencadeando o início da parasitemia. Esta é detetável entre 5 a 21 dias pós-infecção dependendo da espécie animal afetada e da via de infecção. (Taylor & Authié, 2004)

No sangue, os parasitas tendem a diferenciar-se em formas longas e replicativas (*slender*), responsáveis pelo aumento da parasitemia, e curtas e infetantes para o vetor (*stumpy*) (Figura 21), diferenciadas para infetar o hospedeiro invertebrado. A diferenciação dos parasitas dá-se em duas vertentes: A alteração das vias metabólicas, adaptando o metabolismo ao microambiente do intestino médio do vetor, tornando a forma *stumpy* não replicativa, e alteração do revestimento proteico. Esta alteração ocorre já no invertebrado, determinando a transição de tripomastigota sanguíneo *stumpy* para tripomastigota procíclico, e consiste na substituição do revestimento glicoproteico das glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) (Figura 20), mediado por duas enzimas, a Fosfolipase C (PLC)

e a Metaloproteína de superfície (MSP), que clivam as regiões glicosilfosfatidil inositol e proteica respectivamente, das VSG permitindo a sua libertação. A esta substituição sucede-se a substituição deste revestimento glicoproteico por outro, composto por glicoproteínas denominadas prociclinas (Baral, 2010).

Figura 20 - Diferenciação Slender/Stumpy num pico de parasitemia, e Stumpy/Forma Procíclica dentro do hospedeiro invertebrado. (Adaptado de Matthews, Ellis & Paterou, 2004)

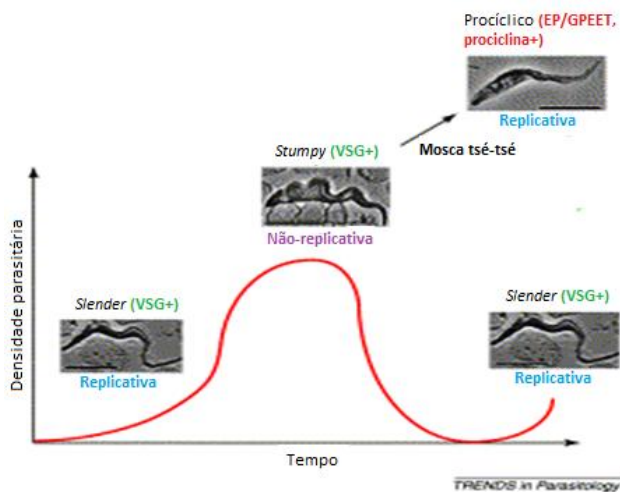
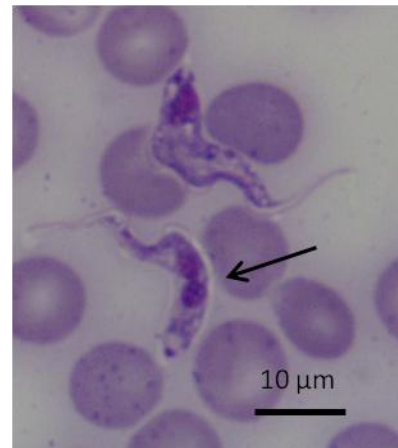
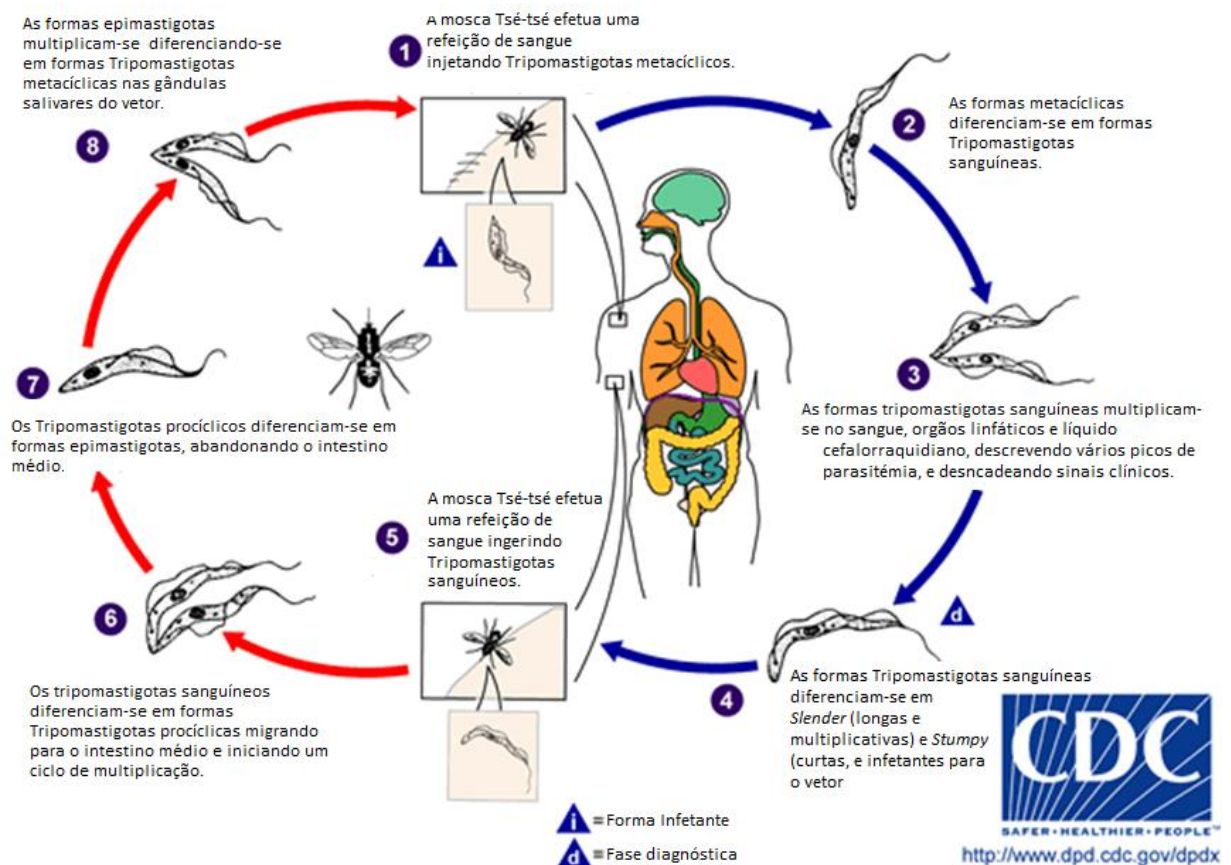


Figura 21 - Tripomastigota de *Trypanosoma brucei brucei* Slender em divisão (Seta) com forma Stumpy acima (Giemsa, ampliação 1000x). (Fotografia do autor)



Uma vez no intestino médio do hospedeiro invertebrado as formas procíclicas diferenciam-se em epimastigotas, migrando pela endolinfa do artópode até se alojarem nas glândulas salivares. Aí diferenciam-se novamente em tripomastigotas metacíclicos, as formas infetantes para o hospedeiro vertebrado (Figura 22) (Taylor & Authié, 2004).

Figura 22 - Ciclo de vida de *T. brucei*, uma representação típica da transmissão vetorial dos Tripanossomas veiculados por Glossinas (Adaptado de Center for Disease Control and Prevention, 2012)



Dado o contexto deste trabalho, refira-se que a transmissão por via oral foi descrita por Moolo e colaboradores em 1973, e Laveran e Mesnil em 1912, que alimentando cães com carne de cabra infetada, e gatos com murganhos e cobaios infetados, respetivamente, estes ficavam infetados. A principal particularidade desta via de infeção era a deteção tardia de parasitemia, até 60 dias após a ingestão dos tecidos contaminados. Embora esta via de transmissão não seja bem descrita, pode ser importante nas regiões endémicas, em animais carnívoros e omnívoros, silvestres e errantes (Bowman *et al.*, 2001).

2.1.3. Fisiopatologia, Imunopatogenia e Mecanismos de Virulência do Parasita

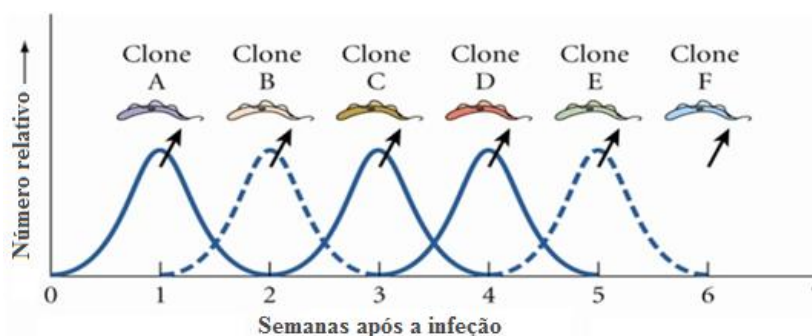
Estes parasitas provocam uma doença com duas fases distintas, uma fase aguda inicial ou hemolinfática, de sintomatologia inespecífica, com parasitemia oscilante, podendo ser bastante exuberante, no caso das infeções por *T. brucei rhodesiense* em humanos ou certos isolados de *T. vivax* da costa oriental africana em bovinos (que podem dar a origem a quadro hemorrágico por coagulação intravascular disseminada – CID), ou virtualmente indetetáveis como são exemplo as infeções por *T. brucei gambiense* em humanos ou *T. brucei brucei* em raças bovinas nativas do continente africano. (Taylor & Authié, 2004)

Verifica-se também uma fase crónica, ou nervosa, onde as espécies de *Trypanosoma*, especialmente aquelas com capacidade de abandonarem o compartimento intravascular, como é o caso de *T. brucei* e *T. vivax* que invadem o sistema nervoso central (SNC) causando direta ou indiretamente danos, e conseqüentemente sinais clínicos mais específicos de doença neurológica (Taylor & Authié, 2004).

A replicação das formas tripomastigotas no sangue vai gerar um pico de parasitemia, geralmente acompanhado de febre e prostração. A este pico sucede-se um pico no título de imunoglobulinas, uma a duas semanas após, principalmente composto por IgM (Taylor & Authié, 2004).

Após o controlo do primeiro pico de parasitemia pelo sistema imunitário, principalmente devido à ação de anticorpos que participam também da ativação do sistema complemento (SC), os parasitas sofrem um fenómeno de variação antigénica, onde a variante antigénica dominante é destruída pelo sistema imunitário e uma variante com VSG de antigenicidade diferente é selecionada, replicando-se, e seguidamente tornando-se responsável por um pico de parasitemia como a variante antigénica dominante (Figura 23). Esta variação é mediada tanto pela ativação da expressão de pseudogenes teloméricos, durante a replicação das formas sanguíneas que codificam varias sequências de VSG, como pelo mecanismo de recombinação génica por *crossing-over* das regiões teloméricas, durante a mitose, na replicação ativa das formas *Slender* (Baral, 2010).

Figura 23 - Representação esquemática do fluxo parasitário nos picos de parasitemia verificados na Tripanossomose Africana. (Adaptado de Journal of Undergraduate Studies, 2010)



Após o início da parasitemia sucedem-se as alterações sistémicas durante o desenvolvimento da doença, como anemia, hepatomegália e esplenomegália, leucopénia, trombocitopénia, entre outras, exploradas em detalhe seguidamente (Pentreath & Kennedy, 2004; Taylor & Authié, 2004)

Tabela 3 - Alterações fisiopatológicas decorrentes da infecção por *Trypanosomas* causadores de TA. (Adaptado de Taylor & Authié, 2004 e Kubata *et al.*, 2007)

Alteração Fisiopatológica	Causas
Anemia	<ul style="list-style-type: none"> Fagocitose por adsorção de epítomos do parasita ou dessialização membrana celular Lise das hemácias por dano da membrana provocado por fosfolipases do parasita, ou mediada por auto-anticorpos Diseritropoiese (alteração da eritropoiese)
Leucopenia com:	<ul style="list-style-type: none"> Fagocitose por macrófagos das linhagens precursoras dos granulócitos e eritrócitos na medula óssea
<ul style="list-style-type: none"> Diminuição da contagem de linfócitos e granulócitos na fase aguda Linfocitose na fase crônica, com diminuição da contagem das restantes linhagens 	<ul style="list-style-type: none"> Supressão da replicação de células por desregulação da resposta imunitária
Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none"> Destruição das plaquetas por fosfolipases Destruição imunomediada Sequestro na ocorrência de CID
Diminuição dos fatores do sistema complemento	<ul style="list-style-type: none"> Interação das VSG com o fator C3b, com a inibição das C3 convertases, restringe a ativação do sistema do complemento As mesmas VSG ativam o sistema do complemento pela via alternativa esgotando fatores A perda de fatores precoce predispõe a: <ul style="list-style-type: none"> Diminuição da lise mediada pelo sistema do complemento, ativado pela via clássica Diminuição da solubilização dos imunocomplexos, possibilitando a deposição destes nos tecidos e inflamação adicional Diminuição da seleção de clones de linfócitos B, com especificidade antigénica, prejudicando a competência da resposta humoral
Esplenomegália	<ul style="list-style-type: none"> Aumento da polpa branca por infiltração dos septos conjuntivos por macrófagos e linfócitos, e aumento dos núcleos germinativos Aumento da polpa vermelha por aumento da população do sistema retículo-endotelial (SRE) na zona dos sinusoides, aumentando a fagocitose de parasitas e leucócitos bem como a hemocaterése
Hepatomegália	<ul style="list-style-type: none"> Congestão que em anemias graves pode levar a discreta necrose centrolobular Hiperplasia das células de Kupffer com aumento da fagocitose e hemocaterése
Desequilíbrios neuro-hormonais e reprodutivos	<ul style="list-style-type: none"> A inflamação e necrose multifocal do hipotálamo, com menor expressão da hipófise vai inibir a libertação das hormonas tróficas, e interferir com os mecanismos de <i>feedback</i> negativo nestes órgãos A diminuição dos níveis de T4 e glucocorticoides vai provocar a diminuição do metabolismo basal e alterações na gluconeogénese, fertilidade, resistência ao <i>stress</i>, permeabilidade vascular e função gastrointestinal A diminuição da GnRH vai impossibilitar a manutenção de ciclos reprodutivos regulares. Esta perturbação aliada ao estado debilitado do animal e fatores libertados pelo parasita como a PGF_{2α}, vai culminar em infertilidade, por aborto, endometrites com persistência do corpo lúteo, ou formação de quistos ováricos A penetração na barreira hemato-testicular pelo parasita, vai causar uma orquiepididimite, com destruição do parênquima e subsequente azoospermia.

A passagem de tripanossomas através da barreira hematoencefálica (BBB do inglês *Blood-brain barrier*) é um processo misto, onde é necessário um ambiente pró-inflamatório, com elevada concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferão gama (IFN- γ), e a ativação das metaloproteinases de matriz (MMP do inglês *Matrix metalloproteases*) do hospedeiro por enzimas proteolíticas do parasita. Estas MMP vão degradar os componentes das lâminas basais que compõem a BBB, abrindo lacunas por onde os parasitas se podem deslocar para dentro do SNC, seguidos por células inflamatórias (Geurts, Opdenakker, & Van den Steen, 2012).

Os achados histopatológicos encontrados são de meningoencefalite e meningomielite, com infiltrados de natureza monocitária, de localizações variáveis conforme a espécie do parasita e do hospedeiro. No caso de *Trypanosoma brucei* os locais de eleição são os plexos coróideus, possivelmente pela menor espessura da BBB nessa região (Bisser, et al., 2006). Esta inflamação vai não só desencadear os primeiros sinais clínicos consistentes com a fase neurológica, como vai desencadear o aumento de produção de TNF- α e interleucinas como IL-8 e IL-10 dentro do SNC. Esta resposta vai aumentar os títulos de IgM intratecais, bem como estimular a produção de autoanticorpos contra galactocerebrósidos e mielina, levando ao agravamento do quadro sintomatológico bem como do prognóstico (Bisser, et al., 2006). Nesta altura a expressão e concentração de *transforming growth factor beta one* (TGF- β 1) diminui, marcando uma mudança de resposta anti-inflamatória para pró-inflamatória. Esta diminuição quando evidenciada, está relacionada com menor sobrevivência dos animais doentes. (Masocha, Amin, Kristensson & Rottenberg, 2008; MacLean, Reiber, Kennedy & Sternberg, 2012)

A formação de imunocomplexos, dada a pronunciada morte de parasitas com elevada carga antigénica, e substituição sucessiva de variantes antigénicas dominantes é uma componente importante da fisiopatologia da TA. Este componente é também partilhado com outras doenças parasitárias como a Febre da Costa Oriental – Theileriose por *Theileria parva* (ECF do inglês *East coast fever*), a Babesiose, a Leishmaniose e a Malária (Taylor & Authié, 2004; Bowman, 2009; J. Atouguia, comunicação pessoal, Fevereiro de 2011; I. Pereira da Fonseca, comunicação pessoal, Fevereiro de 2011).

Outro componente essencial para a fisiopatologia desta doença é a alteração da resposta imunitária tanto por fatores produzidos pelo parasita, como por certas substâncias libertadas por estes (De Sousa, Atouguia, & Silva, 2011). Um resumo das substâncias produzidas e libertadas pelo parasita que influenciam a fisiopatologia da doença, por imunomodulação, evasão imunitária ou dano celular e tissular é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Fatores intrínsecos do parasita que contribuem para a fisiopatologia da TA

Substância	Função	Libertado ativamente ou por morte do parasita	Fonte
Trypanosome linfocite- triggering factor (TLTF)	Estimulação de linfócitos CD8+ para a produção de IFN- γ	Ativamente	De Sousa <i>et al.</i> , 2010
PGD₂	Estimula a apoptose dos parasitas circulantes. Potente soporífero.	Ativamente	Kubata <i>et al.</i> , 2007
PGE₂	Potente pró-inflamatório.	Ativamente	Kubata <i>et al.</i> , 2007
PGF_{2α}	Estimula diferenciação dos parasitas. Luteolítico, provocando abortos.	Ativamente	Kubata <i>et al.</i> , 2007
Sialidase e trans- Sialidase	Cliva o ácido siálico existente na superfície dos eritrócitos induzindo a sua fagocitose pelas células do Sistema reticuloendotelial. Contribuem também para a sialização das VSG, importante para a proteção dos parasitas.	Ativamente	Coustou <i>et al.</i> , 2012
Metaloproteinase de superfície (MSP)	Intervém na diferenciação dos parasitas na forma procíclica, no mecanismo de variação antigénica e na penetração nos tecidos, ativando MMP.	Ativamente	Baral, 2010
Fosfolipase C e A2	Intervém na diferenciação do parasita para a forma procíclica. A ação lítica destas enzimas provoca lesões nas membranas celulares, têm função hemolítica e anticoagulante.	Ativamente/Morte	Taylor & Authié, 2004; Baral, 2010
VSG e âncora de GPI	As VSG são altamente imunogénicas induzindo uma resposta inflamatória que se torna imunossupressora. A formação de imunocomplexos e depleção dos fatores do SC, resultantes da imunogenicidade e capacidade de interação das VSG com o SC, são também uma parte importante da fisiopatologia da doença. As âncoras de GPI (glicosilfosfatidil inositol) estimulam a secreção de TNF- α por macrófagos que em fases avançadas da doença é nefasta para o hospedeiro.	Ativamente na replicação/Morte	Taylor & Authié, 2004; Baral, 2010; De Sousa <i>et al.</i> , 2010
Proteases cistínicas (congopaína, brucipaína)	Ativam as MMP, possibilitando a invasão das barreiras hemato-orgânicas, e a ativação de mediadores inflamatórios e cascata da coagulação.	Ativamente	Taylor & Authié, 2004; Coustou <i>et al.</i> , 2012; Geurts <i>et al.</i> , 2012

A imunomodulação que o parasita realiza, pela libertação do TLTF é talvez a componente mais importante da imunopatogenia da doença. O TLTF é um péptido que induz a produção de IFN- γ por linfócitos CD8+.

O IFN- γ é considerado como fator trófico para as formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, e participa também na imunossupressão que ocorre durante a doença. Esta produção é dependente do estadió da infeção e do tecido em questão (De Sousa *et al.*, 2011).

A produção de IFN- γ induz a libertação de interleucina 12 (IL-12), TNF- α e óxido nítrico (NO), por ativação de macrófagos do tipo M1, estabelecendo uma resposta Th1, que por sua vez, quando desregulada na doença crónica vai inibir a proliferação de células T, contribuindo para imunossupressão. A produção desregulada de TNF- α nas fases crónicas da doença vai provocar diseritropoiese, resultando em anemia não regenerativa (De Sousa *et al.*, 2011).

Dado o perfil Th1 dominante, as subclasses de IgG anti-*T. brucei* dominantes são IgG2a e IgG3. Estas subclasses participam ativamente na ativação do sistema do complemento pela via clássica, sendo que apenas a IgG3 tem elevada afinidade para os recetores das células fagocíticas (Baudino, Silveira, Nakata & Izui, 2006).

A ativação de macrófagos por fatores intrínsecos do parasita, como as VSG e as respetivas âncoras de GPI, resulta na produção de TNF- α e NO por via não dependente de IFN- γ (Baral, 2010).

A libertação de IL-4, IL-10 e TGF- β 1 tende a ser inibida ao longo do decorrer da infeção, sendo que a produção destas citocinas na fase crónicas é correlacionada com o controlo da infeção e conseqüente tripanotolerância (De Sousa *et al.*, 2011).

A imunossupressão advém não só da desregulação da resposta Th1 acima citada, como da proliferação sucessiva de populações de células B por sucessiva estimulação destas por diferentes variantes antigénicas do parasita, diminuindo assim as reservas de células B-naïve, impedindo deste modo a resposta humoral e celular contra outras agressões externas (Taylor & Authié, 2004).

2.1.4. Sinais clínicos

Os sinais clínicos da TA são vários dependendo do quadro clínico e da fase da doença que cada animal apresenta. O quadro clínico depende da espécie, da raça, ou da estirpe do hospedeiro, da espécie e estirpe do parasita e do estado alimentar e hígido do hospedeiro.

A Tabela 5 resume a gravidade dos quadros clínicos segundo as espécies de hospedeiro e parasita.

Tabela 5 – Descrição das espécies de *Trypanosoma* patogênicas para cada espécie animal e gravidade do quadro clínico respectivo. (Fonte: Taylor & Authié (2004) e Pentreath & Kennedy (2004))

Espécie de Hospedeiro	Espécie de <i>Trypanosoma</i>	Gravidade do quadro clínico
Humano	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Grave
	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Moderado
Bovino	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Ligeiro
	<i>Trypanosoma vivax</i>	Grave
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Grave
Caprinos/Ovinos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> , <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> , <i>T. brucei gambiense</i>	Moderado
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Moderado
	<i>Trypanosoma simiae</i>	Ligeiro
	<i>Trypanosoma vivax</i>	Moderado
Suínos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> , <i>T. brucei gambiense</i>	Ligeiro
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Ligeiro
	<i>Trypanosoma simiae</i>	Grave
	<i>Trypanosoma suis</i>	Grave ¹
Equinos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Grave
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Moderado
	<i>Trypanosoma vivax</i>	Moderado
Asininos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Grave
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Moderado
	<i>Trypanosoma vivax</i>	Ligeiro
Camelídeos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Grave
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Grave
	<i>Trypanosoma vivax</i>	Moderado
Canídeos e Felídeos	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Grave
	<i>Trypanosoma congolense</i>	Moderado
	<i>Trypanosoma simiae</i>	Moderado ²

1 – Muito raro

2 – Ocorre em coinfeção com *T. congolense*

Os sintomas diferem com a gravidade do quadro clínico e com a espécie de hospedeiro, contudo, na fase aguda da doença estes tendem a ser inespecíficos e comuns a outras doenças parasitárias como a ECF, a babesiose, a leishmaniose, as rickettsioses, anaplasmoses e erliquiose.

Os principais sinais clínicos na fase aguda da doença, em especial nos bovinos, as espécies mais afetadas, são a febre, a anemia, caquécia e linfadenomegália com esplenomegália. Outros sinais clínicos da fase aguda são dependentes das espécies afetadas.

Os quadros clínicos por espécie de animal doméstico são explorados seguidamente (Taylor & Authié, 2004).

- Bovinos

O quadro clínico nos bovinos depende muito da espécie que causa a infeção, se existe coinfeção de várias espécies ou estirpes de parasitas, ou se a raça e espécie de bovino é mais ou menos tolerante à infeção (Murray, d'Ieteren & Teale, 2004; Taylor & Authié, 2004; Bowman, 2009).

No geral, um sinal pródromo de infeção poderá ser o cancro de inoculação, lesão tumefacta, quente e dolorosa. Este sinal nem sempre é evidente, especialmente em gado tripanotolerante ou animais de pele escura. Seguidamente os sinais mais típicos são a anemia, notória pela palidez das membranas mucosas, atingindo o hematócrito os 15% duas a três semanas após a infeção (SPI). Os valores aumentam e estabilizam 6 a 8 SPI nos quadros que evoluem para a cronicidade. Quadros hiperagudos causam a morte em 3 a 4 SPI, normalmente sem aumento do valor de hematócrito. Diagnósticos diferenciais para anemia são anaplasmose, babesiose, leptospirose, ECF, parasitismo gastrointestinal por tricostrongilídeos ou *Paramphistomum* sp., esquistossomose, salmonelose, úlcera abomasal por stress e subnutrição.

Esta anemia é acompanhada por linfadenomegália dos linfonodos que drenam o cancro de inoculação, sendo generalizada após o início da parasitémia. Esta alteração ajuda a exclusão de várias causas de anemia principalmente se detetada antes da generalização, quando apenas os linfonodos drenantes do cancro se encontram aumentados.

A febre é notória após o início da parasitémia, e é oscilante, sendo que a temperatura corporal aumenta e diminui com o aumento e diminuição da parasitémia.

Estes sinais são sucedidos por diminuição do ganho médio diário, podendo ser evidente emaciação (Figura 24), e produção leiteira e infertilidade manifestada por abortos, aumento do intervalo inter-partos, orquites com diminuição da vitalidade e número de espermatozoides, podendo inclusive ser verificada azoospermia.

Figura 24 – Tripanossomose bovina. (A) Cria de zebú morta por episódio agudo de *Nagana*. (B) Zebús adultos afetado por *Nagana*, com evidente emaciação (Adaptado de Agência Internacional de Energia Atómica (IAEA), 2002).



Certos isolados, especialmente de *T. vivax*, oriundos da costa oriental de África podem desencadear um quadro hemorrágico, associado a CID.

Os animais infetados podem sofrer um fenómeno de auto-cura, dependendo da tripanotolerância do hospedeiro e do isolado do parasita. Normalmente não se verificam sinais neurológicos, podendo existir alterações patológicas compatíveis com meningoencefalite em infeções graves, normalmente quando se verifica infeção por duas ou mais espécies em simultâneo (Taylor & Authié, 2004).

- Pequenos ruminantes

O quadro clínico nestas espécies é em tudo semelhante ao dos bovinos, embora com menos sinais clínicos.

Os sinais mais notórios são a anemia, a perda de rendimento produtivo e a infertilidade, sendo que o aumento da mortalidade neonatal é o fator mais importante desta, ao contrário de o que ocorre nos bovinos, onde o fator mais determinante para a infertilidade é o aborto. (Taylor & Authié, 2004)

- Equinos e Asininos

As infeções por *T. brucei brucei* em equinos são agudas e com quadro clínico grave, levando a morte de 2 SPI até 3 meses pós-infeção (MPI).

Para além da anemia, febre e linfadenomegália, outro sinal muito característico da doença nesta espécie são os edemas subcutâneos, nas paredes abdominal e torácica e membros.

Outra complicação decorrente da doença nesta espécie é a queratoconjuntivite, podendo dessa inflamação ocorrer ulceração da córnea e cegueira.

O quadro neurológico está presente nesta espécie, consistindo em ataxia progressiva que termina em paralisia.

As infeções por *T. congolense* e *T. vivax* têm evolução crónica podendo culminar em auto-cura.

Nos asininos os quadros clínicos são de menor gravidade que nos equinos, sendo que as infeções por *T. vivax* são assintomáticas (Taylor & Authié, 2004).

- Suínos

O quadro clínico nos suínos, originado pela infeção por *T. brucei* e *T. congolense* é um quadro ligeiro que facilmente evolui para a cronicidade, em que o principal sinal clínico é o aumento da incidência de aborto. Nos casos de infeção por *T. simiae* as manifestações clínicas podem ser bastante agudas, com sinais clínicos inespecíficos, levando à morte em poucos dias.

Os bácoros podem também manifestar sinais clínicos quando infetados por *T. godfreyi*. Estes sinais clínicos constituem um quadro benigno que evolui para a cronicidade após crescimento dos animais, podendo mesmo dar origem a infeções assintomáticas.

A presença de *T. suis* é raramente diagnosticado em suínos, provocando doença aguda em bácoros, levando à morte em 2 a 3 MPI, sendo que causa doença benigna em adultos (Taylor & Authié, 2004).

- Carnívoros

Os cães e os gatos sofrem doença aguda a hiperaguda quando infetados por *T. brucei*, caracterizada por elevada febre e parasitemia, anemia, edemas facial, torácico, abdominal e dos membros, queratoconjuntivite, blefarite e uveíte (Figura 25), mais especificamente no segmento anterior da úvea. Estes sintomas evoluem para um quadro neurológico semelhante ao da Raiva e os animais morrem em poucas semanas.

Nos cães as infeções por *T. congolense* e *T. simiae* são crónicas nas raças locais, podendo no caso de *T. simiae* ser assintomáticas (Bowman *et al.*, 2001; Taylor & Authié, 2004; Ezeokonkwo, Ezeh, Onunkwo & Obi, 2010).

Figura 25 - Cão com opacificação da córnea devido a uveíte por *T. b. brucei*. (Fonte: Greene & Matete, 2006)



- Humanos

Dada a sua importância em saúde pública nos países da região subsariana do continente africano, não pode ficar omissa o quadro clínico presente nos seres humanos. Nesta espécie existem dois quadros clínicos, um agudo, causado por *T. b. rhodesiense*, com morte em semanas a meses e outro crónico provocado por *T. b. gambiense*, fatal em meses ou anos.

Os sinais clínicos decorrentes de ambos os quadros nas fases hemolinfática e neurológica encontram-se resumidos na Tabela 6 (Pentreath & Kennedy, 2004; Teixeira, 2013).

Tabela 6 - Sinais clínicos típicos da THA (Adaptado de Teixeira, 2013)

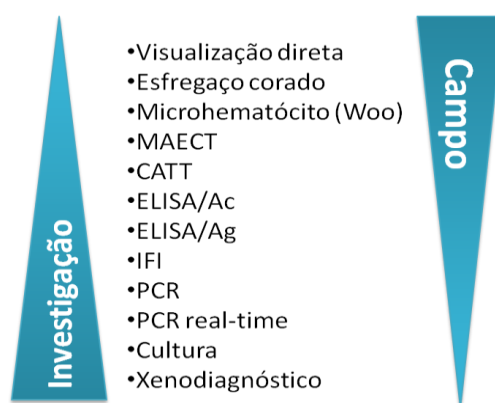
Fase Hemolinfática	
Sinais sistêmicos	Febre, astenia, cefaleia, edema facial, anemia (maioritariamente hemolítica) e adenomegalias.
Sinais dermatológicos	Eritema cutâneo, cancro de inoculação e prurido.
Sinais gastrointestinais	Alterações hepáticas, hepatomegália e esplenomegália.
Sinais cardíacos	Taquicardia precoce, miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, pericardite.
Sinais endócrinos	Distúrbios menstruais, esterilidade, aborto, nados-mortos prematuros, alopecia, perda da libido e impotência sexual, ginecomastia, atrofia testicular e orquite.
Sinais oculares	Irite, iridociclite, queratite, conjuntivite e atrofia coróideia.
Fase neurológica	
Alterações psiquiátricas e mentais	Lassitude e indiferença, ansiedade e irritabilidade, mania e agitação, comportamento violento e suicida, impulsos sexuais descontrolados, <i>delirium</i> e alucinações.
Alterações do sono	Sonolência diurna, insônia noturna e crises narcolépticas.
Alterações motoras e verbais	Sinais piramidais, sinais extrapiramidais (movimentos anormais ou involuntários e tremores), fasciculação muscular, discurso lentificado/arrastado, ataxia cerebelar, neurite e polineurite.
Alterações somatosensoriais	Prurido, parestesia, hiperestesia e anestesia.
Reflexos anormais	Reflexo queilo-oral e reflexo palmo-mentoniano.
Alterações visuais	Diplopia, neurite ótica, atrofia ótica e papiledema.

2.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da TA pode ser efetuado por várias técnicas, descritas seguidamente. É importante salientar a praticabilidade, custo, e sensibilidade destes ensaios, visto que TA é uma doença endémica em regiões em que as populações dispõem de baixos recursos financeiros e existem condicionantes técnicas importantes para o sucesso de certas técnicas de diagnóstico.

A Figura 26 realça a adequação das diferentes técnicas às realidades de campo e de investigação.

Figura 26 - Representação da adequação de diferentes técnicas de diagnóstico às realidades de campo e de investigação. (Adaptado de Eisler *et al.*, 2004; Bisser & Courtioux, 2012 e Bouteille & Buguet, 2012)



Certas técnicas, como o xenodiagnóstico são bastante sensíveis e específicas mas a complexidade de execução e a lentidão dos resultados não as adequam a um contexto de campo. Por outro lado a visualização direta, em gota espessa ou esfregaço, cuja elevada especificidade, facilidade de execução e baixo preço a tornam uma ótima prova diagnóstica em campo, tem uma sensibilidade baixa, podendo dar um grande número de falsos negativos, especialmente em infeções crónicas.

O diagnóstico deve ser iniciado sempre pela história clínica e tomando em conta dados epidemiológicos (Eisler, Dwinger, Majiwa & Picozzi, 2004).

Após o estabelecimento de diagnósticos diferenciais existe uma panóplia de exames complementares que se podem realizar para diagnóstico parasitológico. Estes podem ser divididos em parasitológicos, serológicos e moleculares (Büscher & Lejon, 2004; Eisler *et al.*, 2004; Bouteille & Buguet, 2012).

- Testes Parasitológicos
 - Exame de gota a fresco

Esta prova de diagnóstico consiste na visualização direta do parasita, numa gota de sangue ou de líquido cefalorraquidiano ao microscópio ótico numa ampliação de 400x. Este exame é 100% específico, ou seja oferece um diagnóstico positivo sempre que se verifique a presença de um parasita na preparação, contudo é pouco sensível, requerendo uma

parasitemia de pelo menos 10.000 parasitas/mL de sangue para que ocorra detecção. (Büscher & Lejon, 2004).

- Esfregaço corado por Giemsa

Esta técnica difere da anterior na medida em que aumentando o volume de sangue e o número de campos visualizáveis, e corando as células do sangue, aspirado de linfonodos e de cancro de inoculação ou líquido cefalorraquidiano permite diminuir o limiar de detecção 5000 parasitas/mL de sangue, no caso deste fluido (Figuras 27, 28 e 29). Relativamente aos aspirados (linfonodos e cancro de inoculação) o limiar de detecção tenderá a ser menor visto que há concentração de parasitas nestes locais (Büscher & Lejon, 2004).

Figura 27 - Aspeto de um esfregaço usado para diagnóstico de hemoparasitas. (Imagem gentilmente cedida por Daniela Portugal – IHMT-UNL)



Figura 28 - Aspeto de infeção por *T. brucei brucei* numa ampliação aproximada de 400x, corado com Giemsa. (Fotografia original do autor)

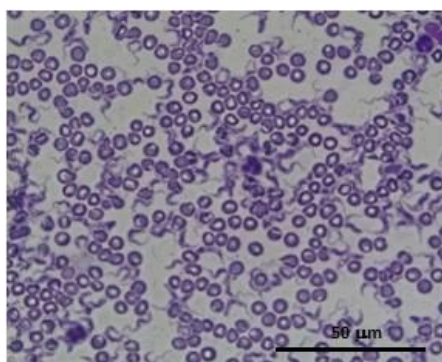
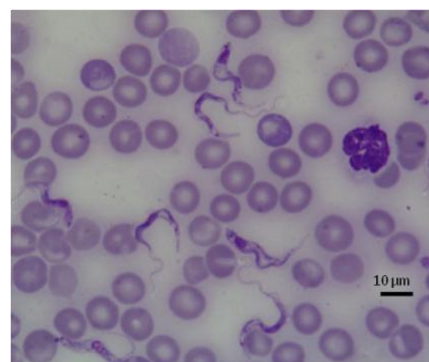


Figura 29 - Aspeto de infeção por *T. brucei brucei* numa ampliação aproximada de 1000x, corado com Giemsa. (Fotografia original do autor)



- Concentração em microhematócrito ou técnica de Woo

Recorrendo à centrifugação de sangue em tubos de microhematócrito e à visualização direta da interface entre a camada flogística e o plasma, é possível a visualização de tripomastigotas móveis. Esta técnica permite diminuir o limiar de detecção para menos de 500 parasitas/mL de sangue.

As desvantagens desta técnica são a necessidade de parasitas vivos, sendo necessário que o tempo que separa a colheita da centrifugação e visualização seja o mais curto possível. Outra desvantagem é a possibilidade de falsos negativos se houver microfilarémia simultânea. As microfírias sendo maiores tendem a dificultar a visualização dos tripomastigostas (Büscher & Lejon, 2004; Eisler *et al.*, 2004).

- *Mini Anion Exchange Centrifugation Technique* (MAECT)

Esta técnica consiste na passagem auxiliada por centrifugação de cerca de 300μL de sangue numa pequena coluna de cromatografia por permuta aniónica. Esta técnica diminui o limiar de detecção para 100 parasitas/mL. Esta técnica requer centrífugas mais especializadas, com controlo de velocidade, e colunas de cromatografia próprias, cujo preço pode limitar o uso desta técnica em campo (Büscher & Lejon, 2004).

- Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico tanto por inoculação de sangue em animais de laboratório (murganhos, ratos, cobaios e coelhos), como por alimentação de glossinas tenerais, é um método diagnóstico lento e dispendioso, necessitando de condições muito particulares, próprias de centros de investigação.

Para além de ser eticamente menos recomendável que a cultura *in vitro*, os longos períodos de incubação e as diferentes interações entre parasita e hospedeiro condicionam o sucesso da técnica.

A grande vantagem desta técnica é permitir a confirmação da infeção mesmo com uma carga parasitária baixa, por vezes indetetável por visualização direta. Esta técnica também permite o isolamento do agente para cultura celular (Büscher & Lejon, 2004).

- Cultura *in vitro*

Este método de diagnóstico é mais eticamente recomendável que o xenodiagnóstico por não necessitar de animais vivos.

Também permite o isolamento dos agentes para estudos posteriores a partir de uma baixa carga parasitária, sendo que as principais desvantagens são o tempo de incubação elevado e a necessidade de otimização de meios de cultura específicos para os diferentes agentes. A complexidade técnica e os elevados custos associados tornam esta técnica uma fraca escolha no diagnóstico de infeções em campo (Silva, Seidl, Ramirez, & Dávila, 2002; Büscher & Lejon, 2004).

- Testes Serológicos

- *Cardboard agglutination test for Trypanosomiasis (CATT)*

O teste de aglutinação em cartão (Figura 30) é amplamente utilizado para diagnóstico de tripanossomose humana crónica, mostrando-se teoricamente bastante vantajoso para diagnóstico de infeção por espécies do subgénero *Trypazon* na medida que as proteínas que constituem as variantes antigénicas dominantes são altamente conservadas nas espécies.

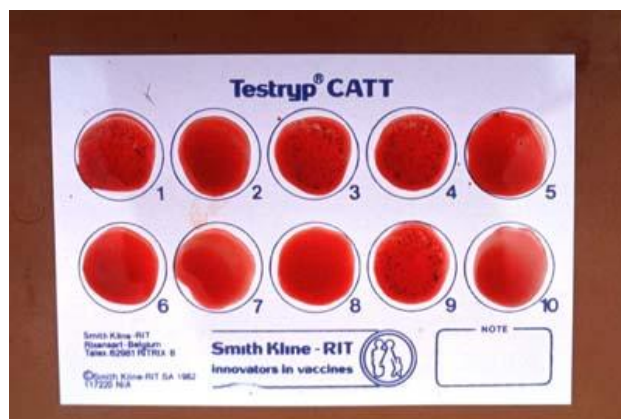
De momento a utilização é restrita à subespécie *T. brucei gambiense* visto existirem problemas de sensibilidade, que originam muitos falsos negativos nas restantes subespécies usando o antigénio comercial.

Estes testes não têm grande aplicação nas infeções por outras espécies de *Trypanosoma* causadoras de *Nagana*.

Sendo de fácil realização e relativamente pouco dispendiosa é considerada como uma boa técnica de *screening* individual e populacional. (Büscher & Lejon, 2004; Bouteille & Buguet, 2012).

Outra técnica de aglutinação em matriz de latex (LATEX/*T.gambiense*) encontra-se disponível conferindo maior sensibilidade (Büscher & Lejon, 2004)

Figura 30 - Teste CATT, evidenciando aglutinação nos poços 1, 3 4 e 9. (Fonte: Earlham College, 2003)



- Fixação do complemento (Fc)

O teste de fixação do complemento é amplamente utilizado para programas de erradicação de *T. equiperdum*, e tem demonstrado bons resultados em diagnóstico de infecções por *T. congolense* face à IFI. Contudo, dado a dificuldades de preparação de reagentes, de standardização, e atividade anti-complemento sérica esta técnica não é considerada uma boa técnica de diagnóstico em tripanossomose bovina (Eisler *et al.*, 2004).

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para detecção de anticorpos (ELISA/Ac)

O teste ELISA para detecção de anticorpos é considerado um bom teste de *screening* populacional em rastreios epidemiológicos (Figura 31). O ELISA tende a ser mais sensível que a IFI, e tem como vantagem a possibilidade de avaliação de mais amostras em simultâneo, o que reduz os custos de testagem. Esta técnica tem a desvantagem de ter uma menor especificidade, o que confere a necessidade de estabelecimento de *cut-off* rigoroso, também se verificando a possível existência de uma “zona cinzenta” ampla, com bastantes resultados duvidosos.

É possível contudo o aperfeiçoamento da técnica com proteínas recombinantes, em alternativa a extrato de parasita total, que permitem aumentar a especificidade, por vezes à custa da sensibilidade.

Escusado será dizer que os ELISA para detecção de anticorpos não permitem determinar o estado de infeção ativa, visto que a persistência dos anticorpos pós-terapêutica é longa aumentando a ocorrência de falsos-positivos após cura parasitológica (Eisler *et al.*, 2004)

Figura 31 - Placas de ELISA para detecção de IgG e IgM totais contra *T.brucei brucei*. (Fotografia original do autor)



- ELISA para detecção de antígeno (ELISA/Ag)

O teste ELISA para detecção de antígeno tem a vantagem de uma detecção de infecção ativa, mais precoce que o ELISA para detecção de anticorpos, sendo possível a detecção do agente 10 a 15 DPI nos casos de *T.congolense* e *T.evansi*.

Contudo, estudos revelaram que a sensibilidade dos ELISA é insuficiente para diagnóstico uniformizado da tripanossomose bovina (Eisler *et al.*, 2004).

- Imunofluorescência indireta (IFI)

A imunofluorescência indireta é um teste de diagnóstico cuja sensibilidade e especificidade altas conferem uma boa eficácia de diagnóstico. Porém este teste tem várias desvantagens que condicionam a sua aplicação no diagnóstico da tripanossomose bovina nos países endêmicos. A primeira desvantagem é a necessidade de aquisição de transiluminadores ou microscópios com foco UV, onerosos.

Uma última desvantagem é a reatividade cruzada entre espécies de *Trypanosoma* diferentes dificultando assim a terapêutica (Eisler *et al.*, 2004).

- Métodos Moleculares

- *Polymerase chain-reaction* (PCR)

A utilização de PCR para diagnóstico da infecção por tripanossomas é extremamente vantajosa por várias razões. Primeiramente esta técnica permite detetar um parasita por amostra analisada, o que lhe confere uma alta sensibilidade, especialmente em infecções crônicas com baixa parasitêmia.

Outra vantagem desta técnica para diagnóstico é a especificidade de espécie, dependendo das sequências de *primers* utilizados.

As desvantagens desta técnica prendem-se com o custo final da análise, que em baixa escala pode ser maior que o suportável para diagnóstico individual bem como a necessidade de meios de processamento e execução da técnica específicos e indisponíveis em certos locais endêmicos (Büscher & Lejon, 2004; Eisler *et al.*, 2004).

- *PCR em tempo real*

O PCR em tempo real oferece mais duas vantagens relativamente ao PCR convencional. A primeira é a obtenção de resultados em menos tempo, com processamento de mais amostras em simultâneo. E a outra vantagem é a quantificação de carga parasitária, medição que não é possível com a metodologia convencional.

A maior desvantagem é o preço e necessidade de especialização para utilização dos equipamentos de PCR em tempo real (Büscher & Lejon, 2004; Bisser & Courtioux, 2012; Bouteille & Buguet, 2012).

2.1.6. Terapêutica e Profilaxia

A terapêutica da TA pode ser realizada com base numa seleção de fármacos, muitos destes utilizados desde o fim da primeira guerra mundial. O valor total de mercado para fármacos tripanocidas ronda os 30 milhões de dólares anuais para medicamentos veterinários, não justificando, por parte da indústria farmacêutica, um investimento em investigação e desenvolvimento de novos medicamentos avaliado em 240 milhões de dólares por fármaco. Dada a baixa rentabilidade económica da produção e distribuição de certos tripanocidas, certas empresas do sector farmacêutico cederam a propriedade dos fármacos à Organização Mundial de Saúde (OMS) (Aksoy, 2011).

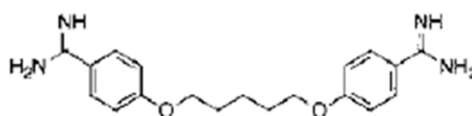
Assim, a escolha de armas terapêuticas é limitada, ainda mais para os casos de TAA, considerando que já estão descritas resistências, e que em todos os casos, como não são licenciados na EU, os fármacos apenas poderão ser utilizados com uma autorização especial, ao abrigo da cascata aplicando um intervalo de segurança mínimo de 28 dias para a carne e 7 dias para o leite.

Os fármacos utilizados serão apresentados seguidamente sendo que a sua utilização depende da espécie do agente diagnosticado e da fase da doença, sendo que esta é diferenciável, o que não acontece muitas vezes, por exemplo no caso dos ruminantes (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004).

- Pentamidina

A pentamidina (Figura 32) é uma diamidina utilizada na terapêutica da fase hemolinfática da tripanossomose humana africana crónica, tendo provado ser eficaz na tripanossomose africana canina, como alternativa ao aceturato de diminazeno (AcD) (Akpa, Ezeokonkwo, Eze & Anene, 2008; Bouteille & Buguet, 2012)

Figura 32 - Estrutura da Pentamidina. (Adaptado de Barret *et al.*, 2007)



Pentamidina

Este fármaco é utilizado apenas no tratamento da fase hemolinfática da THA. Mesmo tendo elevada afinidade para as proteínas plasmáticas e atravessando a barreira hematoencefálica (BBB), a sua eficácia na fase neurológica é limitada, pelo menos no hospedeiro humano.

O mecanismo de ação deste fármaco é a ligação com o DNA inclusive nas rede de maxicirculos e minicirculos de kDNA. Assumindo a mitocôndria como o organelo de eleição para a deposição e concentração das diamidinas, a ação destas moléculas sobre o DNA é particularmente relevante no kDNA (Barrett, Boykin, Brun & Tidwell, 2007).

A resistência a pentamidina tem sido rara, em contraste com a resistência reportada para o aceturato de diminazeno. A pentamidina é então, ponderada para terapêutica da tripanossomose africana canina em substituição do AcD (Akpa *et al.*, 2008).

Os mecanismos de resistência dos parasitas à pentamidina consistem na alteração dos transportadores específicos das diamidinas e dos arsenicais, na alteração do potencial de membrana mitocondrial e na discinetoplasia (a destruição do cinetoplasto), muito prevalente no caso de *T.evansi* (Silva *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2007).

Este fármaco tem toxicidade elevada originando reações adversas como hipoglicémia e hipotensão, esta última pode ser evidenciada em cerca de 10% dos casos. Outros efeitos adversos incluem dor no local de administração, leucopenia e elevação das enzimas hepáticas.

Este fármaco é produzido pela Sanofi-Aventis e comercializado sob o nome comercial Pentacarinat[®] (Figura 33), na forma de ampolas de 200mg para administração IM ou IV lenta, na dose de 4mg/kg em dias alternados durante 7 a 10 dias (Barrett *et al.*, 2007).

Figura 33 - Embalagem de Pentacarinat[®]. (Adaptado de Université Médicale Virtuelle Francophone em <http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/enseignement/maladiesommeil/site/html/6.html>)



- Suramina

A suramina (Figura 34) é um derivado polissulfonado simétrico do naftaleno, que foi pela primeira vez utilizada na THA em 1922 quando foi demonstrado que certos corantes derivados do naftaleno tinham atividade tripanocida, como é o caso do azul tripano.

Este fármaco é produzido e doado à OMS pela Bayer, sob o nome de Germanin® (Figura 34), tendo sido também comercializado como Naganol® pela mesma empresa para uso veterinário (Silva *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2007).

Figura 34 - Estrutura da molécula de Suramina (Adaptado de Barret *et al.*, 2007).

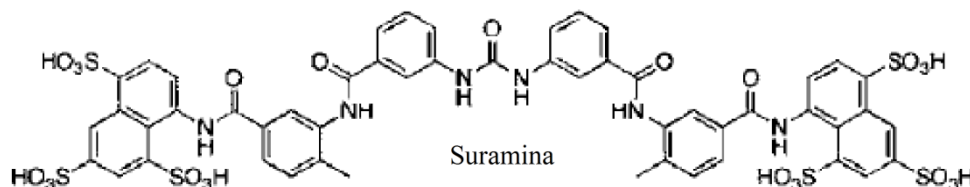


Figura 35 - Germanin®, a apresentação comercial da Suramina. (Adaptado de Université Médicalle Virtuelle Francophone, 2012)



Este fármaco é utilizado no tratamento da fase hemolinfática da THA aguda, e no tratamento de certas infecções por tripanossomas em equinos e camelídeos, nomeadamente a Surra.

A suramina pode ser administrada apenas por via IV, nas doses de 7-10 mg/kg, podendo, graças à sua semi-vida de eliminação extremamente longa (3 meses) ser usada como profilático em zonas com baixa concentração de vetores, ou em focos esporádicos (Silva *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2007).

Como a pentamidina, este fármaco tem a capacidade de atravessar a BBB. Contudo este fármaco é eficaz contra a fase neurológica da doença somente quando administrada em doses tóxicas (>80mg/kg).

O mecanismo de ação da suramina é desconhecido, sendo o mecanismo mais aceite a inibição de certas enzimas por interação electrostática com as mesmas.

Com a pentamidina os relatos de resistência são raros, e os mecanismos pelos quais se criam resistência são desconhecidos.

Este fármaco também tem elevada toxicidade. Os efeitos adversos incluem neuropatia, eritema, fadiga, anemia, hiperglicemia, hipocalcemia, coagulopatias, neutropenia, insuficiência renal e aumento das transaminases (Barrett *et al.*, 2007).

- Aceturato de diminazeno (AcD)

O aceturato de diminazeno (Figura 36) é uma diamidina aromática utilizada amplamente para tratamento das tripanossomoses animais.

É comercializado pela MSD Animal Health com o nome comercial Berenil[®] (Figura 37) e tem eficácia comprovada contra *T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi* e *Babesia* spp (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004).

Figura 36 - Estrutura da molécula de diminazeno. (adaptado de Barrett *et al.*, 2007)

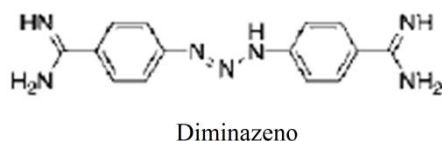


Figura 37 - Berenil[®], a apresentação comercial de Aceturato de Diminazeno. (Adaptado de Intervet Perú, 2009)



Este amplo espectro de ação é bastante vantajoso para os produtores, especialmente quando em combinação com Tetraciclina, disponível na América pela Ciba Geigy Química S.A. com o nome comercial Ganatet[®], que confere ação acrescida contra *Anaplasma* spp.

O mecanismo de ação deste fármaco é semelhante ao da Pentamidina, contudo têm sido reportados mais casos de resistência ao AcD que à pentamidina, sendo que certos autores consideram que este fármaco deixou de ser eficaz no combate à tripanossomose. Alguns estudos correlacionam ainda a resistência dos parasitas ao tripanocida com alterações no transportador P2, associando a ocorrência de resistência ao AcD com resistência cruzada com o melarsoprol e a melarsamina. Este mecanismo de resistência é especialmente preocupante para a saúde pública no caso das infecções por *T.b.rhodesiense* (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004; Akpa *et al.*, 2008).

Este fármaco tem ainda um volume de distribuição menor que a Pentamidina conferindo-lhe mais dificuldade em cruzar a BBB, e portanto não tendo utilidade no tratamento da fase neurológica da doença (Silva *et al.*, 2002; Barrett *et al.*, 2007).

A toxicidade deste fármaco é semelhante à da pentamidina, podendo desencadear também uma encefalopatia e mielopatia por falha terapêutica, que ocorre nos casos em que os parasitas atravessaram a BBB, protegendo-se da terapêutica. Esta síndrome manifesta-se como uma meningoencefalite e meningomielite, cujo sinal clínico mais comum é a paralisia dos membros posteriores (Fernandes, Atouguia, Peleteiro, Jennings & Rosário, 1997).

A dose recomendada deste fármaco é 3,5 mg/kg administrado por via IM e intervalo de segurança é 21 dias para todos os produtos de origem animal (Silva *et al.* 2002; Intervet, 2009).

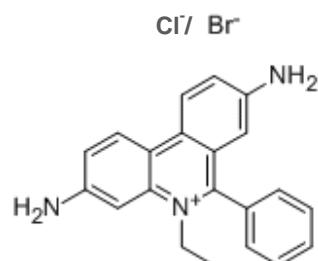
- Brometo e Cloreto de Homídeo (Etídeo)

O homídeo pertence à classe dos compostos da fenantridina e é fabricado tanto na forma de sal brometo como de sal cloreto os quais são igualmente ativos (Figuras 38 e 39).

Figura 38 - Chlorhomidium[®], a apresentação comercial do Cloreto de Homídeo. (Adaptado de Genevet, 2013)



Figura 39 - Estrutura dos sais de Homídeo. (Adaptado de Chemical book, 2008)



Ambos os sais são recomendados como agentes terapêuticos na dose de 1,0 mg/kg para as infecções por *T.vivax* e *T.congolense*. Estes agentes são intercalantes do DNA, sendo altamente mutagênicos e interferindo com a síntese dos minicírculos de kDNA.

Este é um mecanismo de ação possível sendo ainda proposto que a interação destas moléculas com o metabolismo da tripanotona e com as funções dos glicosomas seja importante para a sobrevivência dos parasitas.

A elevada ligação com as proteínas plasmáticas confere uma ação profilática de 2 a 19 semanas após administração. A causa possível para estas variações não é conhecida, o que torna os sais de homídeo profiláticos imprevisíveis, e portanto menos desejáveis.

Os mecanismos de resistência dos parasitas aos sais de homídeo estão pouco esclarecidos, e pensa-se serem semelhantes aos do isometamídeo (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004).

- Cloreto de Isometamídeo

O cloreto de isometamídeo (Figura 40) é amidina aromática da fenantridina formada pela combinação do homídeo com a p-aminobenzamida diazotada do AcD e tem atividade profilática e terapêutica contra *T.vivax*, *T.brucei*, *T.congolense* e *T.evansi*. A Ceva Santé Animal, é o fabricante da apresentação, denominada Veridium[®] (Figura 41).

Figura 40 - Estrutura do Cloreto de Isometamídeo. (Adaptado de Chemical book, 2010)

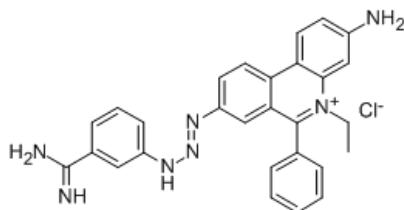


Figura 41 - Veridium[®], a apresentação comercial do Cloreto de Isometamídeo. (Adaptado de Ceva-Africa, 2010)



Está indicado o uso desta substância nas doses de 0,25-0,5 mg/kg para uso terapêutico e 0,5-1 mg/kg para uso profilático, sempre por via IM (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004). Este fármaco atua ao nível do kDNA, clivando os complexos de topoisomerase do kDNA, encontrando-se em maiores concentrações nos cinetoplastos. Assim, dois possíveis mecanismos de resistência ao isometamídeo são a alteração do potencial de membrana do cinetoplasto e a alteração de transportadores para o fármaco. Aparentemente a ausência de cinetoplasto não confere resistência ao isometamídeo como acontece com as diamidinas (Kaminsky, Schmid & Lun, 1997).

A duração da profilaxia com este fármaco é variável, entre 2 a 22 semanas, dependendo da sensibilidade dos isolados de *Trypanosoma* sp. existentes nas áreas em causa.

Não são claros os dados sobre efeitos secundários e resíduos deste fármaco, sendo que para o isometamídeo o IS mínimo aplicado deverá ser 28 dias, ao abrigo da cascata (Silva *et al.*, 2002; Ceva, 2010).

- Dimetilssulfato de Quinapiramina / Dimetilssulfato:cloreto (3:2) de Quinapiramina

Os sais de Quinapiramina foram amplamente usados entre 1950 e 1970 para tratamento das tripanossomoses, tendo sido reintroduzidos em 1985 para uso exclusivo em camelos, equinos e suínos, estes últimos apenas se infetados por *T. simiae*.

Esta substância é uma piramidina quinolina e é comercializada sob a forma de sulfato como um agente curativa (Trypacide Sulphate[®]) e em combinação dos sais sulfato e cloreto (3:2) (Trypacide Pro-salt[®]) para fins profiláticos (Silva *et al.*, 2002).

As doses recomendadas são apenas calculadas para o sulfato, e podem ir de 3 a 5 mg/kg para administração por via SC. A duração do efeito profilático é de 8 a 12 semanas.

Este fármaco foi abandonado devido à sua toxicidade, facilidade de seleção de estirpes resistentes e ausência de informações sobre os resíduos em produtos edíveis.

O seu uso é apenas recomendado em casos pontuais e sendo completamente contraindicado como profilático em todas as espécies, e mesmo terapêutico em ruminantes.

A seleção de clones resistente pela quinapiramina é particularmente preocupante, dado que estes clones têm resistência cruzada com diamidinas e derivados da fenantridina.

Adicionalmente mantêm-se infetantes para as moscas tsé-tsé, dada a preservação do cinetoplasto (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004).

- Melarsoprol / Melarsomina

Estes dois fármacos pertencem à família dos arsenicais, compostos com elevada atividade tripanocida mesmo nas fases avançadas da doença.

O melarsoprol é um melaminofenilarsenical utilizado na terapêutica da fase neurológica da THA, tanto aguda como crónica. Este medicamento foi produzido pela Aventis sob o nome comercial Arsobal[®] e cedido à OMS.

Figura 42 - Estrutura da molécula de Melarsoprol (Adaptado de Barrett *et al.*, 2007).

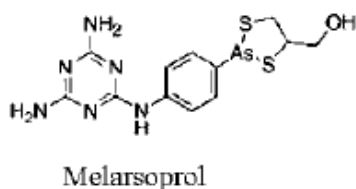


Figura 43 - Arsobal[®], a apresentação comercial do Melarsoprol (Adaptado de Earlham College, 2003).



O mecanismo de ação deste fármaco é desconhecido, sendo proposto que a interação com grupos tiol interfere com a célula em vários níveis, sendo os mais importantes a via enzimática da tripanotona e a interação com a membrana plasmática.

O mecanismo de resistência mais descrito são alterações no transportador P2 que diminui a captação dos arsenicais pela célula.

Este fármaco tem também elevada toxicidade, sendo que os efeitos secundários da administração são febre, cefaleia, prurido, trombocitopenia e miocardite. O efeito secundário mais grave da administração de melarsoprol é a encefalopatia reativa que ocorre em 5-10% dos casos, advindo a morte em metade destes. Esta encefalopatia pode ser combatida com glucocorticóides e tiamina, tendo prognóstico muito reservado.

Os protocolos terapêuticos utilizados diferem com o país e com a subespécie de *T. brucei* a tratar, sendo que podem variar desde protocolos de 10 dias seguidos na dose de 2,16mg/kg administrados por via IV SID, a protocolos de administração de 3 dias seguidos repetidos quatro vezes num mês com doses iniciando-se em 0,36 mg/kg por via IV SID na primeira administração e aumentando gradualmente até 3,6 mg/kg por via IV SID na última (Burri, Stich & Brun, 2004; Barret *et al.*, 2007; Bouteille & Buguet, 2012).

A melarsomina é um melaminil tioarsenito (Figura 44). O nome comercial Cymelarsan[®] é também conhecido como Mel Cy, RM 110, estando licenciado em Portugal como Immiticide[®], comercializado pela Merial, com indicação para tratamento adulticida de dirofilarioses subclínicas a moderadas no cão, devidas a *Dirofilaria immitis* (Figura 45).

Figura 44 - Estrutura da molécula de Melarsomina (Adaptado de Chemical book, 2008).

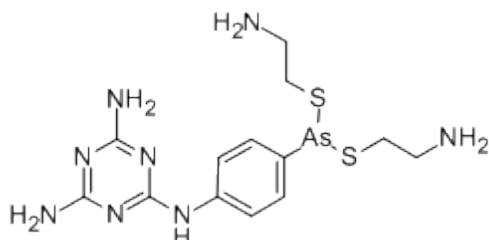


Figura 45 - Immiticide[®], a apresentação comercial da Melarsomina (Adaptado de Drugs.com, 2010).



O composto é ativo contra o subgênero *Trypanozoon*, sendo a dose tripanocida entre 0,25 a 3 mg/kg administrado por via SC ou IM em dose única.

Os efeitos secundários mais observados são gastrointestinais, vômito e diarreia, e pulmonares, predominantemente o edema pulmonar agudo.

Os mecanismos de resistência a este fármaco e os mecanismos de ação propostos são semelhantes aos do melarsoprol.

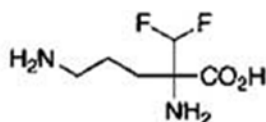
A melarsomina encontra-se exclusivamente licenciada para medicina veterinária e é de momento, o único fármaco tripanocida disponível para animais em Portugal.

Em Portugal este fármaco não se encontra licenciado para animais de produção, pelo que deverá ser prescrito ao abrigo da cascata e os intervalos de segurança mínimos aplicados devem ser de 28 dias para a carne e 7 dias para o leite.

- Eflornitina

A eflornitina (Figura 46) (Ornidyl[®] - Marion Merrell Dow, apresentado na Figura 47) é um derivado da ornitina utilizado como agente terapêutico da fase neurológica da variante crónica da THA.

Figura 46 - Estrutura da molécula de Eflornitina. (Adaptado de Barrett *et al.*, 2007)



Eflornitina

Figura 47 - Ornidyl[®], a apresentação comercial da Eflornitina. (Adaptado de Université Médicale Virtuelle Francophone, 2012)



Este fármaco atua inibindo a enzima ornitina descarboxilase, interferindo assim na síntese de poliaminas, necessárias à sobrevivência dos tripanossomas. Esta inibição é mais importante em *T. b. gambiense* que em *T. b. rhodesiense*, visto que esta subespécie aumenta a expressão de transportadores de putrescina, antagonizando a inibição enzimática induzida pela eflornitina. Esta inibição da síntese de poliaminas vai induzir o aumento da s-adenosil metionina, induzindo a metilação de proteínas e ácidos nucleicos, parando eficazmente as função celulares. Após este fenómeno, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas *stumpy* quiescentes, sendo eliminadas pelo sistema imunitário.

Os mecanismos de resistência dos tripanossomas a este fármaco baseiam-se na diminuição da captação de eflornitina pelos parasitas e pelo aumento do numero de transportadores de putrescina, antagonista da eflornitina.

As doses recomendadas são 100 mg/kg administradas por via IV a cada 6 horas durante 14 dias (Burri *et al*, 2004; Barrett *et al.*, 2007; Bouteille & Buguet, 2012).

Mesmo sendo altamente hidrossolúvel, com o protocolo acima citado, as concentrações de eflornitina no LCR, sendo 10-90% das encontradas no plasma têm ação tripanostática. Esta longa duração do protocolo terapêutico limita o uso deste fármaco em contexto não hospitalar.

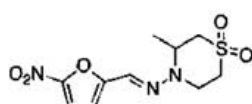
A eflornitina tem ainda vários efeitos secundários como febre, cefaleias, eritema macular, neuropatia periférica, tremores, diarreia e vômito.

- NECT (*Eflornitine and Nifurtimox combination therapy*)

Dada a resistência reportada com o uso da eflornitina, foi explorado o efeito sinérgico que este fármaco tem com o nifurtimox (Figuras 48 e 49).

O nifurtimox é um antichagásico da família dos nitrofuranos, cujo mecanismo de ação consiste na formação de radicais livres pela redução do grupo nitro, especialmente no interior das células do parasita, dada a existência de nitroreductases próprias que catalizam esta reação. Estes radicais livres oxidam proteínas e ácidos nucleicos, induzindo a morte celular (Rassi & Luquetti, 2004; Maya, et al., 2007).

Figura 48 - Estrutura moléculas do Nifurtimox. (Adaptado de Barrett *et al.*, 2007)



Nifurtimox

Figura 49 - Lampit[®], a apresentação comercial do Nifurtimox. (Adaptado de The Matthew's Story, 2010)



Este fármaco também é interiorizado pelos parasitas por vias alternativas ao transportador P2, mostrando eficácia nos casos de resistências ao melarsoprol e às diamidinas. O nifurtimox ainda atravessa a BBB, atingindo concentrações até 50% das plasmáticas, tornando-o um bom candidato para tratamento da fase neurológica.

Este fármaco tem, contudo elevada toxicidade, sendo os principais sinais os cutâneos (eritema e prurido), os gastrointestinais (diarreia e vômitos) e os neurológicos (polineuropatia). Este fármaco é também genotóxico aumentando assim o risco de ocorrência de neoplasias (Burri *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2007).

O sinergismo com eflornitina surge da inibição por esta da produção de tripanotona, protetora contra o *stress* oxidativo causado pelo nifurtimox. Este sinergismo aumenta a eficácia tripanocida do nifurtimox, que isolado apenas consegue no máximo 80% de cura, e diminui a ocorrência de resistência à eflornitina.

O protocolo terapêutico utilizado consiste em 200mg/kg por via IV, BID, de eflornitina durante 7 dias, combinado com 3 a 5 mg/kg de nifurtimox administrado PO durante 10 dias (Burri *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2007; Bouteille & Buguet, 2012)

Este protocolo tem a desvantagem de a administração de eflornitina ter de ser efetuada em contexto hospitalar, ainda assim é reduzida a duração da terapêutica com este fármaco, e assim a duração da hospitalização.

- Fármacos em desenvolvimento

Com base nas justificações da toxicidade elevada e do aumento da ocorrência de resistências aos tripanocidas convencionais têm sido procuradas novas alternativas a estes fármacos.

Das diversas alternativas encontradas serão mencionadas as mais promissoras, desenvolvidas na atualidade. De salientar que estes fármacos não se encontram licenciados, encontrando-se no máximo na fase 3 dos ensaios clínicos.

Na Tabela 7 estão resumidas as moléculas estudadas mais recentemente, o seu mecanismo de ação, e a fase de desenvolvimento, quando em ensaio clínico.

Tabela 7 – Novos ensaios com princípios ativos contra a TA.

Molécula	Mecanismo de ação	Fase de desenvolvimento (relativamente à data da citação)	Fonte
Pafuramidina (DB289)	Semelhante à Pentamidina e Aceturato de Diminazeno	Fase III de ensaios clínicos para <i>Pneumocystis carinii</i> ,	Barret <i>et al.</i> , 2004; Barret <i>et al.</i> , 2007
Fexinidazol	Possível indução de stress oxidativo por redução de um grupo nitro catalisado por enzimas do parasita	Fase II/III de ensaios clínicos para TA.	Toreele <i>et al.</i> , 2010; DNDI, 2012
Ascofuranona	Inibição da enzima Oxidase mitocondrial alternativa insensível ao cianeto de <i>T.brucei</i> .	Em ensaios <i>in vitro</i>	Minagawa, 2012

A profilaxia da TA consiste apenas na quimioprofilaxia, mencionada anteriormente. As tentativas de criação de uma vacina apenas proporcionaram proteção parcial dos animais, aquando a inoculação com parasitas vivos com parasitas vivos (Teixeira, 2013).

Das tentativas de imunização testadas, as que envolvem parasitas irradiados ou mortos apenas conferem proteção contra a variante antigénica dominante, sendo que o mecanismo de variação antigénica dos parasitas rapidamente colmata essa proteção (Taylor & Authié, 2004).

Estudos com vacinas de DNA demonstram que estas conferiram proteções de entre 20 a 60% dependendo da valência vacinal estudada. Os resultados mais promissores foram conseguidos quando se desencadeou imunidade contra a trans-Sialidase de *T. brucei brucei*. (Silva *et al.*, 2009; Lança *et al.*, 2011). A Tabela 8 resume os ensaios de diferentes candidatos vacinais contra *T. brucei*.

Ainda como forma de atenuação das perdas económicas em gado bovino, nas zonas endémicas a seleção genética para a tripanotolerância pode ser feita. Esta seleção pressupõe o encontro de um bom ponto de equilíbrio entre a produtividade das raças de alta produção e a resistência aos parasitas nessas zonas, e funciona em parte como uma forma de profilaxia, não contra a infeção mas contra os quadros clínicos e as consequências destes. A raça bovina tripanotolerante por excelência é a raça N'Dama (Murray *et al.*, 2004).

A Tripanotolerância tem 3 determinantes:

- Controlo da anemia

Os animais tripanotolerantes tendem a ter uma anemia mais ligeira nas fases agudas da doença, podendo os valores de hematócrito ser normais durante as fases crónicas.

- Controlo da parasitémia

Os animais tolerantes à infeção tendem a ter parasitémias baixas, muitas vezes indetetáveis sem que se recorra a técnicas de concentração ou moleculares.

- Facilidade na aquisição de controlo melhorado do quadro clínico

Mesmo quando criados em zonas indemnes, os animais tripanotolerantes quando infetados pela segunda vez, tendem a apresentar melhor controlo do quadro clínico que animais suscetíveis nas mesmas condições.

Tabela 8 - Candidatos vacinais para profilaxia contra *Trypanosoma brucei* e respectivos resultados em proteção (Adaptado de Teixeira, 2013).

Via	Antigénio	Preparação do antigénio	Doses	Intervalo de tempo entre as doses	Dose de parasitas administrados	Proteção conferida	Referência
IM	Bolsa flagelar	Parasita Isolado (antigénio total)	3	≥ 14 dias	Exposição natural no campo	Proteção parcial	Mkunza <i>et al.</i> , 1995
IP	Bolsa flagelar	Parasita Isolado (antigénio total)	3	Não Indicado	500x10 ³	Proteção parcial/ sem proteção	Radwanska <i>et al.</i> , 2000
IP	ISG65, ISG75	Proteína recombinante	3	11 dias	10 ⁴	Sem proteção	Zielgerbauer <i>et al.</i> , 1993
IP	ISG	pDNA	1	175 dias	500	Proteção parcial	Lança <i>et al.</i> , 2011
IP	PLC	pDNA	1	175 dias	500	Proteção parcial	Lança <i>et al.</i> , 2011
IM	nTSA	pDNA	1	175 dias	500	Proteção parcial	Silva <i>et al.</i> , 2009
SC	Actina	Proteína recombinante	3	6 dias	10 ³	Proteção parcial	Li <i>et al.</i> , 2009
SC	Tubulina	Proteína recombinante	3	6 dias	10 ³	Proteção parcial	Li <i>et al.</i> , 2007
SC	Tubulina	Isolado do parasita	3	Não Indicado	10 ³	Proteção parcial	Lubega <i>et al.</i> , 2002
IP	ATPases catiónicas	Proteína recombinante	3	6 semanas	10 ⁶	Sem proteção	Ramey <i>et al.</i> , 2009
IP	GPI	Lipossomas	2	3 semanas	5x10 ³	Proteção parcial	Stijlemans <i>et al.</i> , 2007
SC	Proteínase cistínica	Proteína recombinante	4	1 mês	Infeção experimental pela mosca Tsé-tsé	Proteção parcial	Authie <i>et al.</i> , 2001

A fisiopatologia da tripanotolerância consiste na interferência com diversos mecanismos causadores de doença.

Uma das variações fisiológicas existentes nos animais tripanotolerantes é a altíssima concentração de ácido siálico nas membranas eritrocitárias e variação nos grupos o-acetil e o-glicolil na membrana eritrocitária que interferem com a ação da sialidase, permitindo assim um maior controlo da anemia. Associada a estas particularidades, uma sobreexpressão de recetores para a eritropoietina pelos animais em fase crónica colmata a diseritropoiese.

Outra é a capacidade de aumentar o título de anticorpos, especialmente de IgG1, contra antigénios crípticos, como as protéases cistínicas.

A modulação da resposta imunitária é também diferente nos animais tripanotolerantes sendo que nestes a expressão de IL-10 e IL-4 não é inibida na fase crónica da doença, ao contrário do que se sucede nos animais mais suscetíveis (Murray *et al.*, 2004; De Sousa *et al.*, 2011). Uma das técnicas de seleção de animais tripanotolerantes em campo é a seleção pelo valor do hematócrito, sendo que este apresenta uma correlação muito forte com a tripanotolerância dos indivíduos (I.Pereira da Fonseca, comunicação pessoal, Fevereiro de 2011; OIE, 2013).

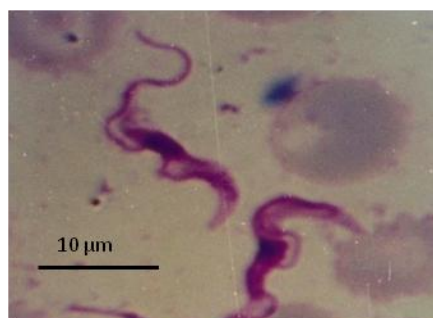
2.2. Surra ou “Mal de cadeiras”

A Surra, “Mal de cadeiras” ou “Peste Quebrabunda” é a doença resultante da infeção por *Trypanosoma evansi* (Figuras 50 e 51). Esta tripanossomose tem distribuição mundial sendo as áreas mais afetadas a América do Sul, a África, principalmente nas zonas não habitadas pelas moscas tsé-tsé, o Médio Oriente, a Índia, a região do Cáucaso e a Rússia (Silva *et al.*, 2002). Esta doença foi também diagnosticada nas Ilhas Canárias, onde se encontra perto da erradicação (Gutierrez, Desquesnes, Touratier & Buscher, 2010).

Figura 50 - *Trypanosoma evansi* em sangue de cão, que tinha viajado à Tailândia, corado por May-Grünwald Giemsa. Um pequeno cinetoplasto é evidente no polo posterior do parasita. (Adaptado de Defontis *et al.*, 2012)



Figura 51 - Tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* em sangue corado por Giemsa. Nestes parasitas não são evidenciados cinetoplastos. (Adaptado de El Sawalhy, 2004)



Os parasitas da espécie *T. evansi* podem infetar bovinos e bubalinos, camelídeos, cervídeos, pequenos ruminantes, suínos, equinos e asininos, carnívoros (canídeos, felídeos e viverrídeos), quirópteros, roedores e lagomorfos. (Silva *et al.*, 2002; Taylor & Authié, 2004) Estes parasitas são transmitidos mecanicamente (Figura 52), principalmente por artópodes dos géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Hematopota* e *Lyperosia* (Figura 53).

Na América Central e do Sul, o quiróptero *Desmodus rotundus* é considerado como vetor importante na transmissão da doença (Silva, *et al.*, 2002; Taylor & Authié, 2004; New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, 2009; World Organization for Animal Health, 2010). A transmissão iatrogénica deve também ser considerada, embora não seja amplamente discutida.

Figura 52 - Ciclo de vida de *T.evansi* e dos isolados de *T.vivax* americanos. (Fonte: Silva *et al.*, 2002)

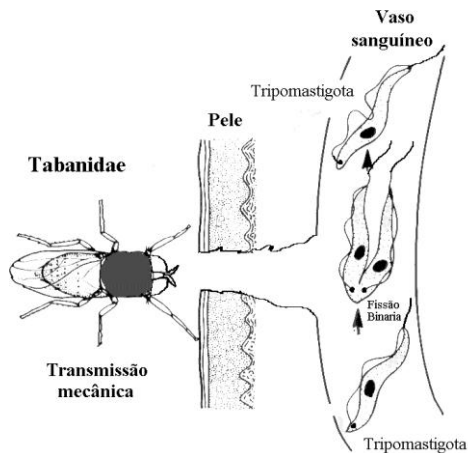


Figura 53 - Vetores de *Trypanosoma evansi*. Em cima, *Stomoxys calcitrans*. Em baixo *Tabanus* sp. (Adaptado de Texas A&M University, 2012)



Os sinais clínicos desta doença são semelhantes aos descritos para a TA, sendo os mais frequentes a febre, anemia e emaciação (Figura 54), seguindo-se de edemas nos membros e face e sintomas neurológicos, em que o mais comum é a paralisia caudocranial progressiva, que nomeia esta doença de “Mal-de-cadeiras”. Nos cães principalmente são notórias as repercussões oculares (Figura 55) (Silva *et al.*, 2002; Taylor & Authié, 2004).

Figura 54 - Dromedário emaciado com Surra. (Fonte: El Sawalhy, 2004)



Figura 55 - Uveíte anterior num cão com Surra. (Fonte: Defontis *et al.*, 2012)

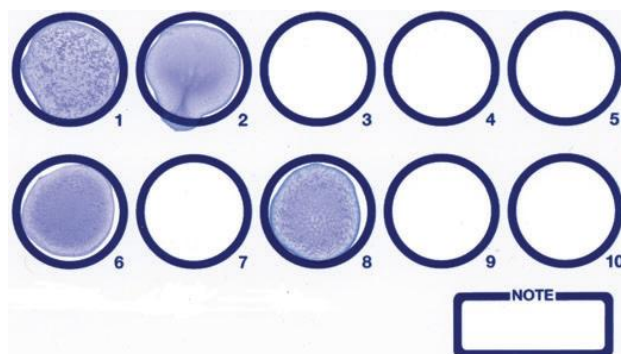


A causa da independência de vetores biológicos pensa-se ser a perda dos maxicírculos de kDNA, que inviabilizam a edição de mRNA necessária à diferenciação e adaptação deste ao hospedeiro invertebrado.

Esta espécie sofreu diversas adaptações, havendo isolados com morfologia normal, ou seja com cinetoplasto e núcleo na África e Ásia e discinetoplásticos, mantendo complexos de edição de mRNA funcionais, na América. Estas diferenças realçam a versatilidade e a independência de uma estrutura julgada essencial para o desenvolvimento e infecciosidade deste agente (Ventura, *et al.*, 2000; Domingo, *et al.*, 2003; Defontis, *et al.*, 2012).

O diagnóstico desta doença pode ser feito pelas técnicas acima citadas. É de realçar a variação da técnica CATT, o CATT/*T.evansi* (Figura 56), que foi testado com bons resultados em camelos no Quênia (Njiru, *et al.*, 2004).

Figura 56 - CATT/*T.evansi* realizado no cão cujo esfregaço foi apresentado na Figura 50. Os poços 1 e 2 correspondem ao controlo positivo e negativo, respetivamente, sendo que o poço 6 corresponde a uma aglutinação fraca em LCR, e o poço 8 a uma aglutinação forte em soro. (Fonte: Defontis *et al.*, 2012)



A terapêutica desta doença faz-se, quando necessária, com os fármacos atrás referidos para a *Nagana*, embora não sejam utilizadas a Pentamidina, a Eflornitina e o Nifurtimox (Silva *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2004).

2.3. Tripanossomose venérea ou Daurina

A Daurina é uma tripanossomose exclusiva dos equinos e asininos, causada pelo agente *T. equiperdum*. Esta espécie ainda rodeada de controvérsia em termos de filogenia (World Organization for Animal Health [OIE], 2009), é especialmente prevalente nos continentes africano, asiático, sul-americano e região oriental do europeu, levando a graves perdas económicas.

Esta doença transmite-se ao contrário das outras tripanossomoses, não por via vetorial, mas exclusivamente por via venérea e é de declaração obrigatória em Portugal desde 1953 pelo Decreto-Lei nº39 209.

A doença tem duas fases, uma aguda, de 1 a 2 meses e uma crónica com deterioração progressiva da condição corporal e das funções motoras. Estima-se que cerca de 50% dos animais sucumbam na fase aguda, e alguns sofram auto-cura tornando-se portadores. Os animais que evoluem para a cronicidade mantendo-se sintomáticos também acabam por morrer (OIE, 2009). Os sinais clínicos da daurina são apresentados em maior detalhe na Tabela 9.

Este parasita localiza-se preferencialmente nos fluídos genitais, capilares cutâneos e das mucosas, não sendo fácil a sua deteção em sangue periférico, excepto em situações de elevada parasitémia (Figura 57).

Figura 57 - Tripomastigotas de *Trypanosoma equiperdum* em sangue periférico corado por Giemsa. (Adaptado de Penn University, 2008)

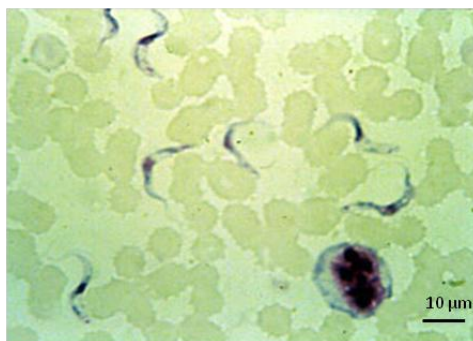


Tabela 9 - Sinais clínicos dos animais com daurina. (Adaptado de OIE, 2009)

Sinais sistêmicos	<ul style="list-style-type: none"> • Febre • Anemia • Emaciação • Linfadenomegalia dos linfonodos regionais e mesentéricos
Sinais reprodutivos	<ul style="list-style-type: none"> • Edema das regiões genitais (Figura 58) • Edema da glândula mamária • Hemorragias petéquiais das mucosas vaginovulvar e peniana • Infiltrações gelatinosas em todo o trato reprodutor feminino bem como no pênis, prepúcio e escroto dos machos • Testículos podem estar fibróticos e irreconhecíveis. • Descoloração das mucosas genitais
Sinais dermatológicos	<p>Lesões edematosas em placa (placas "Silver dollar"), de 5 a 8 cm de diâmetro com 1 cm de altura. Estas lesões têm localização preferencial no abdômen, torax e períneo e são patognomônicas, sendo que o aspirado destas pode evidenciar parasitas (Figura 59).</p>
Sinais neurológicos e motores	<ul style="list-style-type: none"> • Claudicação • Paralisia facial unilateral • Alterações posturais • Parésia e paralisia • Meningomielite lombo-sacral
Sinais oculares	<p>Queratoconjuntivite com blefarite</p>

Figura 58 - Vulva edemaciada com exsudado de uma égua infetada com *T. equiperdum*. (Fonte: Vulpiani, et al., 2013)



Figura 59 - Placas "silver dollar" patognomónicas da daurina. (Fonte: Vulpiani, et al., 2013)



O diagnóstico desta doença faz-se por deteção do parasita, corroborada com testes serológicos. O diagnóstico em sangue é muito difícil, podendo-se usar técnicas de concentração ou deteção molecular mencionadas anteriormente. O diagnóstico pode ser realizado ainda em leite e secreções vaginais, penianas e sémen.

A prova serológica de eleição é a fixação do complemento, contudo podem-se utilizar testes de ELISA, e IFI, bem como radioimunoensaio e imunodifusão.

A terapêutica não se aplica, sendo recomendada a occisão dos animais infetados (Taylor & Authié, 2004; OIE, 2009).

2.4. Tripanossomose Americana ou Doença de Chagas

A tripanossomose americana é uma doença provocada por parasitas da espécie *T. cruzi*, e afeta humanos, cães, gatos, roedores e carnívoros silvestres como gambás e guaxinins (Bowman, 2009). Ao contrário dos tripanossomas supracitados pertence à divisão Stercoraria, sendo que é transmitido pelas fezes do vetor (Lopes & Chapadeiro, 2004; Bowman, 2009).

A principal forma de transmissão desta doença é a vetorial sendo o parasita veiculado por reduvídeos dos géneros *Triatoma* (Figura 60), *Rhodnius* e *Panstrongylus*, estes também designados por triatomíneos (Bowman, 2009; Center for Food Safety and Public Health [CFSPH], 2009)

Figura 60 - *Triatoma protracta*, um exemplo de um reduvídeo vetor da Doença de Chagas. (Fonte: CDC, 2012)



O reduvídeo ao se alimentar de sangue no hospedeiro infetado, ingere formas tripomastigotas (Figura 61). Estas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio,

migrando para o intestino posterior onde se diferenciam em formas metacíclicas, que são excretadas nas fezes do artrópode. Estas fezes, quando depositadas em soluções de continuidade ou mucosas, vão permitir a migração das formas metacíclicas para o sangue, onde se diferenciam em tripomastigotas. Estas formas tripomastigotas invadem células do SRE, da neurógli e cardiomiócitos ou leiomíocitos, onde se diferenciam em amastigotas que se multiplicam formando pseudoquistos (Figura 62). Estes pseudoquistos ruturam-se libertando tripomastigotas para a corrente sanguínea (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 2010) (Figura 63).

Figura 61 - Tripomastigotas de *T. cruzi* em sangue periférico de cão, note-se a forma semilunar e o grande cinetoplasto subterminal (Wright). (Adaptado de Barr, 2006)

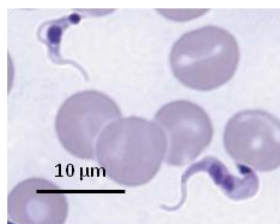


Figura 62 - Pseudoquisto de *T. cruzi* em músculo cardíaco de um cão (H&E). (Adaptado de Barr, 2006)

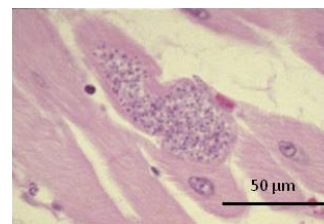
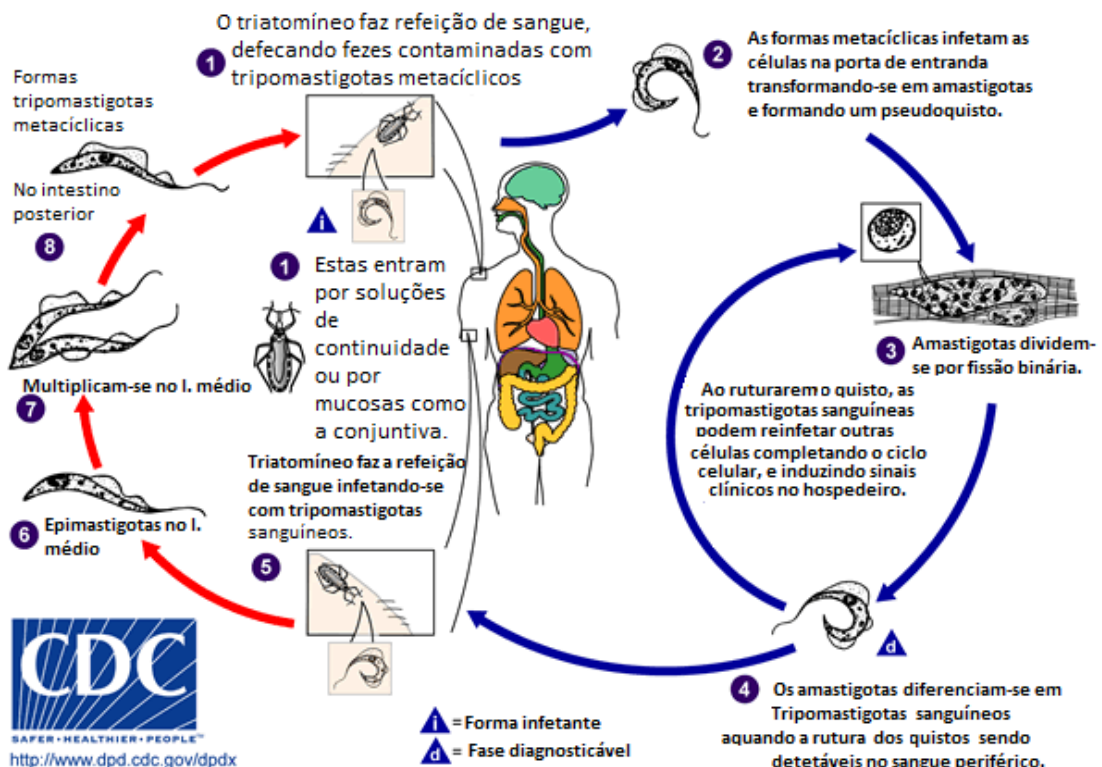


Figura 63 - Ciclo biológico do *T. cruzi*. (Adaptado de CDC, 2012)



Estão descritas ainda como vias de transmissão a via congénita, a transfusional e a oral (Miles, Yeo, & Gaunt, 2004).

Esta doença divide-se em duas fases: uma fase aguda, com sintomatologia inespecífica (Figura 64), que pode ser nos casos de crianças e indivíduos imunocomprometidos letal, e uma crónica, que pode exibir um quadro cardíaco, com miocardite e cardiomiopatia dilatada, ou digestivo, com o aparecimento de dilatações de vísceras cavitárias, nomeadamente megaesófago e megacólon.

Figura 64 - O sinal de *Romaña* ou Chagoma de inoculação, é um dos principais sinais precoces de infeção no ser humano (Fonte: CDC, 2012).



Os quadros clínicos são variáveis consoante a espécie do hospedeiro, a estirpe do parasita, e a própria resposta imunitária do hospedeiro. No caso dos seres humanos, mais de 50% dos indivíduos infetados não desenvolvem doença crónica aparente (Lopes & Chapadeiro, 2004). Na tabela 10 encontram-se sintetizadas as alterações clínicas observadas nos principais hospedeiros suscetíveis.

A principal causa das lesões inflamatórias evidenciadas nesta doença é a rutura dos pseudoquistos. A reação inflamatória resultante da destruição destas estruturas vai induzir inflamação, tanto focal como difusa, de intensidade diferente conforme a estirpe do parasita e a modulação da resposta imunitária do hospedeiro. Esta inflamação vai por fim provocar necrose e fibrose (exceto no caso da destruição da neurógli), dificultando, nos órgãos musculares a sua contractilidade. Assim, é perceptível o motivo pelo qual grande parte dos quadros clínicos são ou cardíacos, ou gastrointestinais.

No caso de destruição da neurógli, a própria inflamação vai causar a perda de função e morte do tecido nervoso, explicando os quadros de meningoencefalite, paralisia e convulsões (Lopes & Chapadeiro, 2004).

A evolução dos quadros cardíacos e neurológicos, culmina quase sempre em morte, por vezes súbita. Lopes e Chapadeiro (2004) em revisão bibliográfica apontam a possibilidade de auto-cura para os pacientes que entram em fase crónica inespecífica. Tal facto é de difícil comprovação visto que os critérios de cura para a doença de Chagas implicam não só a negatização do xenodiagnóstico, da cultura ou do PCR, como também a seroconversão dos pacientes, implicando ausência de estímulo antigénico. Esta seroconversão é muito tardia, pelo que esta hipótese necessitava, para ser comprovada de acompanhamento extensivo dos casos, quase sempre impraticável (Rassi & Luquetti, 2004).

Tabela 10 - Alterações clínicas decorrentes da tripanossomose americana por hospedeiro e fase da doença.

Hospedeiro	Fase Aguda	Fase Crônica	Fonte
Humano	<ul style="list-style-type: none"> • Chagoma de inoculação (Figura 64) • Febre • Linfadenomegália • Hepatoesplenomegália • Miocardite aguda¹ • Meningoencefalite aguda¹ 	<p>Miocardite crônica com:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infiltrados inflamatórios peri-vasculares, e miocárdicos focais como difusos • Aneurisma apical • Taquiarritmias com bloqueio do ramo direito do feixe de His • Dilatação das câmaras cardíacas <p>Dilatação de órgãos tubulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Megaesófago • Megacólon • Megajejuno² • Megabrônquio² • Megauretér² • Megavesico biliar² • Evidenciam-se lesões multifocais com infiltrados inflamatórios, com envolvimento dos plexos de Meissner e Auerbach. 	Tavira, 2002; Lopes e Chapadeiro, 2004
Cão	<ul style="list-style-type: none"> • Febre • Prostração • Anorexia • Hepatoesplenomegália • Perda de peso • Mau estado do pelo • Linfadenomegália • Ascite • Diarreia • Edema palpebral • Miocardite aguda¹ • Chagomas² 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiência cardíaca congestiva (ICC) direita • ICC global • Taquiarritmias • Dilatação das câmaras cardíacas • Quadros atípicos <ul style="list-style-type: none"> ○ Córiorretinite ○ Paralisia com atrofia muscular ○ Disfagia por perda do reflexo de deglutição ○ Enoftalmia bilateral ○ Coma 	Bowman, 2009; CFSPH, 2009
Gato	Febre, edemas e perda de peso ³	Paralisia e convulsões ³	Bowman et al., 2001; CFSPH, 2009
Roedores	Assintomático	Miocardite com arritmias em ratos Aborto, baixo peso ao nascimento, morte perinatal, e infertilidade em murganhos	CFSPH, 2009

1 - Pouco frequente (revelando uma evolução hiperaguda de mau prognóstico)

2 - Raro

3 - Muito Raro (apenas reportado um caso de doença clínica nesta espécie)

O diagnóstico desta doença pode ser feito por detecção do parasita, nomeadamente por:

- 1) Visualização direta, após técnica de concentração como uma centrifugação em tubo de microhematócrito;
- 2) Xenodiagnóstico, por observação de fezes de Triatomíneo, 8-30 dias após refeição de sangue do paciente;
- 3) Hemocultura.

Esta necessidade de métodos de concentração e cultura deve-se ao facto do parasita não se reproduzir na fase extracelular, sendo a parasitémia baixa e inconstante. As técnicas serológicas são outro valioso instrumento diagnóstico, não podendo contudo excluir o uso das técnicas de detecção do parasita. Uma das razões para este facto é a existência de reações cruzadas com *Leishmania*, muito preocupantes no caso dos cães. Estas técnicas devem ser sempre utilizadas em série entre si, primeiro como teste de rastreio e posteriormente outra técnica com princípio diferente como teste de confirmação. As técnicas utilizadas podem ser hemaglutinação, ELISA, imunocromatografia, *Western blott* e IFI, sendo esta última o *gold standart* para confirmar positividade nas demais (Rassi & Luquetti, 2004; CFSPH, 2009).

Com o advento da PCR, esta técnica tem vindo a ser utilizada para detecção rápida e sensível do parasita, contudo, dada a falta de dados existentes desta técnica em diagnóstico da infeção, os métodos de cultura continuam a ser preferidos (Rassi & Luquetti, 2004).

A terapêutica desta doença é feita recorrendo a dois fármacos, o Nifurtimox (NFX), acima apresentado, e o Benznidazol (BNZ).

Os protocolos terapêuticos são longos e o risco de toxicidade é elevado para ambos os fármacos, como foi descrito para o nifurtimox na secção 2.1.6. Infelizmente a monitorização do sucesso terapêutico baseia-se nos critérios anteriormente citados, sendo que a cura parasitológica tem de ser confirmada pelo resultado negativo de pelo menos dois testes seguidos durante um período de *follow-up* longo de 5 a 10 anos, dependendo do autor. Para satisfazer os critérios de cura deve haver seroconversão, contudo esta pode levar até 20 anos após o fim da terapêutica, tornando extremamente difícil o seguimento de casos.

Estas dificuldades levam ao surgimento de taxas de sucesso terapêutico muito variáveis entre diferentes autores englobando ambas as fases da doença com seguimento variável, sendo 25-88% xenodiagnóstico negativo com NFX e 8-95% com BNZ. A cura da fase crónica tende a ter menor sucesso do que a da fase aguda. Na fase crónica mais tardia, mesmo com cura, muitos sinais clínicos podem persistir como sequelas (Rassi & Luquetti, 2004).

O benznidazol (Figuras 65 e 66) é um antichagásico da família dos nitroimidazóis, amplamente usado contra a tripanossomose americana, sendo atualmente o fármaco de primeira linha contra esta doença (Workman, White, Walton, Owen & Twentyman, 1985; Maya *et al.*, 2007).

Figura 65 - Estrutura da molécula de Benznidazol. (Adaptado de ELEA, 2013)

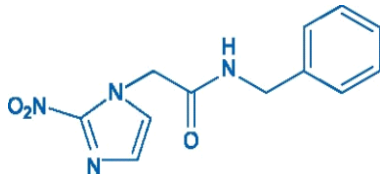


Figura 66 - Abarax, a apresentação comercial do Benznidazol. (Adaptado de ELEA, 2013)



Os seus mecanismos de ação não são bem esclarecidos sendo propostos três mecanismos diferentes. O mecanismo principal é a produção de espécies reativas de azoto, pela redução do grupo nitro pelas enzimas nitroreduases, criando-se ligações covalentes com macromoléculas que as inativam. Outro mecanismo de ação é inibição da NADH-fumarato redutase de *T.cruzi*, interferindo com o metabolismo deste. O terceiro mecanismo, e mais indireto, é a imunomodulação, estimulando uma resposta Th1, por libertação de IFN- γ . Este fármaco não inibe, contudo, a expressão de certas citocinas Th2, como a IL-4 e a IL-10, propiciando um equilíbrio entre resposta pró-inflamatória celular, essencial para a destruição do parasita, e estímulo pró-regenerativo, impedindo a exacerbação do dano tissular resultante da inflamação. O BNZ inibe a expansão de células CD4+ e CD8+ recém-ativadas, estimulando a replicação de células CD8+ efetoras e de memória, aumentando a resistência a reinfeções (Workman *et al.*, 1985; Olivieri, Cotta-de-Almeida & Araújo-Jorge, 2002; Rassi & Luquetti, 2004; Sathler-Avelar, *et al.*, 2006; Maya, *et al.*, 2007).

Este fármaco é lipossolúvel mantendo uma grande ligação às proteínas plasmáticas, atravessando facilmente a barreira hemato-encefálica e apenas 5% deste fármaco é excretado em natureza na urina, sendo intensamente metabolizado a nível hepático (Workman *et al.*, 1985).

A toxicidade do BNZ é elevada. As principais reações adversas são dermatia alérgica que não responde a anti-histamínicos, neuropatia periférica que não responde com a administração de vitamina B1, leucopenia com neutropenia e aumento do risco de linfoma maligno, sendo que este último efeito secundário é controverso, tendo sido verificado em coelhos apenas num estudo, mas nunca em humanos.

As doses recomendadas são de 2,5-3,5 mg/kg BID para adultos e 5 mg/kg BID para crianças durante 60 dias (Rassi & Luquetti, 2004).

A tripanossomose americana é uma preocupação para a saúde pública, especialmente nos Estados Unidos da América, visto que os casos diagnosticados em animais têm vindo a aumentar, revelando um potencial para o aumento do reservatório silvático e doméstico, e um risco acrescido de transmissão vetorial entre animais de companhia e respetivos proprietários, bem como de transmissão acidental para o médico veterinário (CFSPH, 2009).

3. Tripanossomoses dos Animais Ectotérmicos

Pouco se sabe sobre a doença resultante da infecção por parasitas do gênero *Trypanosoma* em cordados ectotérmicos (Répteis, Batráquios e Peixes). Existem relatos de doença aguda causada por *T. theezieni*, parasita natural de camaleões da espécie *Camaleo brevicornis*, quando este protozoário infeta outras espécies do gênero *Camaleo*, como *C.parsoni*, *C.verrucosus* e *C.lateralis*, culminando a doença em morte 25-35 dias após a infecção nas duas primeiras espécies e 11-18 dias em *C.lateralis*. Nesta última espécie são detetados elevados níveis de parasitemia composta por formas epimastigotas do parasita, sendo que no hospedeiro definitivo *C.brevicornis* são apenas detetadas tripomastigotas no sangue (Telford, 2009).

Verifica-se também a existência de relatos de tripanossomose em peixes. Cita-se um estudo realizado por Humphrey, Benedict e Small (2010) numa população de percas-gigantes (*Lates calcarifer*) mantidas em jaulas ao largo da costa norte da Austrália (Port Hurd) entre Julho e Agosto de 2005. Neste estudo os autores verificaram um aumento anormal da mortalidade num coorte da população. Os animais mortos apresentavam úlceras cutâneas que expunham a musculatura, exoftalmia com hemorragia do globo ocular e esplenomegalia. O estudo destas lesões e dos esfregaços de sangue central e periférico bem como da histopatologia do globo ocular revelaram uma elevada carga parasitária composta por tripomastigotas de *Trypanosoma* sp..

Foram ainda estudados outros coortes no estudo supracitado, em que os animais estavam infetados com *Trypanosoma* sp., contudo sem evidência de doença. A infecção foi associada ao parasitismo por copépodes, implicados como vetores, e em certos casos por infecção concomitante por *Vibrio harveyi*. Os autores relacionaram, por dados existentes de tripanossomose noutras espécies de peixes, que a descida da temperatura, neste caso, terá sido o fator mais importante no aparecimento de doença (Humphrey *et al.*, 2010).

Outro exemplo de doença provocada por tripanossomas é a que afeta *Carassius auratus*, o pimpão, quando infetado por *Trypanosoma danilewskyi* proveniente de *Cyprinus carpio*, a carpa comum. Quando infetado, o pimpão mantém uma infecção apatogénica, exceto quando é submetido a fatores causadores de stress, como variação brusca de temperatura ou competição por alimento.

Quando se manifesta tripanossomose aguda nestes animais as mortalidades chegam a atingir 80%, em infecções experimentais, existindo cura espontânea dos sobreviventes, em média, aos 48 dias pós-infecção (Gupta & Gupta, 2012).

Gupta e Gupta (2012) descrevem eritropénia em 3 espécies de peixes de água doce, *Clarias batrachus*, *Channa punctatus* e *Wallago attu* infetados experimentalmente com *T. batrachi*, *T. aligaricus* e *T. attii*, respetivamente. Os decréscimos na contagem total de eritrócitos são

da ordem dos 28,46%, 33,19% e 31,85% respetivamente. Os eritrócitos apresentavam vacuolização, cariólise e lise celular. Os autores postulam que a razão para este decréscimo e para as alterações morfológicas verificadas nos eritrócitos se deve a mecanismos de inibição da hematopoiese desencadeados pelo parasita. Aliás, De Sousa *et al.* (2011) descrevem mecanismos de ativação de citocinas, como o fator de necrose tumoral TNF α e IFN- γ , na TA que podem por si justificar uma redução da eritropoiese.

Como vetores de tripanossomas de animais aquáticos estão implicados artrópodes hematófagos, tanto do género *Glossina*, as moscas tsé-tsé, como pulgas e tabanídeos (Telford, 2009), sanguessugas (Gupta & Gupta, 2012), e até copépodes parasitas das brânquias dos peixes (Humphrey *et al.*, 2010).

Os exemplos citados anteriormente realçam a importância da co-evolução e especificidade da relação hospedeiro-parasita, a importância dos fatores ambientais do desenvolvimento de doença e revelam a necessidade de mais estudos, podendo ser obtida informação útil principalmente relativa aos casos de morte de causa desconhecida em aquacultura, coleções zoológicas e em novos animais de companhia.

4. Tripanossomose em aves

A tripanossomose nas aves é ainda mais vaga que a das espécies ectotérmicas. A infeção por tripanossomas está comprovada nestes animais, e são encontrados parasitas em aves por todo o mundo, inclusive na Península Ibérica (Viana, 2010).

Os principais implicados no papel de vetor são artrópodes hematófagos como os Culicídeos, Simulídeos, Hipoboscídeos, Culicídeos e Aracnídeos (carraças e ácaros) (Dirie *et al.*, 1990; Durden *et al.*, 1997; Votýpka *et al.*, 2002; Votýpka & Svobodová, 2004; Viana, 2010; Zídková *et al.*, 2011).

As infeções nestas espécies são inaparentes, com parasitémias fugazes e sem alterações fisiopatológicas dignas de registo. A alteração fisiopatológica mais típica da infeção aguda, obtida em infeções experimentais é a esplenomegália, com aumento diferenciado dos centros germinativos na polpa branca do parênquima esplénico (Minter-Goedbloed, 1981; Molyneux, Cooper, & Smith, 1983; Joshua, 1983).

Existem relatos de miocardite nas infeções experimentais com *T. cruzi* em galinhas (*Gallus domesticus*), quando esta se dá *in ovo*.

O mecanismo fisiopatológico para estas alterações aparenta ser uma integração de DNA do cinetoplasto (kDNA) no genoma dos pintos, que ao exprimirem epítomos *não-self* sofrem uma resposta autoimune celular timo-dependente, onde as principais células implicadas são Linfócitos T CD45+, CD8 α + e CD8 γ δ+ (Teixeira, *et al.*, 2011).

5. O Murganho (*Mus musculus*) como modelo para Tripanossomose Africana

A TA murina tem sido amplamente estudada como modelo para a THA e para a TAA (Pentreath & Kennedy, 2004; Taylor & Authié, 2004).

Os sinais clínicos nestes animais tendem a não ser tão detetáveis, pelo seu pequeno tamanho que dificulta a exploração semiológica. Estes resumem-se a anemia, hepatoesplenomegália com dilatação abdominal, prostração, blefarite, convulsões tónico-clónicas ou flácidas, dificuldades de coagulação e coma.

Mus musculus, como animal de experimentação tem diversas vantagens, sendo um animal pouco dispendioso e de fácil manutenção, altamente prolífico possibilitando a seleção linhagens ou estirpes extremamente bem caracterizadas, podendo mesmo ser isogénicas, com indivíduos teoricamente iguais entre si, e com um ciclo de vida curto, permitindo uma obtenção rápida de resultados (Taylor & Authié, 2004; Sirois, 2005).

A caracterização das estirpes dos animais permite a seleção de cinéticas diferentes de infeção por *T.brucei brucei*, podendo ser selecionada uma doença de progressão aguda, usando uma estirpe mais sensível como a isogénica BALB-C, ou uma doença de progressão crónica, usando a estirpe isogénica C57Bl/6 ou a poligénica CD-1 (De Sousa *et al.*, 2011). As estirpes isogénicas têm como vantagem a menor variabilidade de resultados, sendo que com menos animais verifica-se maior reprodutibilidade.

Este modelo tem desvantagens, principalmente quando os animais são infetados pela via intraperitoneal, sendo a mais importante a exacerbação da resposta imunitária, com imunossupressão intensa e maiores picos de parasitémia, comparando com infeções naturais.

Outra desvantagem importante é a impossibilidade de estabelecer uma infeção padronizada por via intradérmica, sendo que a injeção intraperitoneal vai desencadear um quadro mais agudo da doença, com parasitémia precoce e onde a imunidade cutânea não intervêm, o que não acontece nas infeções naturais.

A última desvantagem deste modelo é a dificuldade de estabelecer infeções com certos isolados de *T. vivax* ou *T. brucei gambiense* existindo necessidade de várias passagens em animais imunodeprimidos (por esplenectomia ou administração de corticosteroides em doses imunossupressoras) para que se estabeleça infeção (Taylor & Authié, 2004).

Apesar das desvantagens, o modelo murino é um ótimo modelo para investigação inicial em TA, sendo que as fases mais avançadas do trabalho experimental devem ser realizadas noutro modelo, que poderá ser o ruminante, para os estudos de TAA ou o primata para os estudos de THA.

Parte III – Infecção experimental por
Trypanosoma brucei brucei em
modelo murino e estudo da eficácia
farmacológica do Benznidazol

1. Enquadramento

A TA é uma doença negligenciada que afeta 70 milhões de pessoas no continente africano, por risco de doença humana ou por prejuízos decorrentes da doença animal (Simarro *et al.*, 2008).

A inexistência de vacinas eficazes e de fármacos menos tóxicos e mais eficazes é preocupante, tendo sido licenciado nos últimos dezoito anos apenas um novo fármaco, a Eflornitina (Barrett *et al.*, 2007; Bouteille & Buguet, 2012).

Por esse motivo, foi testada a eficácia farmacológica do BNZ, sendo este da mesma família que o Fexinidazole, tendo eficácia comprovada contra *T. cruzi* e estando de momento a ser estudados mecanismos para melhorar a sua biodisponibilidade e diminuir a sua toxicidade.

Outra preocupação do autor foi a existência de relatos de transmissão oral não só no caso da tripanossomose americana, mas também na TA. Esta via de infeção pode ser muito problemática relativamente aos animais carnívoros, como cães e gatos, ambos hospedeiros suscetíveis à infeção por *T. brucei* e *T. cruzi* (Laveran & Mesnil, 1912; Moloo *et al.*, 1973; Bowman *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2004; CFSPH, 2009).

Todos os procedimentos de experimentação animais foram autorizados pela DGAV e realizados de acordo com as metodologias recomendadas pelo conselho de ética do IHMT-UNL.

2. Objetivos

O trabalho experimental seguidamente apresentado é dividido em duas partes: a determinação da eficácia farmacológica do BNZ e a determinação da capacidade e dose infetante de *T. b. brucei* por via oral.

A primeira parte é composta por dois ensaios que tiveram como objetivo primário a determinação da eficácia do BNZ como quimioterápico na infeção experimental de murganhos com *T. b. brucei*. Assim, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Determinação da carga parasitária, ganho médio diário e sobrevivência dos animais infetados com *T. b. brucei* e tratados com BNZ.
- Caracterização da resposta imunitária dos animais infetados com *T. b. brucei* e tratados com BNZ.
- Caracterização das alterações hematológicas decorrentes da infeção, em dos animais infetados com *T. b. brucei* e tratados com BNZ.

A segunda parte consistiu num ensaio onde foi testado o possível estabelecimento de infeção por via oral no mesmo modelo animal com os mesmos parasitas. Foi ainda delineado o seguinte objetivo específico:

- Determinação da capacidade infetante da administração de *T. b. brucei* por via oral.

3. Material e Métodos

3.1. Animais utilizados

Para estes trabalhos foram utilizados 25 murganhos (*Mus musculus*) BALB-C e 37 murganhos CD-1, com idades entre 5 a 8 semanas. Os animais foram produzidos e mantidos nas instalações do biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em Lisboa. Estes foram repartidos pelos três ensaios realizados no âmbito deste trabalho, estando a sua distribuição apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição dos animais pelos ensaios realizados no decorrer do trabalho experimental.

Ensaio	Número de animais	Número de grupos	Estirpe
Infeção por via oral	5	2 (3+2)	BALB-C
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	20	2	BALB-C
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	24	2	CD-1
Outros (Preparação de doses infetantes, estabilato e extrato para ELISA e testemunhas)	13	Não aplicável	CD-1

Após a distribuição dos animais por ensaios e grupos, estes eram marcados com uma solução de cromato de potássio, usando marcação individual ou de grupo, quando aplicável (Figuras 67 e 68).

Figura 67 - Diagrama da marcação de grupo utilizada, sendo que um grupo, o Grupo 1 tem a marcação na zona cervical, enquanto o Grupo 2 está marcado na região sagrada. Esta marcação aplica-se quando os animais de ambos os grupos se encontram alojados na mesma caixa.

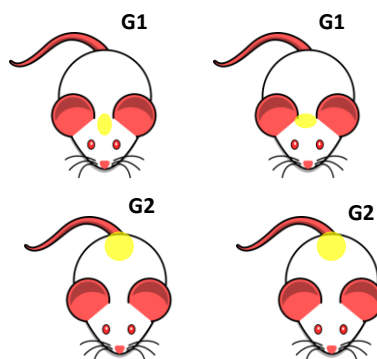
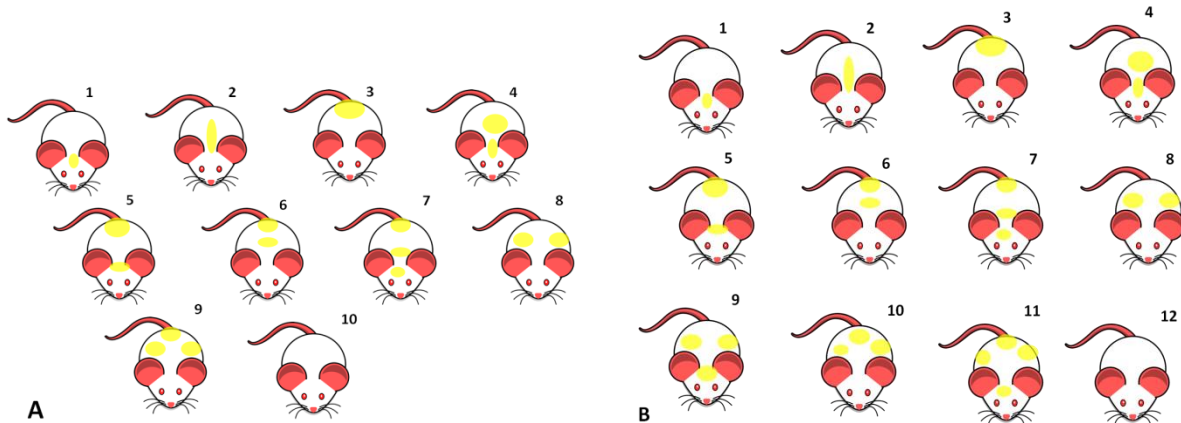
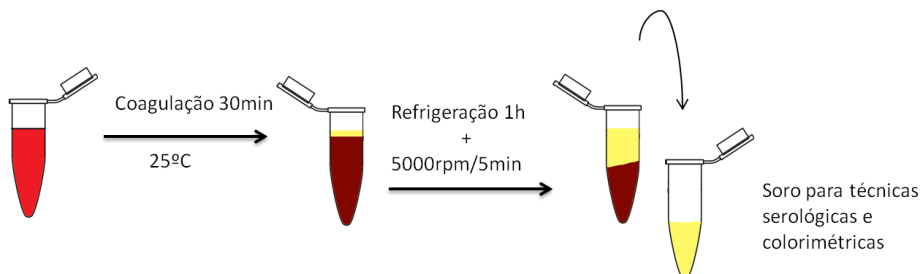


Figura 68 - Diagrama das marcações individuais de murganhos. Estas marcações são aplicáveis quando cada grupo fica alojado em caixas diferentes. A escala A aplica-se a grupos de até 10 animais por grupo e a escala B a grupos de até 12 animais por grupo.



Os animais que não integravam grupos onde foi realizado ensaio de sobrevivência, após o período experimental eram sacrificados por sobredosagem anestésica. Foi-lhes colhido sangue por cardiocentese de onde foi obtido sangue heparinizado (quando aplicável) e soro. O soro era obtido com recurso a centrifugação após coagulação à temperatura ambiente durante 30 minutos, refrigeração a 4°C durante uma hora e centrifugação a 5000rpm durante 5 minutos na centrífuga Hemle Z323K (Citomed®) (Figura 69).

Figura 69 - Diagrama da técnica utilizada para obtenção de soro.



Aos animais que estavam integrados em grupos onde se estudou a sobrevivência o sangue para avaliação da parasitemia era colhido por corte de cauda, não se procedendo ao sacrifício destes.

3.2. Parasitas utilizados e via de infecção

Dois estabilatos de *T. b. brucei* foram utilizados: *T. b. brucei* GVR 35/1,5 e GVR35/1,6, derivados de um isolado de um ruminante selvagem do Serengetti em 1966, criopreservados nas instalações do Centro de Malária e Doenças Tropicais (CMDT) do IHMT-UNL.

Estes parasitas foram inoculados por duas vias, dependendo do ensaio onde foram utilizados: via intraperitoneal (IP) (Figura 70) e via oral (VO). Os estabilatos e as vias de infecção utilizadas por cada ensaio encontram-se resumidos na Tabela 12.

Figura 70 - Injeção via IP num murganho. (Fonte: Sirois, 2005)



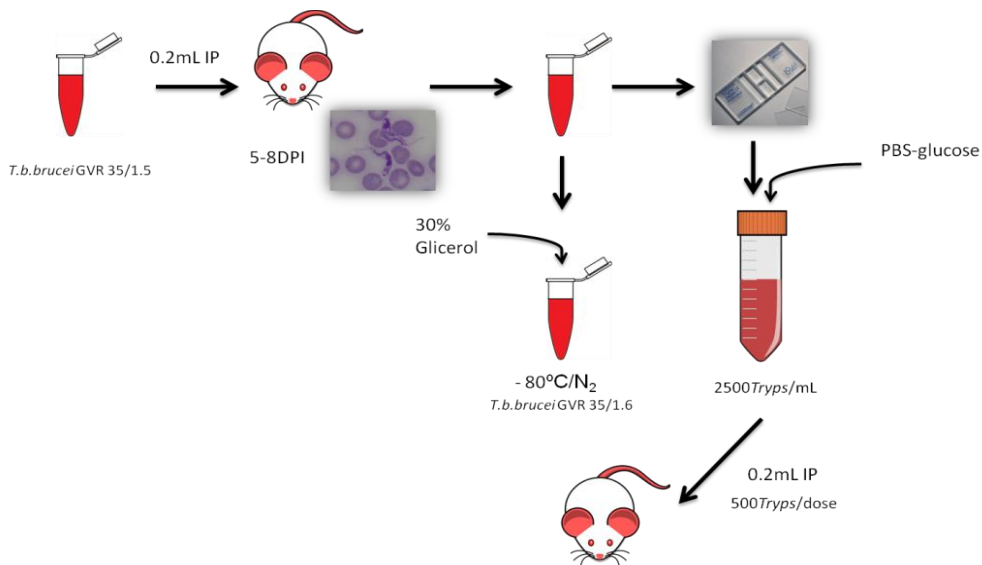
Tabela 12 - Resumo da distribuição dos parasitas utilizados por cada ensaio bem como a via de infecção utilizada.

Ensaio	Estabilato	Doses	Via de administração
Infeção por via oral	<i>T. b. brucei</i> GVR 35/1,5	500 parasitas/ animal no Grupo 1 200.000 parasitas/ animal no Grupo 2	VO
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	<i>T. b. brucei</i> GVR 35/1,5	500 parasitas/ animal	IP
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	<i>T. b. brucei</i> GVR 35/1,6	500 parasitas/ animal	IP

Para a preparação das doses infetantes e dos estabilatos foi necessário efetuar uma passagem de parasitas criopreservados por animais saudáveis, esta por via IP. Ao primeiro pico de parasitemia, foi colhido sangue por corte da cauda aos animais infetados para preparar doses infetantes em suspensão de PBS-Glucose (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 20% d-C₆H₁₂O₆ (v/v), pH 7,4) e estabilato para criopreservação em 30% de glicerol estéril. A suspensão foi então quantificada com recurso a uma câmara de Neubauer e diluída de forma a termos doses de 500 parasitas em 200µL. Foram ainda preparadas duas doses de 2x10⁵ parasitas em 200µL apenas para administração VO (Figura 71).

A infecção foi feita com o recurso a uma seringa de insulina (1mL-100 UI) e uma agulha de 25 gauge, no caso das infeções por via IP, ou uma seringa do mesmo volume acoplada a uma sonda esofágica, de gavagem no caso das infeções VO

Figura 71 - Processamento dos parasitas nas infecções experimentais.



Para a preparação de extrato de parasita total para ELISA, foi necessário o sacrifício dos animais no primeiro pico de parasitemia e colheita de sangue por cardiocentese. Este sangue era heparinizado com 10µL de heparina sódica e os parasitas separados das células do sangue por uma cromatografia de permuta aniônica. Esta cromatografia era realizada com recurso a uma coluna de DEAE-*Sepharose* (Sigma-EUA).

O volume de sangue heparinizado era então eluído com PBS-glucose, sendo retiradas alíquotas até à visualização direta dos parasitas por microscopia ótica usando uma ampliação de 400x.

As alíquotas com parasitas que não se encontravam contaminadas com sangue eram então centrifugadas e lavadas com PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,4) três vezes. A proteína do extrato era quantificado pela técnica de Bradford modificada (Pierce® BCA protein assay kit) e conservado a -20°C (Figuras 72 e 73)

Figura 72 - Diagrama da técnica de purificação dos parasitas por cromatografia de permuta aniônica.

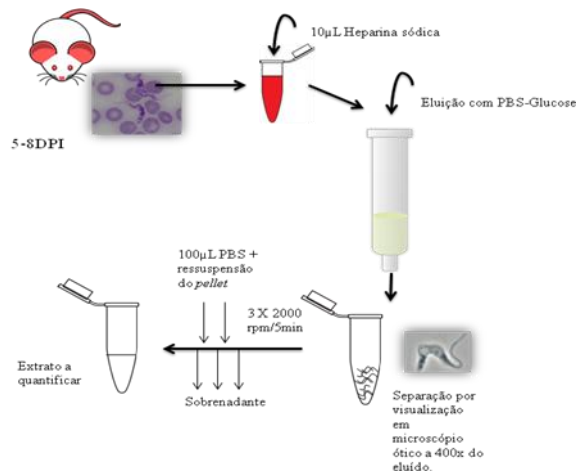
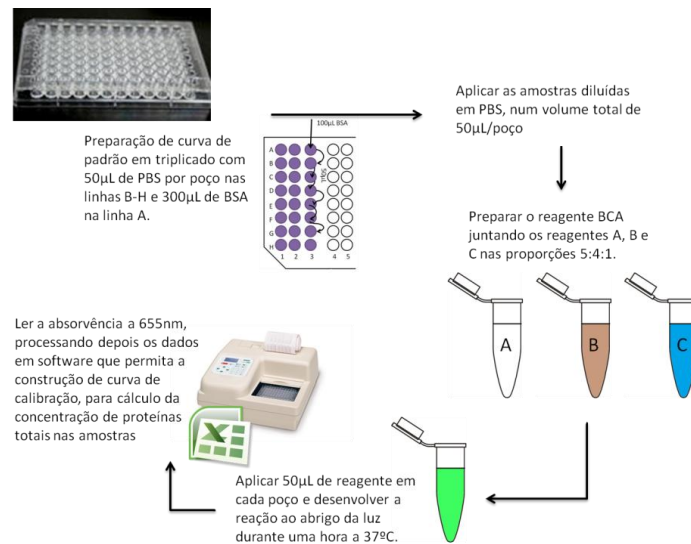


Figura 73 - Diagrama da técnica de Bradford modificada para quantificação de proteínas.



3.3. Tratamento com BNZ

A formulação de BNZ utilizada nos ensaios de eficácia farmacológica foi Abarax[®] 50mg sob a forma de comprimidos gentilmente cedidos pela farmacêutica ELEA-Argentina.

Este medicamento foi administrado via oral, suspenso em PBS e armazenado a 4°C, apenas a um grupo por ensaio, sendo o grupo controlo apenas medicado com PBS via oral. As administrações foram feitas com recurso a uma seringa de insulina (1mL-100 UI) acoplada a uma sonda esofágica.

Foram realizados dois protocolos com dosagens e duração diferente, em dois ensaios distintos. A dose utilizada foi a dose pediátrica humana (10mg/kg SID), calculada para a média de peso inicial dos animais medicados, num volume final de 0,1 mililitros. A duração da terapêutica foi cinco dias num protocolo e onze dias noutra.

Os critérios para início e fim do protocolo terapêutico diferem entre ensaios de eficácia farmacológica, e bem como as doses utilizadas e a duração da terapêutica por cada ensaio encontram-se apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resumo das doses de BNZ, duração da terapêutica e critérios de início e fim dos protocolos terapêuticos em cada ensaio de eficácia farmacológica.

Ensaio	Dose	Duração da terapêutica	Crítérios de início/ fim da terapêutica.
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	25µg por animal SID	5 dias (7-12 DPI)	Início: 80% da população positiva à técnica de visualização direta do parasita. Fim: 5 dias após o início
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	40µg por animal SID	11 dias (12-23 DPI)	Início: 100% da população positiva à técnica de visualização direta do parasita. Fim: morte natural do primeiro animal.

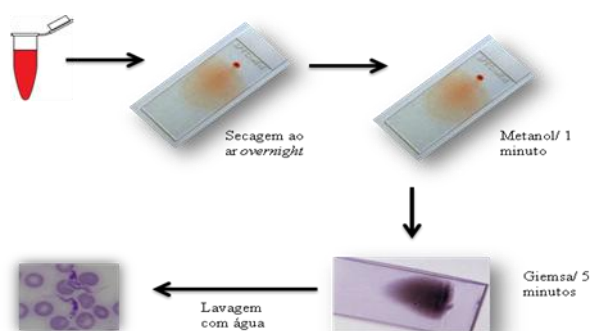
3.4. Avaliação da infecção

3.4.1. Pesagem, parasitemia e sobrevivência

A pesagem dos animais foi realizada nos ensaios de eficácia farmacológica em intervalos regulares. Foi utilizada uma balança digital com medição à grama ($d=1g$), com recipiente tarado, sendo a calibração da balança repetida a cada três animais.

A detecção da parasitemia foi realizada por esfregaços de sangue sucessivos corados pela técnica de Giemsa, que consistia na secagem das lâminas ao ar, seguida de uma fixação por metanol durante um minuto e coloração posterior com corante de Giemsa (Eosin-azur dye according to Giemsa, Panreac®) durante cinco minutos (Figura 74). O sangue para estes esfregaços era colhido por corte de cauda, que não requeria o sacrifício dos animais.

Figura 74 - Diagrama do protocolo para a técnica de coloração segundo Giemsa.



Destes esfregaços foram visualizados vinte campos aleatórios na ampliação de 400x, compreendendo tanto a zona de monocamada como a zona mais concentrada, para detecção. Para quantificação da parasitêmia foi utilizada uma escala semi-quantitativa utilizada por Jones *et al.* (2011), adaptada ao esfregaço corado. A quantificação foi feita em dez campos na ampliação de 400x após a detecção e a cada positivo na escala foi atribuído uma unidade, a cada positivo fraco meia unidade. O resultado final foi a média aritmética dos valores dos dez campos em que se fez a quantificação (Figura 75).

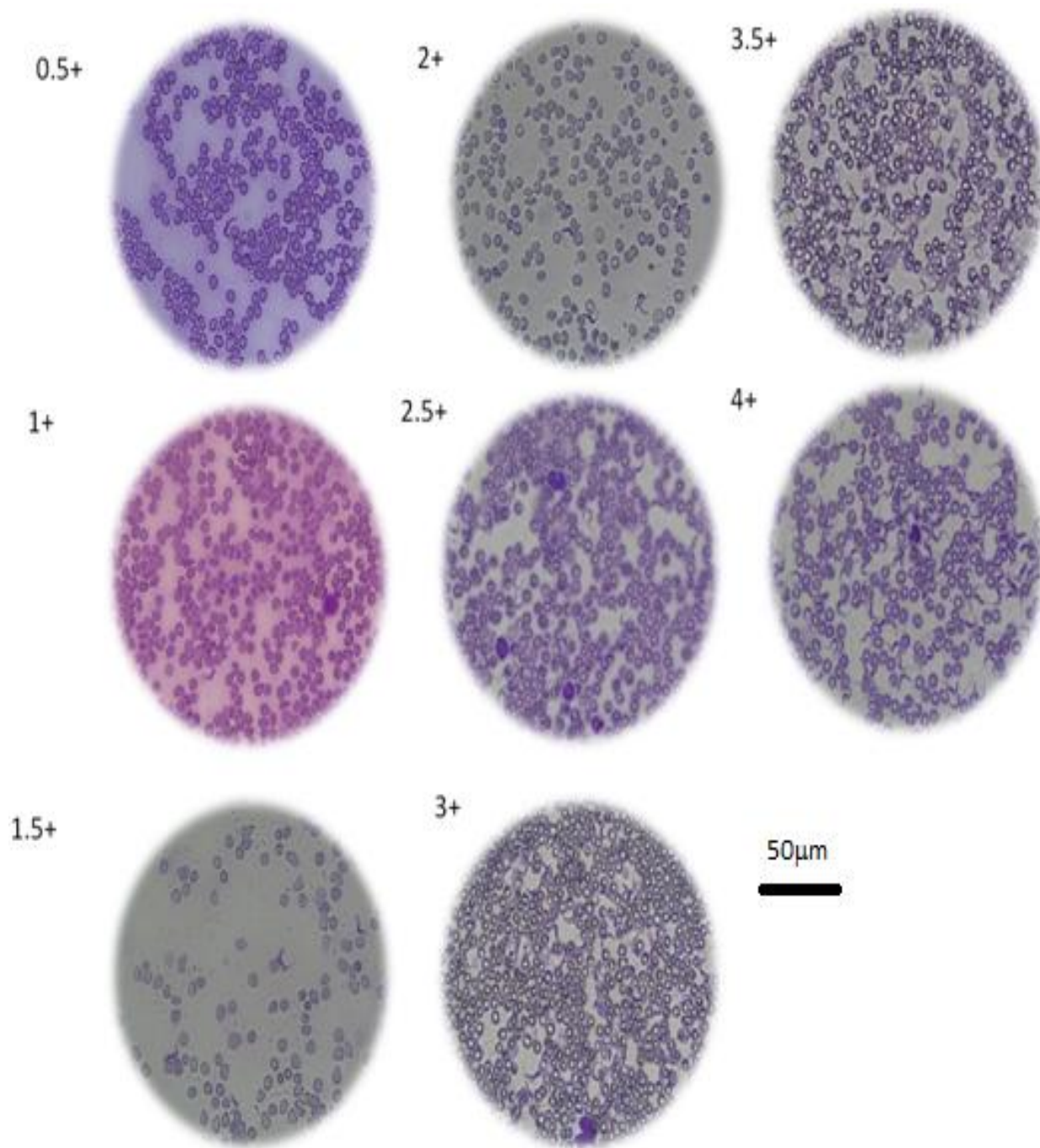
Nos ensaios de eficácia farmacológica foi também avaliada a sobrevivência dos animais. A sobrevivência foi avaliada na totalidade dos animais em estudo no ensaio de eficácia farmacológica do protocolo terapêutico de curta duração, e num subgrupo da população no protocolo longo. Esta avaliação iniciava-se após a morte natural do primeiro animal e terminava após a morte natural do último animal. Com o registo de cada morte foram elaboradas curvas de sobrevivência, submetidas a análise estatística, esta detalhada em maior pormenor seguidamente.

A realização e a periodicidade de cada medição anteriormente citada variavam de ensaio para ensaio encontrando-se resumidos na Tabela 14.

Tabela 14 - Resumo das medições de peso, parasitêmia e sobrevivência efetuadas nos três ensaios que compõem o trabalho experimental.

Ensaio	Peso	Parasitêmia	Sobrevivência
Infeção por via oral	Não foi avaliado	Sangue colhido no dia de infeção bem como nos dias 5, 9, 22, 29, 43, 50 e 57 após a infeção.	Não foi avaliada
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	Avaliado nos dias 5, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 20 e 22 pós-infeção.	Sangue colhido no dia de infeção bem como nos dias 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 20, 22, 27 e 29 pós-infeção.	Avaliada em toda a população
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	Avaliado em três animais no dia da infeção, bem como no 14º e 26º DPI, a seis animais de cada grupo no 12º, 16º, 19º, 21º e 23ºDPI e a toda a população no 6ºDPI.	Sangue colhido a 3 animais sacrificados no dia de infeção bem como no 14º e 26º DPI. Foi ainda efetuada colheita de sangue pela cauda a toda a população no 6º DPI, e a seis animais de cada grupo no 12º, 16º, 19º, 21º e 23ºDPI.	Avaliada em metade da população de cada grupo.

Figura 75 - Escala semiquantitativa adaptada da utilizada por Jones *et al.* (2011), para um esfregaço ampliado a 40 (Imagem do autor).



1 *Trypanossoma* p/2 campos = 0.5+
1-2/Campo = 1+
3-6/Campo= 1,5+
7-15/Campo= 2+

3.4.2. Titulação de Anticorpos anti-*T. b. brucei*

Nos ensaios de infecção por via oral e de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo longo foram titulados anticorpos anti-*T. b. brucei*. No primeiro ensaio foi apenas titulada IgG total anti-*T. b. brucei* a todos os animais no fim do período experimental, enquanto que no segundo foram tituladas para além de IgG total, subclasses de IgG (IgG1, IgG2a e IgG3) e IgM anti-*T. b. brucei* a três animais de cada grupo no 14^o e 26^oDPI e a três animais saudáveis.

A titulação de anticorpos anti-*T. b. brucei* foi feita com recurso a uma técnica de ELISA Antígeno-Anticorpo, em que o anticorpo anti-espécie era conjugado com peroxidase.

O antígeno utilizado era extrato completo de *Trypanosoma brucei brucei*, obtido por purificação dos parasitas recorrendo a uma cromatografia de troca aniónica citada em 3.2.

Este extrato era então adsorvido à microplaca de 96 poços (BD Falcon[®]) com recurso a uma solução-tampão de bicarbonato (0,1M, pH=8,5), a uma concentração de 200ng/poço em 100µL de volume *overnight* a 4°C. As placas eram de seguida lavadas com solução de PBS-Tween 20 0,05% (Sigma[®]) e bloqueadas com 200µL por poço de uma solução de PBS-BSA 1% (Sigma[®]) durante uma hora à temperatura ambiente.

Após outro ciclo de lavagens as amostras eram diluídas com uma solução de PBS - Tween 20 (0,05%) - BSA (0,1%) num volume total de 100µL/poço.

A titulação da IgG/IgM total iniciava-se na diluição 1:100 e terminava na 1:400, enquanto que as subclasses de IgG eram diluídas a 1:200. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente e de outro ciclo de lavagem, a placa era incubada durante outra hora à temperatura ambiente com uma solução de anticorpo secundário *anti-mouse* IgG ou IgM de origem leporina (Sigma[®]) a uma diluição de 1:4000 em PBS - Tween 20 (0,05%) - BSA (0,1%) num volume de 100µL/poço. Os anticorpos secundários para cada subclasse eram diluídos em PBS - Tween 20 (0,05%) - BSA (0,1%) até às concentrações de 500ng/mL, 250ng/mL e 1:4000 para IgG1, IgG2a e IgG3, respetivamente.

Após o passo anterior era introduzido, após lavagem, 100µL/poço de solução de substrato composta por 10 mL de tampão citrato (ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio 0,1M, pH 5.0), 10 mg de OPD (Sigma[®]) e 10 mL de peróxido de hidrogénio (Sigma[®]). Após meia hora a reação era parada por 50µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4N). Os valores da titulação de anticorpos anti-*T. b. brucei* eram então obtidos lendo a absorvência a 490nm da solução presente nos diferentes poços da microplaca, num espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad[®] Model 680 Microplate reader).

3.4.3. Doseamento de Citocinas e NO

Os doseamentos das citocinas IL-4, TGF- β 1 e IFN- γ e de NO foram realizados apenas no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração, a três animais saudáveis e a três animais de cada grupo no 14^o e 26^oDPI.

A quantificação das citocinas de resposta do tipo Th1 (IFN- γ) e do tipo Th2 (TGF- β 1 e IL-4) foi feita com recurso aos *kits DuoSet*[®] ELISA (R&D systems) das respetivas citocinas. Estas técnicas baseiam-se num princípio de ELISA *sandwich* associado a uma curva padrão

As amostras foram analisadas numa diluição de 1:25 no caso das citocinas do tipo Th2 e 1:10 no caso do IFN- γ .

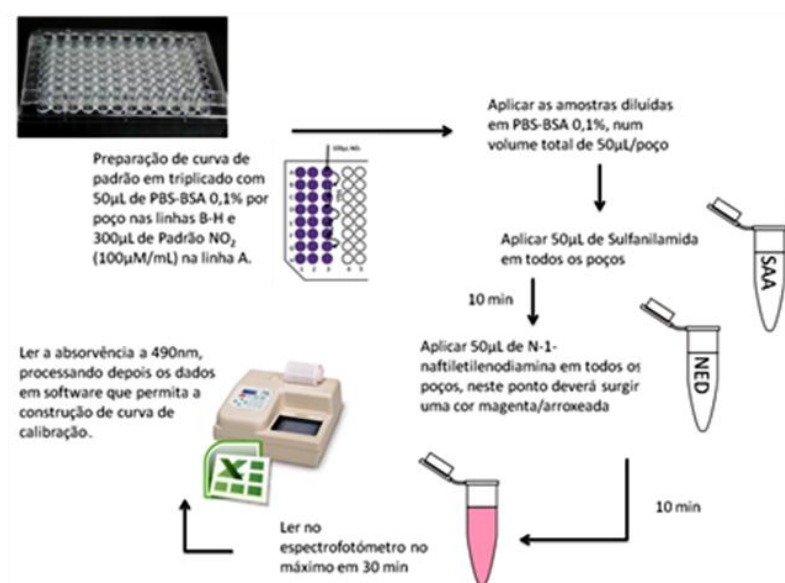
Para todos os *kits* às placas de 96 poços eram adsorvidos anticorpos de captura a uma concentração de 400ng/poço com recurso a uma solução de PBS filtrada por filtro Whatman[®] de 0,4 μ m a 4°C *overnight*. Após lavagem com PBS-Tween 20 (0,05%) os poços foram bloqueados com 200 μ L/poço de uma solução de PBS-BSA (1%) durante uma hora à temperatura ambiente. Após este passo, e um ciclo de lavagem, as amostras e o padrão eram aplicados na placa diluídos numa solução de reagente (PBS – BSA 1% no caso do *kit* IL-4 *DuoSet* ELISA, PBS - Tween 20 (0,05%) - BSA (0,1%) no caso dos restantes *kits*). A curva-padrão foi realizada em duplicado com um padrão de proteína recombinante numa diluição inicial de 1000 pg/mL e diluídas 1:2 até 15,125 pg/mL.

Após uma hora de incubação à temperatura ambiente e lavagem, era adicionado um anticorpo de deteção em concentrações indicadas pelo fabricante, num volume de 100 μ L/poço. Este passo tinha uma duração de uma hora, onde após esta, e um ciclo de lavagens, se adicionava 100 μ L por poço de estreptavidina-peroxidase em solução de reagente nas proporções de 1:100 e 1:200 nos casos das quantificações de TGF- β 1 e IFN- γ /IL-4, respetivamente. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e um ciclo de lavagem, foram adicionados 100 μ L por poço de solução de cromogéneo (R&D systems) permitindo-se a reação decorrer durante 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao fim dos vinte minutos esta reação era parada por uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N).

Após a revelação com o cromogéneo e paragem da reação as absorvências eram medidas num espectrofotómetro leitor de placas (Bio-Rad[®] Model 680 microplate reader) a um comprimento de onda de 450nm.

A quantificação de NO foi feita utilizando técnica colorimétrica de Griess pelo *kit* Promega[®] Griess Reagent Set. O protocolo para a realização desta quantificação é apresentado na Figura 76. De salientar que após o desenvolvimento da reação, as placas de titulação eram lidas a 490nm no espectrofotómetro leitor de microplacas enunciado anteriormente.

Figura 76 - Diagrama do protocolo da técnica de Griess



3.4.4. Hematologia

Os parâmetros hematológicos foram determinados apenas no ensaio de eficácia do BNZ em protocolo longo, em 3 animais de cada grupo, duas vezes durante o decurso do ensaio (14 e 26DPI) assim como aos animais sacrificados para obtenção de valores de controlo saudável.

Esta análise foi feita em sangue heparinizado com recurso ao medidor de hemograma Abacus Junior® (Diatron).

Os parâmetros analisados serão apresentados seguidamente, bem como os valores médios com o respetivo desvio-padrão obtidos nos animais saudáveis (Tabela 15)

Tabela 15 - Parâmetros hematológicos estudados neste trabalho e respetivos valores em animais saudáveis.

Parâmetros estudados		Valores de animais saudáveis (Média ± desvio-padrão)
Eritrograma	Eritrócitos (RBC) (x10 ⁹ /mL)	7,970 ± 1,137
	Hematócrito (%)	31,753 ± 4,019
	Hemoglobina (g/dL)	13,400 ± 1,670
	VCM (fL)	40,000 ± 1,000
	CHCM (g/dL)	42,267 ± 0,208
	RDW (%)	16,433 ± 0,643
Leucograma	Leucócitos (WBC) (x10 ⁶ /mL)	1,760 ± 0,617
	Granulócitos (x10 ⁶ /mL)	0,270 ± 0,110
	Linfócitos (x10 ⁶ /mL)	1,270 ± 0,514
	Monócitos e Blastos (x10 ⁶ /mL)	0,223 ± 0,055
Trombograma	Plaquetas (PLT) (x10 ⁶ /mL)	598,500 ± 38,891

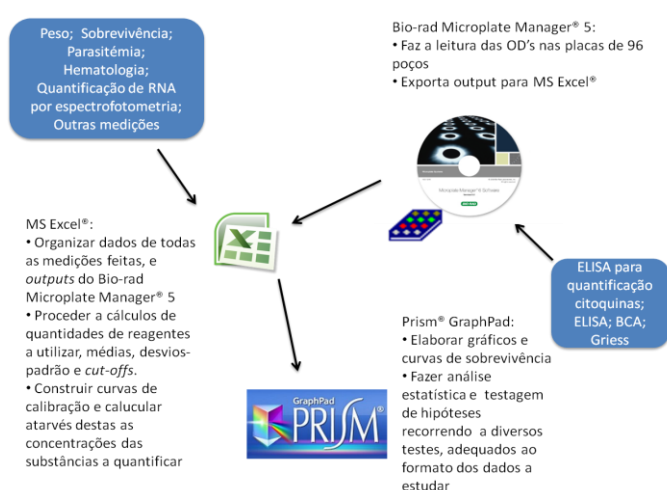
3.4.5. Análise estatística

Durante este trabalho experimental foram utilizadas variadas ferramentas de análise estatística com o objetivo de obtenção e correta interpretação de resultados. Os programas utilizados foram Microsoft Excel® 2007 e Prism Graphpad® 5.

O programa Microsoft Excel® 2007 foi utilizado para a organização de dados, para a obtenção de curvas de calibração essenciais à quantificação de proteínas, NO e citocinas, e para o estabelecimento de *cut-offs* e diluições ótimas a utilizar nas técnicas de ELISA.

A construção de gráficos e análise estatística foi feita com recurso ao programa Prism Graphpad® 5. A Figura 77 ilustra o processo de organização e análise dos dados durante o trabalho experimental.

Figura 77 - Diagrama do processamento de dados realizados nas experiências realizadas neste trabalho de mestrado.



Em todos os ensaios realizados foram utilizados testes de análise estatística sendo o teste escolhido para analisar cada variável diferente para cada. Os testes utilizados foram *Wilcoxon rank-sum test*, *One-way* e *Two-way ANOVA* e *Mantel-Cox log-rank test*. Foi ainda utilizada a análise de correlação e de regressão linear para calcular o ganho médio diário.

Um resumo de cada teste utilizado assim como cada medição feita por ensaio é apresentado na Tabela 16.

Os testes de Wilcoxon (não-paramétricos) foram preferidos ao Teste t pela distribuição dos dados das variáveis estudadas por estes não aparentar ser normal.

Tabela 16 - Resumo das variáveis avaliadas em cada ensaio e teste de análise estatística utilizado para cada medição.

Ensaio	Peso Vivo	Parasitemia	Sobrevivência	Anticorpos anti- <i>T. b. brucei</i>	Hematologia	Citocinas e NO	Análise estatística
Infeção por via oral	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	<i>One-way ANOVA</i>
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de correlação e de regressão linear para o Peso; • Wilcoxon rank-sum test para Peso e Parasitemia • <i>Mantel-Cox test</i> para a sobrevivência
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de correlação e de regressão linear para o Peso; • Wilcoxon rank-sum test para Peso, Parasitemia e contagem de plaquetas • <i>Mantel-Cox test</i> para a sobrevivência • <i>Two-way ANOVA</i> para as restantes variáveis

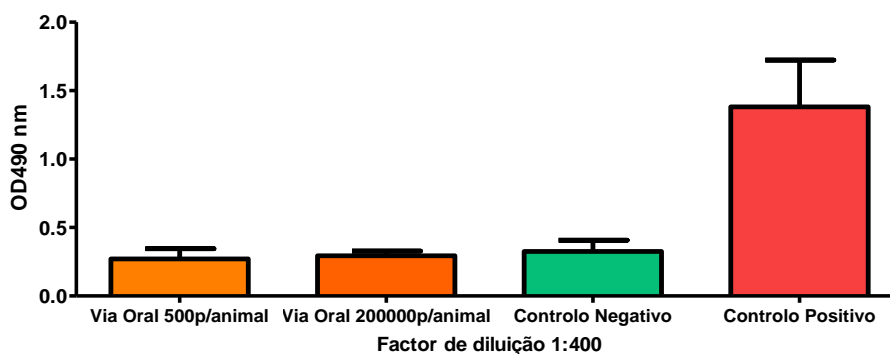
4. Resultados

4.1. Ensaio de determinação da infecção com *T. b. brucei* por via oral

Os animais neste ensaio apresentaram ausência de parasitemia em vinte campos em todos os dias onde foi realizada a colheita de sangue.

Com esta informação foi decidida a realização de um teste ELISA para detecção de IgG total anti-*T. b. brucei*. Neste teste foram comparados os títulos de IgG total dos animais de ambos os grupos com soro de animais saudáveis e soro de animais infectados com 21 dias de infecção. Os resultados do teste são apresentados na Figura 78.

Figura 78 - Título de IgG totais anti-*T. b. brucei*, expresso em absorvência ou densidade ótica a um comprimento de onda de 490nm (OD490nm), nos grupos infectados versus controlos positivo (soro de animal infectado com 22 dias de infecção) e negativo (soro de animal saudável). As barras de erro representam o desvio-padrão.



Analisando a figura podem-se evidenciar grandes semelhanças entre os títulos de IgG total, expressos em densidade ótica a 490nm, dos animais expostos ao parasita por via oral e dos animais saudáveis assim como um baixo desvio-padrão da média. Os títulos de IgG total dos animais infectados manifestam-se mais elevados e apresentam um maior desvio padrão relativamente aos restantes.

Em valores absolutos, os títulos de IgG total dos controlos positivo e negativo são $1,382 \pm 0,484$ e $0,326 \pm 0,115$ respetivamente. Os títulos de IgG total anti-*T. b. brucei* dos animais expostos a 500 parasitas por animal são $0,271 \pm 0,130$ enquanto que os animais expostos a 2×10^5 parasitas por animal apresentavam de título $0,294 \pm 0,047$.

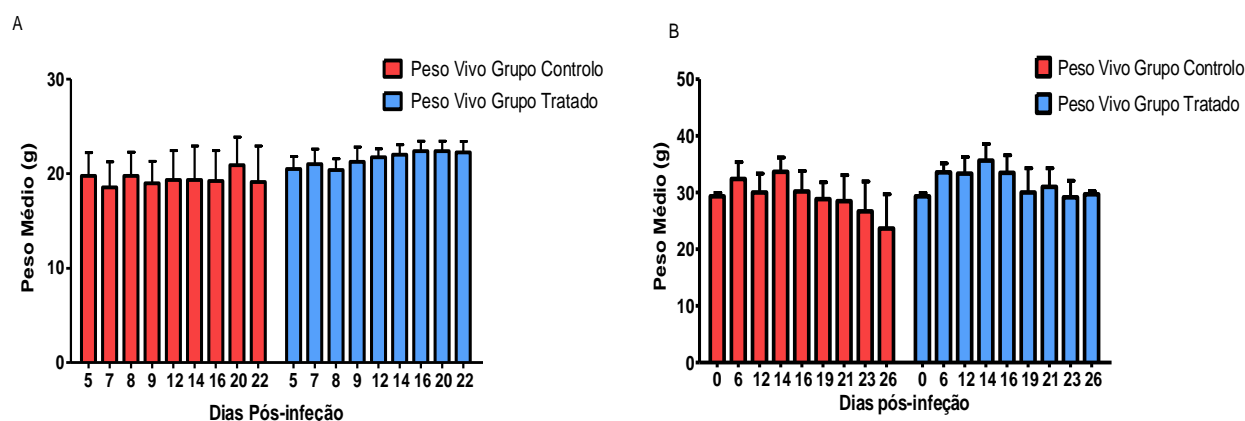
As diferenças entre estes grupos não foram estatisticamente significativas, quando analisadas com o teste *One-way ANOVA*, após análise pós-teste recorrendo ao teste de Bonferroni. Contudo, as diferenças entre os três grupos apresentados anteriormente (animais expostos e controlo negativo) e o controlo positivo foram estatisticamente significativas usando a mesma análise estatística (Resultados no Anexo B).

4.2. Ensaios de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por *T. b. brucei*

Para ambos os ensaios de eficácia farmacológica foram avaliadas a sobrevivência, o peso e a parasitemia ao longo da infecção, como referido nas Tabelas 14 e 16.

Os gráficos resultantes da medição do peso ao longo do curso da doença encontram-se representados na Figura 79.

Figura 79 - Peso vivo médio em grama, dos animais que integraram os ensaios de eficácia farmacológica do BNZ. O gráfico A é referente ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ de curta duração e o gráfico B é referente ao ensaio de longa duração. As barras de erro representam o desvio-padrão.



O gráfico A, referente ao ensaio da eficácia terapêutica do BNZ em protocolo curto revela uma tendência para o aumento de peso no grupo tratado. No grupo controlo é evidenciada uma oscilação de peso médio, não sendo graficamente visível tendência discreta para o ganho de peso. O peso máximo em ambos os grupos foi atingido no dia 20 pós-infeção.

O gráfico B apresenta os pesos médios dos animais usados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo longo. Em ambos os gráficos é evidente uma tendência para o ganho de peso até ao dia 14 pós-infeção em ambos os grupos, dia em que o peso máximo é atingido. Após o 14ºDPI os animais revelaram uma tendência para a perda de peso.

Após a elaboração dos gráficos procedeu-se à análise de regressão linear para a obtenção dos valores de ganho médio diário, à determinação dos coeficientes de correlação (Tabela 17) e às análises estatísticas para determinação da significância das diferenças entre os dois grupos de ambos os ensaios.

Tabela 17 - Resultados da regressão linear (R^2) do peso para cálculo e do cálculo da correlação (R) entre o peso e tempo.

Ensaio	Grupo	GMD g/dia	R^2	R
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	Controlo	0,03 ± 0,05	0,08	0,29
	Tratado	0,12 ± 0,03	0,79	0,89
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	Controlo	-0,25 ± 0,07	0,40	-0,63
	Tratado	-0,13 ± 0,05	0,07	-0,27

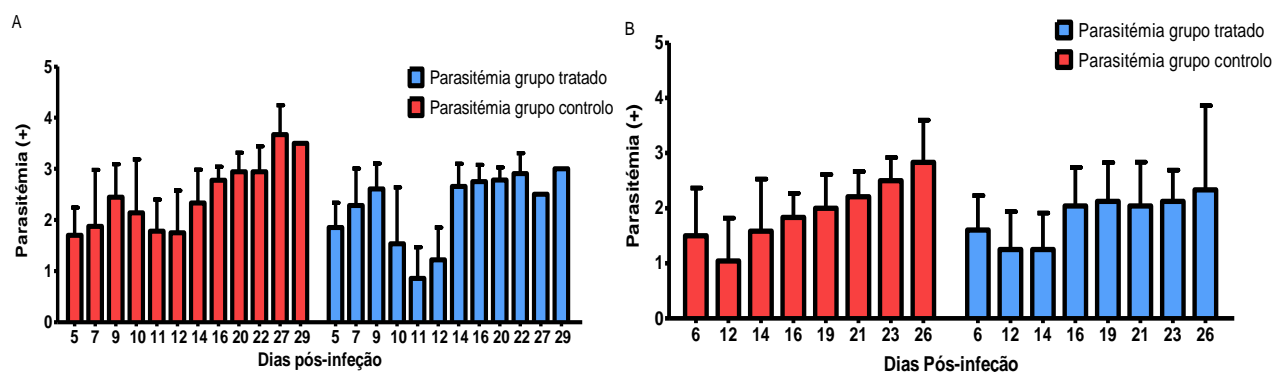
Os resultados anteriormente apresentados revelam uma tendência para o ganho de peso, especialmente no grupo tratado com BNZ, no primeiro ensaio. No grupo controlo a tendência para o ganho de peso é menor, podendo ser nula, ou até existir perda de peso dada a variação do GMD entre -0.2 a 0.8 g/dia. A correlação entre as duas variáveis é mais forte no grupo tratado que no grupo controlo, apontando para uma relação mais linear entre as duas variáveis neste grupo.

No segundo ensaio é evidente a tendência para a perda de peso, refletida num ganho médio diário negativo. A correlação entre as duas variáveis em ambos os grupos é fraca, devido em grande parte à falta de relação linear entre as duas variáveis (existindo um aumento do peso até ao 14ºDPI e perda a partir desse dia).

As diferenças entre os dois grupos são estatisticamente significativas para ambos os ensaios usando o teste *Wilcoxon rank-sum*. Porém, no ensaio de eficácia terapêutica com protocolo de curta duração o emparelhamento entre cada medição não é eficaz, comparando este teste a população como um todo e não cada par de dados individualmente (Anexo B).

Relativamente à parasitémia os gráficos apresentados na Figura 80 demonstram a tendência para a oscilação da parasitémia ao longo do curso da infeção.

Figura 80 - Parasitemia média. O gráfico A é referente à população estudada no ensaio terapêutico do BNZ no protocolo de curta duração enquanto o gráfico B é referente aos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo terapêutico de longa duração. As barras de erro corresponde ao desvio-padrão.



O gráfico A ilustra bem a oscilação observada da parasitemia, que descreve dois picos em ambos os grupos. No grupo controle estes picos são mais pronunciados no 9º e 27º DPI, enquanto no grupo tratado são mais evidentes no 9º e 22º DPI.

A parasitemia do grupo controle aparenta também ser mais elevada que a do grupo tratado. Existe ainda uma aparente tendência para a diminuição da parasitemia durante a terapêutica com BNZ no grupo tratado.

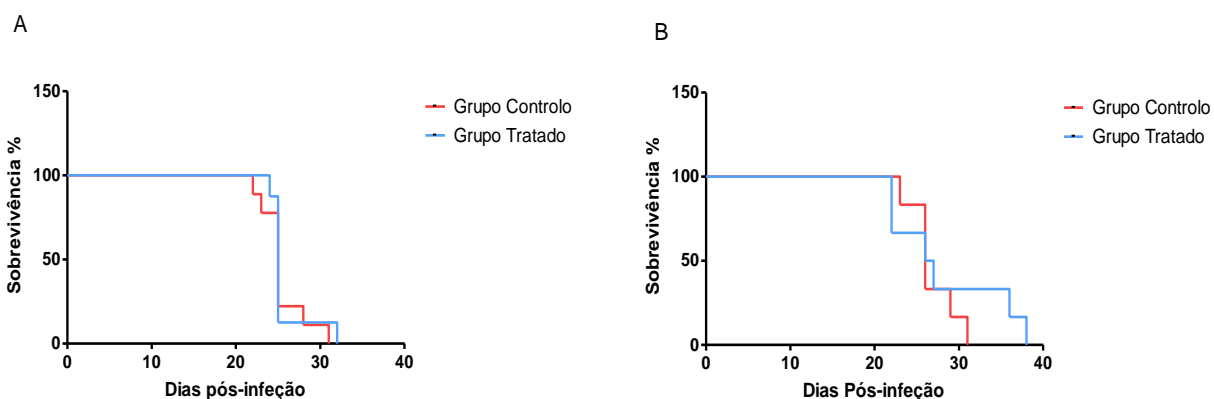
O gráfico B também demonstra oscilação na parasitemia, com picos menos pronunciados que no gráfico A, descrevendo dois picos pouco notórios no grupo controle, nos 6º e 14º DPI e um pico pronunciado no 26º DPI. Embora o pico mais notório do grupo tratado seja no 26º DPI verificam-se dois picos pouco notórios de parasitemia no 6º e 19º DPI.

Existe ainda a aparente tendência para parasitêmias mais baixas no grupo tratado que no grupo controle.

Após a elaboração dos gráficos anteriormente apresentados, foi feita a análise estatística recorrendo ao *Wilcoxon rank-sum test*, que determinou as diferenças entre os dois grupos de ambos os ensaios como não sendo estatisticamente significativas (Anexo B).

A sobrevivência foi medida até à morte natural do último animal de cada grupo ou subgrupo, conforme o ensaio (Tabela 14). Estes dados foram utilizados para elaborar curvas de sobrevivência, e para o cálculo da sobrevivência mediana de ambos os grupos. As curvas de sobrevivência estão representadas na Figura 81.

Figura 81 - Curvas de sobrevivência. O gráfico A é relativo ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo de curta duração enquanto o gráfico B é referente ao ensaio de eficácia farmacológica do BNZ no protocolo de longa duração.



O gráfico A evidencia que o início da mortalidade se deu após o 20ºDPI tendo sido verificada a primeira morte no grupo controlo. No grupo tratado a mortalidade iniciou-se mais tarde assim como a morte do último animal ocorreu mais tarde (33ºDPI), relativamente ao grupo controlo (32ºDPI). A sobrevivência mediana em ambos os grupos é atingida ao 25ºDPI (Tabela 18).

Tabela 18 - Estatística sumária da sobrevivência dos animais em ambos os grupos

Ensaio	Sobrevivência mediana do grupo controlo	Sobrevivência mediana do grupo tratado com BNZ	Rácio de risco de morte (controlos <i>versus</i> tratados)
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de curta duração	25 dias	25 dias	1,00
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração	26 dias	26,5 dias	1,595

No entanto, o gráfico B que retrata a sobrevivência dos animais utilizados no ensaio de determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração descreve uma dinâmica de mortalidade ligeiramente diferente do gráfico A. A primeira morte dá-se no grupo tratado no 20º DPI, contudo a última morte dá-se igualmente neste grupo ao 38ºDPI, tendo a última morte do grupo controlo ocorrido sete dias antes. A mortalidade mediana é atingida aos 26 DPI no grupo controlo e aos 26,5 DPI no grupo tratado (Tabela 20).

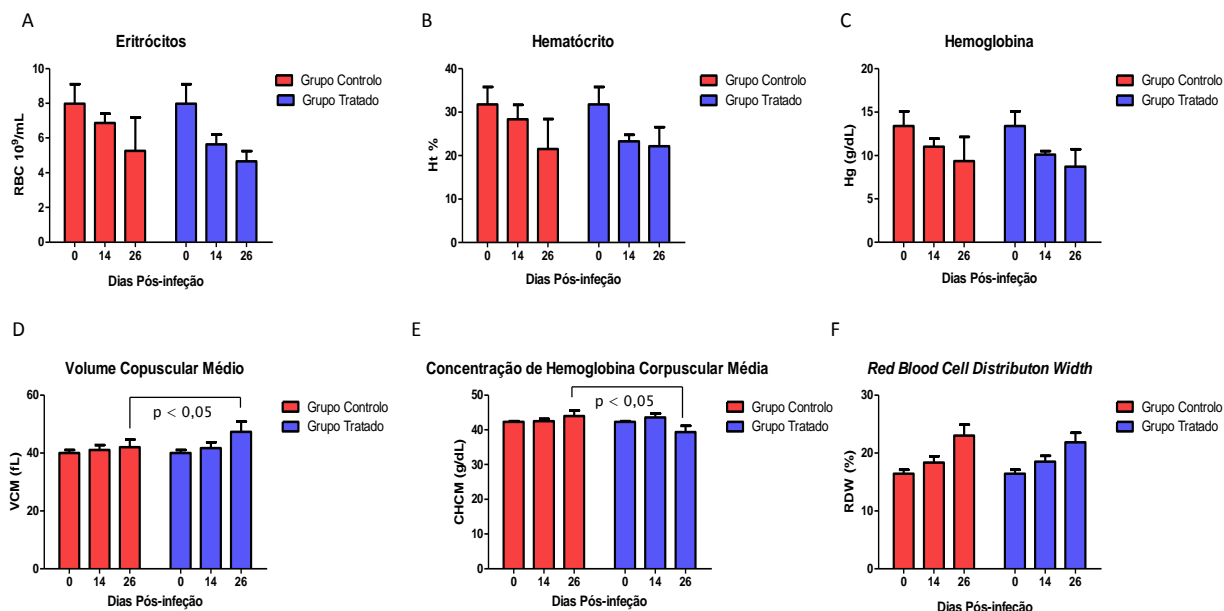
Foram ainda calculados os rácios de risco de morte, que dão a informação de quantas vezes maior é o risco da população controlo morrer quando comparada com a população tratada. Este rácio foi 1,00 para os animais do primeiro ensaio, significando que a morte é igualmente provável em indivíduos tratados e não tratados. Para o segundo ensaio o rácio foi 1,595, denotando que o risco de morte dos animais não tratados é 60% maior que para os animais tratados (Tabela 18).

As curvas de sobrevivência foram ainda analisadas usando o teste de Mantel-Cox. Os resultados do teste classificam as diferenças como não sendo estatisticamente significativas (Anexo B).

As variáveis hematológicas e imunitárias (anticorpos e citocinas) apenas foram avaliadas no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração (Tabela 16).

Os resultados relativos à concentração de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina total encontram-se representados na Figura 82, bem como os índices eritrocitários referentes ao volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e anisocitose (RDW).

Figura 82 - Eritrograma dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ num protocolo terapêutico longo. Os gráficos A, B e C são relativos à contagem de Eritrócitos, Hematócrito e Hemoglobina, respectivamente. Os gráficos D, E e F são relativos aos índices eritrocitários, VCM, CHCM e RDW, respectivamente. As barras de erro representam o desvio-padrão e nos gráficos D e E consta a indicação dos pares em que as diferenças são estatisticamente significativas.



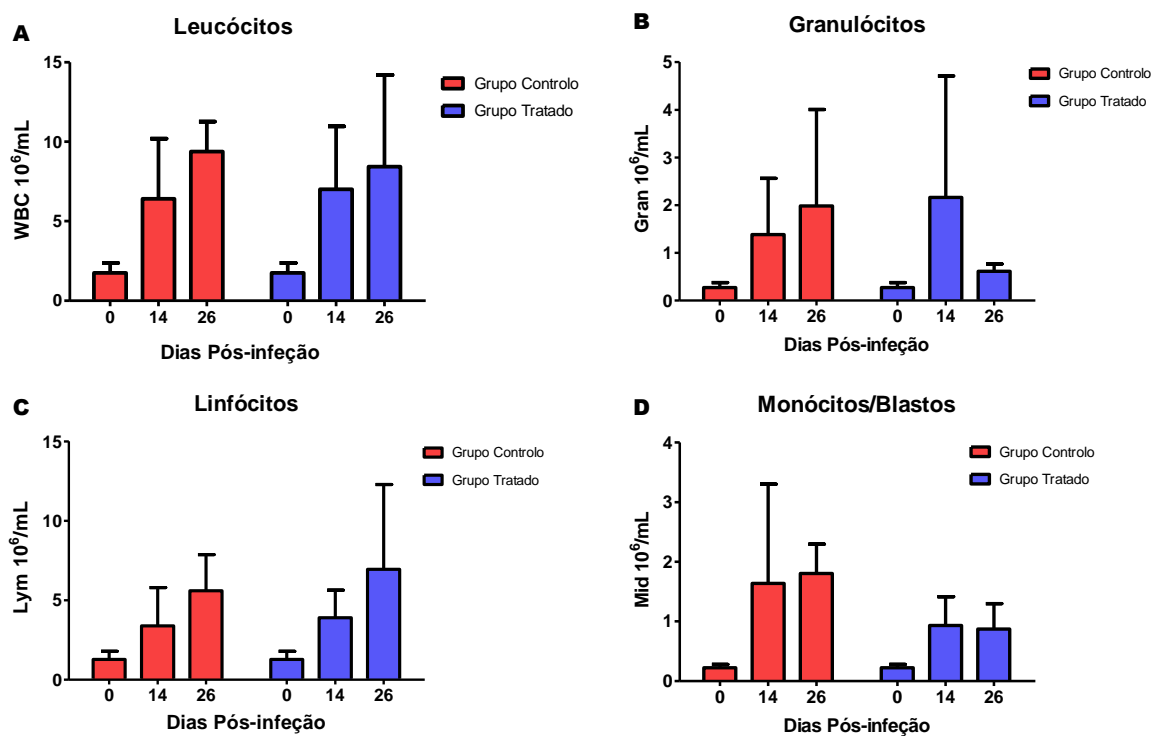
Relativamente às variáveis do eritrograma que quantificam a quantidade de eritrócitos e de hemoglobina (Contagem de eritrócitos, Hematócrito e Hemoglobina), verifica-se uma visível tendência para a anemia quando analisadas as três variáveis, representadas nos gráficos A, B e C. A anemia tende a acentuar-se mais rápido no grupo tratado que no grupo controle, contudo as diferenças para estas variáveis, entre o dois grupos não são estatisticamente significativas usando o teste *Two-way ANOVA* (Anexo B).

Os gráficos D, E e F anteriormente apresentados são referentes aos índices eritrocitários e demonstram uma tendência para a macrocitose e anisocitose em ambos os grupos.

Estes índices aparentam uma alteração mais pronunciada no grupo tratado que no grupo controle ao 26ºDPI. No grupo tratado com BNZ verifica-se ainda uma tendência estatisticamente significativa como teste *Two-way ANOVA* para a macrocitose com hipocromia (Anexo B).

Os resultados relativos às variáveis estudadas do leucograma encontram-se apresentados na Figura 83.

Figura 83 - Leucograma dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ num protocolo terapêutico longo. O gráfico A é referente ao número de leucócitos total, enquanto os gráficos B, C e D são referentes à contagem de cada linhagem celular (Granulócitos, Linfócitos e Monócitos/Blastos, respetivamente). As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

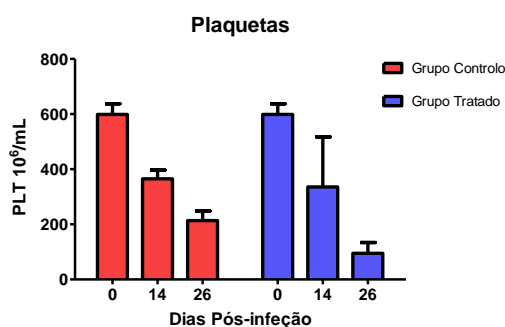


O gráfico A anteriormente apresentado revela uma tendência para a leucocitose em ambos os grupos. A linhagem celular mais aumentada e implicada na leucocitose geral aparenta ser a linfocítica (gráfico C). Os granulócitos (gráfico B) e os monócitos e blastos (gráfico D) sofrem um aumento, no 14º DPI e tendem a diminuir no 26ºDPI, com exceção do grupo controle no qual o número de granulócitos tende a aumentar.

Após análise estatística com *Two-way ANOVA* foi determinado que as diferenças entre os dois grupos não são estatisticamente significativas (Anexo B).

Os resultados relativos às variáveis estudadas do trombograma estão representados na Figura 84.

Figura 84 - Contagem de plaquetas dos animais utilizados no ensaio de eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico de longa duração. As barras de erro representam o desvio-padrão.

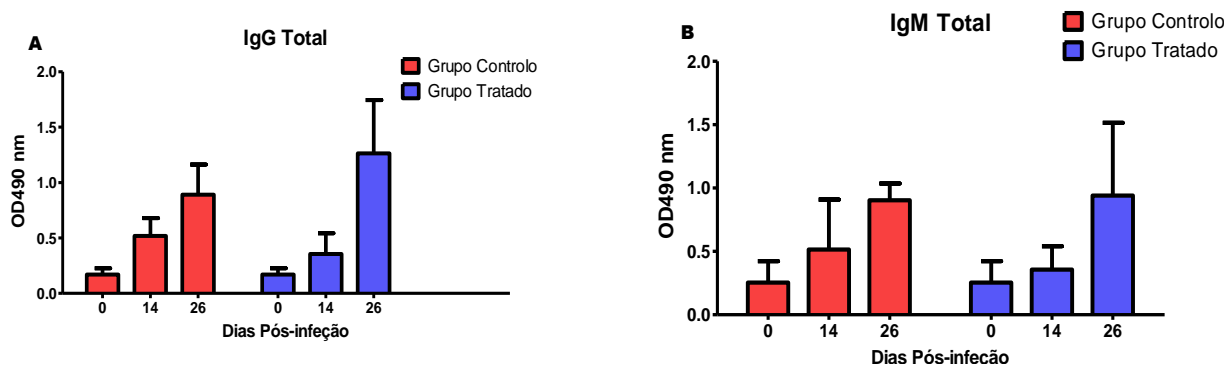


O gráfico apresentado na Figura 84 demonstra uma tendência para a diminuição do número de plaquetas por mililitro de sangue em ambos os grupos. A tendência parece ser mais pronunciada no grupo dos animais tratados com BNZ.

Foi realizada a análise dos dados com o teste de Wilcoxon para duas amostras que determinou não existirem diferenças significativas entre os dois grupos (Anexo B).

Neste ensaio foram ainda analisadas variáveis imunológicas como a titulação de anticorpos da classe IgG e IgM (Figura 85).

Figura 85 - Título expresso em absorvência, ou densidade ótica a 490nm (OD490nm) de IgG total (A) e IgM total (B) nos animais utilizados no ensaio de determinação da eficácia farmacológica do BNZ em protocolo terapêutico longo. As barras de erro representam o desvio-padrão. A diluição usada foi 1:400.

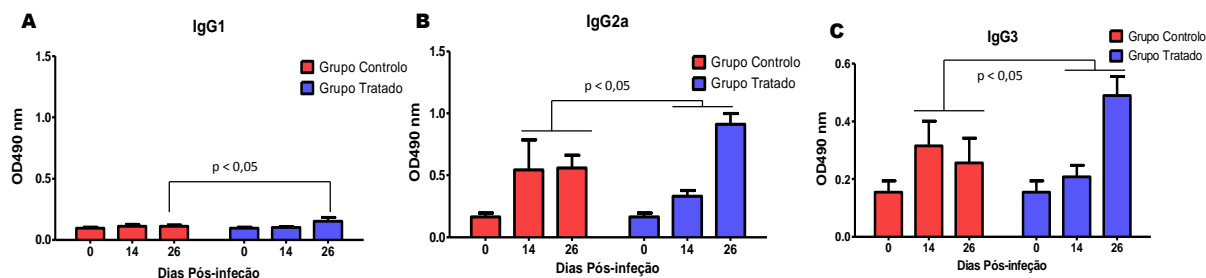


Os gráficos anteriormente apresentados descrevem uma tendência esperada para o aumento dos títulos de ambas as classes de imunoglobulinas com o decorrer de infecção. No ponto de infecção mais tardio, é aparente um maior título de imunoglobulinas no grupo dos animais tratados com BNZ. Os títulos de IgG total (gráfico A) aparentam ter menores desvios-padrão que os de IgM total (gráfico B).

Fazendo uso da análise estatística com recurso a *Two-way ANOVA* foi determinado que as diferenças entre o grupo tratado e o grupo controlo não são estatisticamente significativas nem para IgM total nem para IgG total (Anexo B).

Após a titulação as classes de imunoglobulinas totais foram tituladas as subclasses de IgG, IgG1, IgG2a e IgG3 (Figura 86).

Figura 86 - Títulos expressos em absorvência, ou densidade ótica a 490nm (OD490nm) de IgG1 (A), IgG2a (B) e IgG3 (C) nos animais utilizados no ensaio. As barras de erro representam o desvio-padrão. Em todos os gráficos consta a indicação dos pares entre os quais as diferenças são estatisticamente significativas. A diluição utilizada foi 1:200.



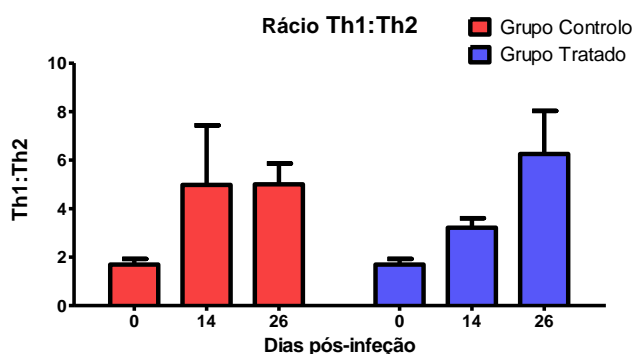
Os gráficos B e C apresentados na Figura 86 revelam uma tendência para o aumento dos títulos de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG3. O gráfico A demonstra um muito discreto aumento dos títulos da subclasse IgG1.

Os gráficos B e C demonstram um aumento progressivo dos títulos de imunoglobulinas no grupo tratado. No entanto, o grupo controlo o valor máximo dos títulos verifica-se no 14ºDPI diminuindo no 26ºDPI. As diferenças entre os títulos nos dias mencionados são estatisticamente significativas quando analisadas com o teste *Two-way* ANOVA.

No gráfico A apenas existe um aumento aparente dos títulos no grupo tratado, estatisticamente significativo (Anexo B), ao 26ºDPI.

Utilizando os valores dos títulos de IgG1 e IgG2a foi calculado o rácio Th1:Th2 (Título de IgG2a / Título de IgG1). Estes rácios encontram-se representados na Figura 87.

Figura 87 - Rácio Th1:Th2 dos animais utilizados no ensaio. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão.



O gráfico anterior demonstra uma polarização da resposta Th1, visto que todos os rácios médios tendem a ser maiores que 1. A resposta Th1 aparenta ser mais intensa no 26ºDPI no grupo tratado. No grupo controlo a resposta aparentemente não aumenta em intensidade após o 14ºDPI.

As diferenças entre os dois grupos não foram consideradas como estatisticamente significativas quando os dados foram submetidos a análise com o teste *Two-way* ANOVA.

Por fim foram quantificadas citocinas de resposta Th2 (IL-4, TGF- β 1) e Th1 (IFN- γ).

Foi também quantificado o NO. Os resultados das quantificações de citocinas estão apresentados na Figura 88 e os da quantificação de NO na Figura 89.

Figura 88 - Quantificação de Citocinas por ELISA. Os gráficos A, C e E são referentes às concentrações de IL-4, TGF- β 1 e IFN- γ em pg/mL obtidas aplicando as absorvências a 450nm (B, D e F respectivamente) a uma curva de calibração. As barras de erro correspondem ao desvio-padrão. As diluições utilizadas foram 1:50 para a IL-4 e 1:25 para as restantes citocinas. Nos gráficos E e F é apresentada ainda a indicação de quais pares são significativamente diferentes entre si.

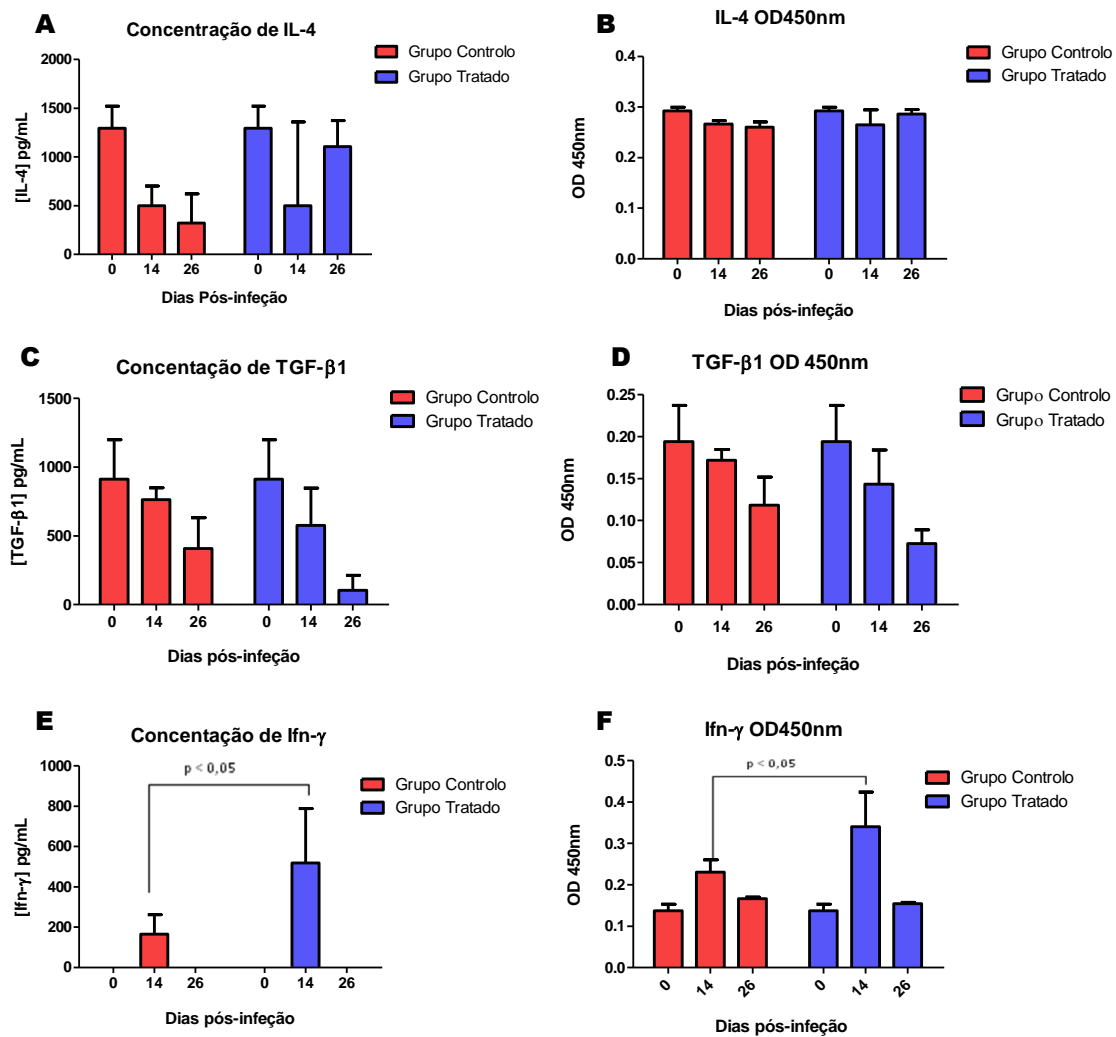
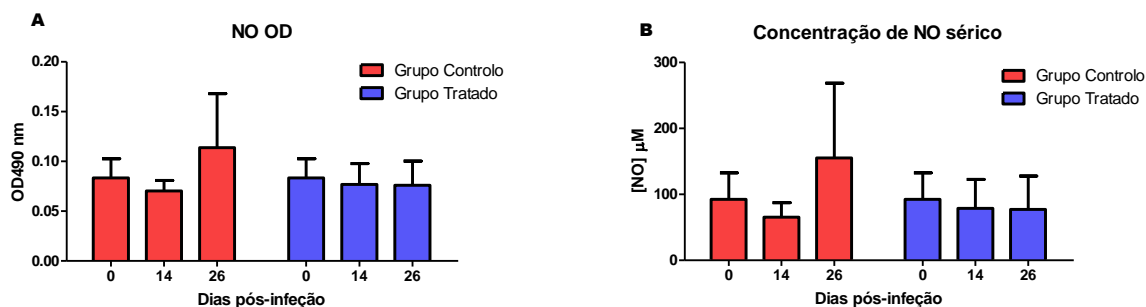


Figura 89 - Quantificação de NO pela técnica de Griess. O gráfico A corresponde às absorvências medidas a 490nm (OD490nm) e o gráfico B corresponde à concentração em mM de NO sérico. As barras de erro representam o desvio-padrão. A diluição utilizada foi 1:10.



Nos gráficos anteriormente apresentados verificam-se nas quantificações absolutas de IL-4 e IFN- γ (Figura 88 - gráficos A e E) aumentos do desvio padrão e pontos em que os marcadores inflamatórios não são identificados.

Este acontecimento deve-se a problemas de quantificação tendo vários pontos sido inquantificáveis aquando o cálculo da concentração pela lei de Lambert-Beer (concentração ≤ 0). Por este motivo são apresentados também os resultados da espectrofotometria, com os quais foram também realizadas análises estatísticas com recurso ao teste *Two-way ANOVA* cujos resultados serão apresentados seguidamente.

Analisando os gráficos A, B, C e D, pode-se evidenciar a tendência esperada para diminuição da concentração de IL-4 e TGF- β 1 com o aumento do tempo de infeção. Esta diminuição é mais notória no caso da IL-4 na quantificação absoluta de que nos resultados da espectrofotometria. Após análise foi determinado que as diferenças entre os dois grupos em ambos os casos não são estatisticamente significativas (Anexo B).

Para o caso do NO (Figura 89), as concentrações deste marcador são oscilantes e tendem a aumentar mais pronunciadamente no grupo controlo no último ponto estudado, sendo quase constantes no grupo tratado. As diferenças encontradas foram comprovadas não ser estatisticamente significativas pelo mesmo teste utilizado anteriormente (Anexo B).

Quanto ao IFN- γ , dois pontos comprovam-se inquantificáveis quando calculada a concentração, mesmo numa diluição baixa (1:10). A diminuição das concentrações de IFN- γ é esperada na fase mais tardia da infeção.

A análise estatística foi feita com recurso aos resultados espectrofotométricos e quantitativos, que foram concordantes sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ao 14^oDPI (Anexo B).

5. Discussão

5.1. Ensaio de determinação da infecção com *T.b.brucei* por via oral

Os resultados desta experiência apontam para ineficácia da infecção por via oral, nestes animais, considerando que não houve nem detecção microscópica dos parasitas, nem um aumento do título de IgG total anti-*T. b. brucei*.

O ensaio falhou em determinar uma dose infetante por via oral, e em corroborar os resultados descritos por Laveran e Mesnil (1912) e Moloo *et al.* (1973).

Laveran e Mesnil (1912) mencionam na sua publicação que as infecções por via oral e gástrica aparentam ter sucesso para certas espécies de tripanossomas exceto nos casos em que a mucosa oral é especialmente resistente, como a mucosa oral dos ruminantes. Os autores consideram a transmissão por via oral indubitável, tanto por dados experimentais em gatos e cães que ingeriram roedores infetados como em roedores infetados por ingestão de sangue. Os mesmos autores consideram ainda que a ineficácia de certas infecções experimentais em roedores é devida à inexistência de soluções de continuidade na mucosa oral destes, que ocorrem naturalmente nos carnívoros quando estes esmagam os ossos das presas.

Bowman *et al.* (2001) citando Moloo *et. al.* (1973), indicam que cerca de 18% dos gatos utilizados na experiência ficaram infetados após a ingestão da carne de caprino infetada com *T. b. brucei*, manifestando a infecção ate 38 dias depois da ingestão.

Para melhor aprofundar os resultados desta experiência poderá ser utilizado material dos esfregaços para detecção molecular do parasita, sendo esta uma possível perspectiva futura, para determinar se a infecção ocorreu, embora com parasitêmias muito baixas e tardias, anteriores ao aumento dos títulos de IgG total anti-*T. b. brucei*.

Outra variável que deve ser tida em conta é o veículo dos parasitas. Nesta experiência o veículo utilizado foi PBS-glucose, enquanto nas experiências de infecção por via oral o veículo foi carne e outros tecidos edíveis. Os tecidos utilizados podem ter constituído um meio de proteção contra o suco gástrico e podem ter ainda, ao integrar escaras físicas como ossos, ter aberto portas de entrada na cavidade bucal por onde os parasitas tivessem entrado para a corrente sanguínea através das soluções de continuidade.

O último fator a controlar é a carga parasitária, que pode ter sido muito baixa, sendo necessário encontrar meios de concentração dos parasitas para que se consigam atingir doses próximas das que se atingem numa refeição de órgãos e carne de animais parasitados pelos predadores.

5.2. Ensaio de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por *T. b. brucei* num protocolo terapêutico de 5 dias

Os resultados deste ensaio foram ao encontro dos resultados obtidos por Poltera e colaboradores (1981), que comprovaram ineficácia farmacológica do BNZ na TA experimental em modelo murino. No trabalho anteriormente citado, o BNZ tinha apenas causado um aumento da circulação de imunocomplexos, não tendo diminuído a parasitemia nem causado redistribuição dos parasitas dentro do SNC. No presente trabalho foi comprovado que mesmo nas doses recomendadas e com tratamento precoce não se verificou o controlo da parasitemia nem um aumento da sobrevivência dos animais.

A parasitemia oscilante verificada no ensaio é uma característica típica tanto na infecção natural como na experimental (Taylor & Authié, 2004).

O ganho de peso no grupo tratado teve forte correlação ($R=0.89$) existindo uma relação linear entre o peso e o tempo de infecção, assim como poucos fatores fizessem variar o peso para além da relação entre as duas variáveis. A análise de regressão provou a existência de uma tendência forte para o ganho de peso no grupo tratado.

A mesma situação não se verificou no grupo controlo, considerando que a correlação foi fraca entre as duas variáveis ($R=0.29$), o que indica que a interação entre o tempo de infecção e o peso é pouco linear. Este fenómeno pode ser explicado pela interferência de outras variáveis na relação entre peso e tempo de infecção. O intervalo do GMD inclui números inferiores a 0, sugerindo que em certos animais do grupo controlo houve inclusivamente perda de peso.

Os resultados acima citados pareciam indicar uma melhoria clínica do uso do BNZ, visto que os animais tratados tinham um maior aumento de peso por dia que os controlos. Contudo, após análise estatística, onde as diferenças entre os dois grupos foram estatisticamente significativas, o emparelhamento entre dias nos dois grupos não foi eficaz, ou seja, o teste não ganhou poder em comparar os dois grupos por dia, ao invés de comparar os grupos como um todo. Assim, podemos concluir que os dois grupos foram no geral diferentes em termos de peso médio, mas não é possível tirar conclusões face a dias específicos.

Outros fatores que possam ter contribuído para as diferenças de peso e variação de peso, para além do tratamento, são exemplos a idade média do grupo, a ordem hierárquica dos animais na caixa, as alterações fisiopatológicas da doença, nomeadamente o edema e a organomegália, parasitismo gastrointestinal ou erro de medição.

A idade média do grupo é um fator importante na cinética do ganho de peso pois numa fase mais precoce do crescimento do animal existe uma maior tendência para o ganho de peso por crescimento do sistema músculo-esquelético de que em fases mais tardias por

deposição de gordura. Este fator não foi considerado como muito importante, pois as diferenças de idades máximas entre os animais antes da seleção eram 3 semanas, e estes foram distribuídos pelos dois grupos aleatoriamente.

A ordem hierárquica na caixa pensa-se ter sido importante neste ensaio, pois aumenta a variância entre animais do mesmo grupo. Os animais mais pesados e mais fortes assumem dominância e acesso preferencial ao alimento, ao esconderijo, e quando se verifica canibalismo são os primeiros a ingerir a carcaça, quase sempre um animal mais pequeno. Assim, um grupo mais homogéneo quanto ao peso e tamanho dos animais, como o grupo tratado, vai ser menos influenciado pela hierarquia da colónia que um grupo mais heterogéneo, como o grupo controlo.

A organomegália e o edema próprios da TA podem ter contribuído para aumento do peso nos animais doentes. Contudo, tendo em conta que não foram verificadas diferenças significativas entre ambos os grupos nem para a parasitemia nem para a sobrevivência, esta alteração patológica possivelmente não teve influência nas diferenças entre o grupo tratado e o grupo controlo.

O parasitismo gastrointestinal influencia negativamente o GMD, por espoliação de ingesta e má absorção gastrointestinal. Este fator foi controlado com análise coprológica prévia a uma amostra dos animais usados no ensaio. O resultado desta foi negativo, e o ambiente controlado, não sendo considerado o parasitismo provável.

Os erros de medição são importantes neste ensaio considerando o baixo peso dos animais utilizados. A sensibilidade da balança (1g) ser 4% do peso médio dos animais tornando qualquer erro acima de 1g é significativo (>5%). Infelizmente, por indisponibilidade de equipamento não foi possível realizar medições mais precisas. Na tentativa de diminuir o erro a balança era calibrada a cada 3 medições e os animais pesados dentro de recipientes que possibilitavam sua contenção. Porém, assumindo erro semelhante para ambos os grupos a influência deste fator não justifica por si as diferenças significativas entre os dois grupos.

Estes resultados não foram contudo conclusivos, dada a curta duração da terapêutica, a suscetibilidade da estirpe BALB-C à infeção e os dados de ganho de peso no grupo tratado, quando comparado com o grupo controlo. Com base nestas observações a necessidade de repetição da experiência com uma estirpe de animais menos suscetíveis à progressão da doença e com uma maior duração da terapêutica.

Outro argumento para a repetição da experiência foi o facto da dose estabelecida ser uma dose média, o que pode ter motivado sobredosagem em animais mais pequenos e subdosagem nos maiores, principalmente com um tão curto período de terapêutica.

5.3. Ensaio de determinação da eficácia do benznidazol na infecção intraperitoneal por *T. b. brucei* num protocolo terapêutico de 11 dias

Este ensaio surgiu como uma confirmação do anterior com um modelo animal menos suscetível à progressão da doença, com uma duração da terapêutica maior e com uma dose calculada com o objetivo de evitar subdosagens.

Confirmou-se que as diferenças nos valores de parasitemia e na sobrevivência não foram estatisticamente significativas, mesmo tendo a indicação que os animais controlo tiveram um risco de morrer 59% maior que os animais tratados. As variações da parasitemia foram consistentes com o que está descrito na literatura (Taylor & Authié, 2004).

Quanto ao peso, nesta experiência confirmaram-se diferenças significativas entre os dois grupos de animais com emparelhamento eficaz, mesmo não havendo no geral ganho de peso, sendo que os tratados tiveram menor tendência para a perda de peso que os controlos. A correlação entre as duas variáveis em ambos os grupos foi baixa, sendo mais baixa no grupo tratado. Esta baixa correlação pode estar relacionada com o facto da variação do peso ser pouco linear, havendo um período de claro ganho de peso até ao 14^o DPI sendo depois notória a tendência para a perda de peso. Assim, é notório um efeito do BNZ na variação do peso, embora seja necessário que este efeito seja explorado em detalhe, visto que nas outras variáveis clínicas não se verificaram diferenças significativas.

Quanto aos resultados de hematologia, no que se refere ao eritrograma, a anemia verificada foi consistente com os dados descritos na literatura (Taylor & Authié, 2004; Pentreath & Kennedy, 2004), excepto no que concerne aos índices eritrocitários dos animais tratados na fase mais tardia. A tendência estatisticamente significativa para a macrocitose com hipocromia pode revelar ação do BNZ a nível da medula, ação essa que já foi descrita para outras linhas celulares (Rassi & Luquetti, 2004). Para determinar se esta ação é inibitória ou estimuladora poderia ter sido realizada uma contagem manual de reticulócitos ou um mielograma para analisar as proporções dos diferentes núcleos hematopoéticos. No entanto tal não foi exequível no decorrer deste trabalho por limitações de tempo para análise e interpretação dos esfregaços e por não ter sido incluído o estudo da medula óssea no plano experimental, não tendo sido realizada a colheita deste tecido.

Quanto ao leucograma os resultados foram discordantes dos reportados na literatura, porque não foi evidenciada a tendência para a pancitopenia característica da infecção por *T. b. brucei*, observando-se uma tendência para a leucocitose com neutrofilia no grupo controlo. A neutropenia verificada no grupo tratado foi consistente tanto com a fisiopatologia da doença como com as reações adversas do BNZ reportadas por Rassi e Luquetti (2004) e Taylor e Authié (2004). As diferenças para todas as linhagens celulares não foram

estatisticamente significativas, possivelmente devido ao baixo número de amostras e ao elevado desvio-padrão verificado. De realçar também que a calibração do aparelho para as células humanas poderá ter influenciado a contagem diferencial automática. As causas de leucocitose podem ser variadas, podendo ter como origem infeção bacteriana secundária, devido à imunossupressão causada pela TA (Taylor & Authié, 2004; Baral, 2010; De Sousa *et al.*; 2011).

Quanto ao trombograma os resultados foram semelhantes aos reportados por vários autores (Taylor & Authié, 2004; Pentreath & Kennedy, 2004).

As titulações de IgG e IgM anti-*T. b. brucei* mostaram-se de acordo com a literatura, verificando-se aumento dos títulos com o aumento do tempo de infeção, sendo que os títulos de IgM se apresentam mais variáveis que os títulos de IgG (Taylor & Authié, 2004). Quanto às subclasses de IgG, o perfil de IgG2a e a IgG3 dominantes é verificado nas infeções naturais e experimentais por *T. b. brucei*, e denota uma resposta maioritariamente Th1, com altas concentrações de IFN- γ , que é esperada na TA (Baudino *et al.*, 2006; De Sousa *et al.*, 2011). As diferenças estatisticamente significativas no grupo tratado, com títulos mais elevados de IgG1, IgG2a e IgG3 indicam uma alteração na imunomodulação nestes grupos, com um mais pronunciado padrão Th1, contudo com pouca inibição da produção de IgG1, própria de uma resposta Th2 (Baudino *et al.*, 2006).

A apreciação da polarização da resposta imunitária usando o rácio Th1/Th2 demonstrou não existirem diferenças estatisticamente representativas entre os dois grupos quanto à intensidade da resposta. Contudo é importante salientar alguns aspetos desta avaliação de resposta.

O primeiro aspeto é a resposta imunitária em animais saudáveis ter sido Th1. Este resultado deve-se à elevada reatividade do anticorpo secundário anti-IgG2a, relativamente ao anticorpo secundário IgG1, elevando o rácio basal de 1 para 1,8. O segundo aspeto que é importante salientar é que o rácio calculado é qualitativo e não quantitativo. Um rácio quantitativo proporciona uma informação mais correta relativamente à polarização da resposta, visto que é calculado com concentrações de marcadores e não com as absorvências destes. O último aspeto a referir poderá ser o facto de o rácio ter sido calculado com apenas dois marcadores de cada resposta. Seleccionando outros pares de marcadores poderia levar à obtenção de resultados diferentes. A restrição da análise a pares não permite uma avaliação global da resposta imunitária.

Para justificar estes resultados a quantificação de citocinas veio fornecer dados importantes nomeadamente no que concerne ao IFN- γ . Os pontos inquantificáveis nos ELISA de quantificação de IL-4 e IFN- γ podem ter sido devidos a baixa sensibilidade da técnica, não sendo distintos os pontos de baixa concentração com o branco da curva de calibração; problemas no bloqueio da placa que permitiram adsorção do anticorpo secundário com a

placa; tempo de incubação insuficiente para a temperatura ambiente; ou maior afinidade da citocina recombinante do padrão com os anticorpos de detecção e captura que a citocina natural. Infelizmente, dado os problemas da técnica agora referidos, a quantificação exata não foi conclusiva para IL-4 e IFN- γ , tendo sido utilizados os valores de absorvência para a realização de análise estatística. Esta revelou, que embora as concentrações médias aparentes de IL-4 se tivessem mantido relativamente inalteradas no grupo tratado, as diferenças entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas.

Quanto ao IFN- γ , a concentração significativamente maior no 14^o DPI nos animais tratados foi atribuída como a principal responsável pelo aumento dos títulos de IgG2a e IgG3 anti-*T. b. brucei*. Esta estimulação de IFN- γ induzida pelo BNZ está reportada por vários autores, bem como a manutenção da expressão de certas citocinas Th2 como IL-10 e IL-4 (Olivieri, *et al.*, 2002; Sathler-Avelar, *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2007).

A concentração de TGF- β 1 tendeu a diminuir igualmente em ambos os grupos. Está reportada a inibição desta citocina na fase crónica da infeção por *T. b. brucei*, e a diminuição das suas concentrações, especialmente no SNC, é correlacionada com aumento da mortalidade (Masocha *et al.*, 2008; MacLean, *et al.*, 2012).

A concentração de NO tendeu a manter-se sensivelmente inalterada no grupo tratado, aparentando um aumento discreto no grupo controlo. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas e vêm corroborar o que Maya *et al.* (2007) defenderam, isto é, que o *stress* oxidativo por formação de compostos reativos de azoto, como o NO não é o principal mecanismo de ação do BNZ, pois se assim fosse, as concentrações de NO estariam aumentadas no grupo tratado.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho permitiu concluir que o BNZ não foi eficaz no tratamento da TA, nos protocolos terapêuticos estudados pois não demonstra quaisquer vantagens quer no aumento da sobrevivência quer no controlo da parasitemia, anemia e trombocitopenia verificadas. Contudo é um imunomodulador da resposta Th1, com significativo aumento da concentração de IFN- γ , que pode ser útil em várias doenças em que esta resposta esteja alterada e seja benéfica, como é o caso da Leishmaniose, Imunodeficiências adquiridas ou micobacterioses.

Outra conclusão deste trabalho é a ineficácia do estabelecimento de uma infeção experimental por via oral com doses tão elevadas com 2×10^5 parasitas/animal, veiculados em PBS-glucose.

Como perspetivas futuras, propõe-se o estudo das diferenças entre o BNZ e o Fenixidazole, ambos nitroimidazóis, que conferem uma boa capacidade tripanocida ao último e não ao primeiro.

A expressão de citocinas em órgãos, não realizada neste trabalho e estudos de imunoestimulação em animais saudáveis são importantes para a compreensão da imunomodulação complexa resultante da terapêutica com BNZ.

Estudos de toxicidade e farmacocinética em presença de indutores e inibidores do citocromo P450 são uma possível perspetiva futura para o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes de BNZ.

Por fim, como a perspetiva de potenciar usos do BNZ, podem ser realizados estudos em infeções experimentais com *Leishmania infantum* e estudos de eficácia *in vitro* contra este parasita em modelo promastigota e amastigota-macrófago.

7. Bibliografia

- Akpa, P. O., Ezeokonkwo, R. C., Eze, C. A. & Anene, B. M. (2008). Comparative efficacy assessment of pentamidine isethionate and diminazene aceturate in the chemotherapy of *Trypanosoma brucei brucei* infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 139-149.
- Aksoy, S. (2011). Sleeping Sickness Elimination in Sight: Time to Celebrate and Reflect, but Not Relax. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2), 1-3.
- Ardelean, A. (Março de 2006). *Herpetomonas*. Acedido em 15 de Janeiro de 2013, de micro*scope 6.0: <http://starcentral.mbl.edu/microscope/>
- Authié, E., Boulangé, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F. & Musoke, A.J., 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *International journal for parasitology*, 31(13), pp.1429-33.
- Baral, T. N. (2010). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-24.
- Barr, S. C. (2006). *American Trypanosomiasis*. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd Edition* (pp. 677-681). St.Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R. & Tidwell, R. R. (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Brittish Journal of Pharmacology*, 152, 1155-1171.
- Barrett, M. P., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. (2004). *Future Prospects in Chemotherapy for Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 445-460). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Baudino, L., Silveira, S. A., Nakata, M. & Izui, S. (2006). Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Seminars on Immunology*, 28, 175–184.
- Bisser, S. & Courtioux, B. (2012). Sleeping sickness: end of the epidemic outbreak? *Reveu Neurologique*, 168(3), 230-238.
- Bisser, S., Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, O. N., Toure, F. S., Taoufiq, Z., Bouteille, B., Buguet, A. & Mazier, D. (2006). Harboring in the brain: A focus on immune evasion mechanisms and their deleterious effects in malaria and human African trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology*, 36, 529-540.
- Bouteille, B. & Buguet, A. (2012). The detection and treatment of human African trypanosomiasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 3, 35-45.
- Bowman, D. D. (2009). *Georgi's Parasitology for Veterinarians 9th Edition*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bowman, D. D., Hendrix, C. M., Lindsay, D. S. & Barr, S. C. (2001). *Feline Clinical Parasitology*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Burri, C., Stich, A. & Brun, R. (2004). *Current Chemotherapy of Human African Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 403-420). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Büscher, P. & Lejon, V. (2004). *Diagnosis of Human African Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 203-218). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Center for Disease Control and Prevention. (1 de Fevereiro de 2012). *Chagas's Disease*. Acedido em 22 de Junho de 2013, de Página do CDC: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>

- Center for Disease Control and Prevention. (29 de Agosto de 2012). *Sleeping Sickness*. Acedido em 5 de Novembro de 2012, de Página do CDC: <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/>
- Center for Food Safety and Public Health. (2009). *American Trypanosomiasis*. Iowa State University, Ames, Iowa.
- Ceva Africa. (2010). *Veridium*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Ceva África: <http://www.ceva-africa.com/>
- Chemical Book Inc. (2008). *Homidium Bromide*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Chemical Book Inc.: <http://www.chemicalbook.com/>
- Chemical Book Inc. (2008). *Melarsomine*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Chemical Book Inc.: <http://www.chemicalbook.com>
- Chemical Book Inc. (2010). *Isometamidium chloride*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Chemical Book Inc.: <http://www.chemicalbook.com>
- Coustou, V., Plazolles, N., Guengan, F. & Baltz, T. (2012). Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. *Cellular microbiology*, 14(3), 431-445.
- De Sousa, K. P., Atouguia, J. M. & Silva, M. S. (2011). Induced cytokine network during experimental African trypanosomiasis. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 3, 71-78.
- Decreto-Lei 39 209. (14 de Maio de 1953). *Diário da República nº100/53 - série I*. Ministério da Economia, Direcção-Geral dos Serviços Pecuários. Lisboa.
- Defontis, M., Richartz, J., Engelmann, N., Bauer, C., Schwierk, V. M., Buscher, P. & Moritz, A. (2012). Canine *Trypanosoma evansi* infection introduced into Germany. *Veterinary Clinical Pathology*, 41 (3), 369-374.
- Dirie, M. F., Ashford, R. W., Mungomba, L. M., Molyneux, D. H. & Green, E. E. (1990). Avian trypanosomes in *Simulium* and sparrowhawks (*Accipiter nisus*). *Parasitology*, 101(2), 243-247.
- Domingo, G. J., Palazzo, S. S., Wang, B., Pannicucci, B., Salavati, R. & Stuart, K. D. (2003). Dyskinetoplastic *Trypanosoma brucei* contains functional editing complexes. *Eukaryot Cell*, 2(3), 569-577.
- Drugs.com. (Agosto de 2010). *Immiticide*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Drugs.com: <http://www.drugs.com/pro/immiticide.html>
- Durden, L. A., McLean, R. G., Oliver, J. H., Ubico, S. R. & James, A. M. (1997). Ticks, Lyme disease spirochetes, trypanosomes, and antibody to encephalitis viruses in wild birds from coastal Georgia and South Carolina. *The Journal of Parasitology*, 83(6), 1178-1182.
- Earlham College. (4 de Abril de 2003). *Earlham College Senior Seminar 2003 - Trypanosomes*. Acedido em 18 de Junho de 2013, de Página da Earlham College: <http://legacy.earlham.edu/~martilu/trypanosomiasispathology.htm>
- Eisler, M. C., Dwinger, R. H., Majiwa, P. A. & Picozzi, K. (2004). Diagnosis and Epidemiology of African Animal Trypanosomiasis. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 253-268). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- El Sawalhy, A. A. (Maio de 2005). *Surra*. Acedido em 4 de Fevereiro de 2013, de Página do Departamento de Doenças Infeciosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Mansoura: <http://osp.mans.edu.eg/elsawalhy/Inf-Dis/surra.htm>
- ELEA. (2013). *Home*. Acedido em 22 de Junho de 2013, de Página do Laboratório ELEA: <http://www.elea.com/index.php>

- Enciclopaedia Britannica. (2013). *Tsetse fly*. Acedido em 5 de Novembro de 2012, de Enciclopaedia Britannica Online: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/607699/tsetse-fly>
- Ezeokonkwo, R. C., Ezeh, I., Onunkwo, J. & Obi, P. (2010). Comparative haematological study of single and mixed infections of mongrel dogs with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 48-54.
- Fernandes, J. H., Atouguia, J. M., Peleteiro, M. C., Jennings, F. W. & Rosário, V. E. (1997). Post-treatment hind-leg paralysis in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*: a light microscopic study. *Acta Tropica*, 63(2-3), 179-184.
- Gadelha, C., Holden, J. M., Allison, H. C. & Field, M. C. (2011). Specializations in a successful parasite: what makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly? *Molecular and biochemical parasitology*, 179(2), 51-58.
- Genevet Ltd. (29 de Maio de 2013). *Recerche*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Página da Genevet Ltd.: <http://www.genevetlimited.com/>
- Geurts, N., Opdenakker, G. & Van den Steen, P. E. (2012). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology and therapeutics*, 133, 257-279.
- Gonçalves, D.J.D. (Julho de 2011). *Efeito da Minociclina em Mus musculus infectados com Trypanosoma brucei brucei*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical. Lisboa, Portugal: IHMT-UNL.
- Greene, C. E. & Matete, G. (2006). *African Trypanosomiasis*. In C. E. Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd Edition* (pp. 681-685). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Gupta, N. & Gupta, D. K. (2012). Erythropenia in Piscine Trypanosomiasis. *Trends in Experimental Parasitology*, 1(1), 1-6.
- Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L. & Buscher, P. (2010). *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Veterinary Parasitology*, 174(1-2), 26-29.
- Hamilton, P. B., Gibson, W. C. & Stevens, J. R. (Julho de 2007). Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15–25.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S. & Larson, A. (2001). *Integrated Principles of Zoology, 11th edition*. New York City, New York: McGraw Hill.
- Holmes, P. H., Eisler, M. C. & Geerts, S. (2004). *Current Chemotherapy of Animal Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 431-444). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Humphrey, J., Benedict, S. & Small, L. (2010). *Steptococcosis, Trypanosomosis, Vibriosis and Bacterial Gill Disease in Sea-caged Barramundi at Port Hurd, Bathurst Island, July-August 2005*. Northern Territory Government, Australia: Fishery Report No. 98.
- International Atomic Energy Agency. (Fevereiro de 2002). *Feature Stories: Tsetse Fly Photo Gallery*. Acedido em 25 de Maio de 2013, de Página da Agência Internacional de Energia Atômica: <http://www.iaea.org/newscenter/features/tsetse/index.shtml>
- Intervet International. (2009). *Berenil*. Acedido em 19 de Junho de 2013, de Intervet S.A Peru: <http://www.msd-animal-health.com.pe/>
- Jones, A., Rodgers, J., Gibaud, S., Bradley, B., McCabe, C., Barrett, M. P., Gettinby, G., Kennedy, P. G. (2011). Melarsoprol Cyclodextrin Inclusion Complexes as Promising Oral Candidates for the Treatment of Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), 1-10.

- Joshua, R. A. (1983). Massive increase in splenic germinal centres of chickens experimentally-infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Veterinary Parasitology*, 13(2), 101-108.
- Kaminsky, R., Schmid, C. & Lun, Z. R. (1997). Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride. *Parasitology Research*, 83(8), 816-818.
- Kubata, B. K., Duszenko, M., Martin, K. S. & Urade, Y. (2007). Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends in Parasitology*, 23(7), 325-331.
- Lança, A. S., De Sousa, K. P., Atougua, J., Prazeres, D. M., Monteiro, G. A. & Silva, M. S. (2011). *Trypanosoma brucei*: Immunisation with plasmid DNA encoding invariant surface glycoprotein gene is able to induce partial protection in experimental African trypanosomiasis. *Experimental Parasitology*, 127, 18-24.
- Laveran, C. L. & Mesnil, F. E. (1912). *Trypanosomes et trypanosomiasis*. Paris: Mason et Cie.
- Li, S.Q., Fung, M.C., Reid, S.A., Inoue, N., Lun, Z.R., 2007. Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite immunology*, 29(4), pp.191-9.
- Li, S.Q., Yang, W.B., Ma, L.J., Xi, S.M., Chen, Q.L., Song, X.W., Kang, J. & Yang, L.Z., 2009. Immunization with recombinant actin from *Trypanosoma evansi* induces protective immunity against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection. *Parasitology research*, 104(2), pp.429-35.
- Lopes, E. R. & Chapadeiro, E. (2004). *Pathogenesis of American Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 303-332). Wellington; Oxfordshire: CAB International.
- Lubega, G.W., Byarugaba, D.K. & Prichard, R.K., 2002. Immunization with a tubulin rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Experimental Parasitology*, 102(1), pp.9-22.
- MacLean, L., Reiber, H., Kennedy, P. G. & Sternberg, J. M. (2012). Stage progression and neurological symptoms in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness: role of the CNS inflammatory response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1857.
- Masocha, W., Amin, D. N., Kristensson, K. & Rottenberg, M. E. (2008). Differential invasion of *Trypanosoma brucei brucei* and lymphocytes into the brain of C57BL/6 and 129Sv/Ev mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68(5), 484-491.
- Matthews, K. (20 de Outubro de 2010). *Got a hold on Bayer*. Acedido em 20 de Junho de 2013, de The Matthew's story: <http://thematthewsstory.com/2010/10/20/got-a-hold-of-bayer/>
- Matthews, K. R., Ellis, J. R. & Paterou, A. (2004). Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in Parasitology*, 20(1), 40-47.
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146 (Parte A), 601–620.
- Michigan State University. (2013). *Unit Four: Regional Perspectives*. Acedido em 10 de Março de 2013, de Exploring Africa: <http://exploringafrica.matrix.msu.edu/>
- Miles, M. A., Yeo, M. & Gaunt, M. W. (2004). *Epidemiology of American Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 243-252). Wellington, Oxfordshire: CAB International.

- Minagawa, N. (2012). Mitochondria as Targets of Chemotherapy. *Yakugaku Zasshi*, 132(10), 1093-1098.
- Minter-Goedbloed, E. (1981). The susceptibility of chickens to *Trypanosoma brucei* subspecies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 345-349.
- Mkunza, F., Olaho, W.M. & Powell, C.N., 1995. Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Vaccine*, (13), pp.151-154;
- Moloo, S. K., Losos, G. J. & Kutuza, S. B. (1973). Transmission of *Trypanosoma brucei* to cats and dogs by feeding of infected goats. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 67(3), 331-334.
- Molyneux, D. H., Cooper, J. E. & Smith, W. J. (1983). Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection in experimentally infected canaries. *Parasitology*, 87 (1), 49-54.
- Murray, M., d'Ieteren, G. D. & Teale, A. J. (2004). *Trypanotolerance*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 461-477). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry. (2009). *Import risk analysis: Cats, dogs and canine semen*. Wellington, Nova Zelândia: MAF Biosecurity New Zealand.
- Njiokou, F., Nimpaye, H., Simo, G., Njitchouang, G. R., Asonganyi, T., Cuny, G. & Herder, S. (2010). Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite*, 17(1), 61-66.
- Njiru, Z. K., Constantine, C. C., Ndung'u, J. M., Robertson, I., Okaye, S., Thompson, R. C. & Reid, S. A. (2004). Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. evansi tests in Kenya. *Veterinary Parasitology*, 124(3-4), 187-199.
- Nolan, D. P., Garcia-Salcedo, J. A., Vanhamme, L. & Pays, E. (2004). Communication in trypanosomatids. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A., *The Trypanosomiases* (pp. 59-76). Wallington, Oxfordshire: CAB International.
- Oba, A., Gahtse, A., Bowassaa, G. E., Nika, E. & Obengui. (2011). La trypanosomiase humaine africaine congénitale : une observation au centre hospitalier universitaire de Brazzaville (Congo). *Archives de Pédiatrie*, 18(10), 1112-1114.
- Olivieri, B. P., Cotta-de-Almeida, V. & Araújo-Jorge, T. (2002). Benznidazole Treatment following Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers CD8+ T-Cell Expansion and Promotes Resistance to Reinfection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 3790–3796.
- Pentreath, V. W. & Kennedy, P. G. (2004). *Pathogenesis of Human African Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 283-302). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Poltera, A. A., Hochmann, A. & Lambert, P. H. (1981). *Trypanosoma brucei brucei*: the response to Melarsoprol in mice with cerebral trypanosomiasis. An immunopathological study. *Clinical experimental Immunology*, 46, 363-374.
- Rassi, A. & Luquetti, A. O. (2004). *Current Chemotherapy of American Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 421-429). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Radwanska, M., Magez, S., Dumont, N., Pays, A., Nolan, D. & Pays, E., 2000. Antibodies raised against the flagellar pocket fraction of *Trypanosoma brucei* preferentially recognize HSP60 in cDNA expression library. *Parasite immunology*, 22(12), pp.639-50.

- Ramey, K., Eko, F.O., Thompson, W.E., Armah, H., Igietseme, J.U. & Stiles, J.K., 2009. Immunolocalization and challenge studies using a recombinant *Vibrio cholerae* ghost expressing *Trypanosoma brucei* Ca(2+) ATPase (TBCA2) antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(3), pp.407-15.
- Rocha, G., Martins, A., Gama, G., Brandão, F. & Atouguia, J. (2004). Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *The Lancet*, 363, 247.
- Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D., Massara, R., Borges, J., Lana, M., Teixeira-Carvalho, A., Dias, J., Elói-Santos, S. & Martins-Filho, O. (2006). Benznidazole Treatment during Early-indeterminate Chagas' Disease Shifted the Cytokine Expression by Innate and Adaptive Immunity Cells toward a Type 1-modulated Immune Profile. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64, 554–563.
- Silva, M. S., Prazeres, D. M., Lança, A., Atouguia, J. & Monteiro, G. A. (2009). Transsialidase from *Trypanosoma brucei* as a potential target for DNA vaccine development against African trypanosomiasis. *Parasitol Research*, 105, 1223-1229.
- Silva, R. A., Seidl, A., Ramirez, L. & Dávila, A. M. (2002). *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* - *Biologia, Diagnóstico e Controle*. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal.
- Simarro, P. P., Cecchi, G., Franco, J. R., Paone, M., Diarra, A., Ruiz-Postigo, J. A., Fèvre, E., Mattioli, R. & Jannin, J. G. (2012). Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), 1-12.
- Simarro, P. P., Jannin, J. & Cattand, P. (2008). Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next? *PLoS Medicine*, 5(2), 174-180.
- Sirois, M. (2005). *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.
- Stevens, J. R. & Brisse, S. (2004). *Systematics of Trypanosomes of Medical and Veterinary Importance*. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 1-24). Wallington, Oxfordshire: CAB International.
- Stijlemans, B., Baral, T.N., Guilliams, M., Brys, L., Korf, J., Drennan, M., Van Den Abbeele, J., De Baetselier, P. & Magez, S., 2007. A glycosylphosphatidylinositol-based treatment alleviates trypanosomiasis-associated immunopathology. *The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists*, 179(6), pp.4003-14.
- Tavira, L. T. (2002). *Parasitologia*. In W. F. Ferreira & J. C. de Sousa, *Microbiologia: Volume 3* (pp. 428-430). Lisboa: Lidel.
- Taylor, K. & Authié, E. M.-L. (2004). *Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis*. In I. Maudlin, P. Holmes & M. Miles, *The Trypanosomiasis* (pp. 331-353). Wallington, Oxfordshire: CAB International.
- Teixeira, A. F. (08 de Julho de 2013). *Clonagem e expressão génica de potenciais candidatos antigénicos do parasita Trypanosoma brucei brucei*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica. Lisboa, Portugal: IHMT-UNL.
- Teixeira, A. R., Gomes, C., Nitz, N., Sousa, A. O., Alves, R. M., Guimaro, M. C., Cordeiro, C., Bernal, F. M., Rosa, A. C., Hejnar, J., Leonardecz, E & Hecht, M. M. (2011). *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e1000.
- Telford, S. R. (2009). *Hemoparasites of the Reptilia - Colour Atlas and Text*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Texas A&M University. (3 de Setembro de 2012). A Field Guide to Common Texas Insects. Acedido em Novembro de 2012, de Página do Departamento de Entomologia da Texas A&M University: <https://insects.tamu.edu/fieldguide/>

- The Journal of Undergraduate Biological Studies. (2010). *Protozoan and Helminth Parasites: Immune Evasion*. Acedido em 30 de 06 de 2013, de Página do Paathogen Profile Dictionary: http://www.ppdictionary.com/parasites_3.htm
- Torrelee, E., Trunz, B. B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazue, G., . . . Pécoul, B. (2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 1-12.
- Tree of Life Project. (2 de Janeiro de 2009). *Crithidia*. Acedido em 15 de Janeiro de 2013, de Página de internet do projeto Tree of Life: <http://tolweb.org/Crithidia/98017>
- Ulisses de Carvalho, T. (2012). Optical microscopy observations of *Trypanosoma cruzi*. Acedido em 9 de Setembro de 2013, de Página da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): http://www.fiocruz.br/chagas_eng/
- Université Médicale Virtuelle Francophone. (30 de Abril de 2012). *Campus Parasitologie - Trypanosomose Humaine Africaine (Maladie du sommeil)*. Acedido em 18 de Junho de 2013, de Página da Université Médicale Virtuelle Francophone: <http://umvf.univ-nantes.fr/parasitologie/>
- University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine. (2008). Computer Aided Learning. Acedido em Julho de 2013, de Página do Departamento de Parasitologia Veterinária da Penn University: <http://cal.vet.upenn.edu/projects/parasit06/website/lab2.htm>
- Ventura, R. M., Takata, C. S., Silva, R. A., Nunes, V. L., Takeda, G. F. & Teixeira, M. M. (2000). Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *Journal of Parasitology*, 86(6), 1289-1298.
- Viana, M. S. (2010). *Características hematológicas e ocorrência de hemoparasitas em aves de rapina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa, Portugal: FMV-UTL. Acedido em Novembro de 2012 em Repositório da UTL: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/2910>.
- Votýpka, J. & Svobodová, M. (2004). *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92(2), 147-151.
- Votýpka, J., Obornik, M., Volf, P., Svobodová, M. & Lukes, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125(3), 253-263.
- Vulpiani, M. P., Carvelli, A., Giansante, D., Iannino, F., Paganico, D. & Ferri, N. (2013). Reemergence of Dourine in Italy: Clinical Cases in Some Positive Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 468-474.
- Welburn, S. C., Fèvre, E. M., Coleman, P. G. & Maudlin, I. (2004). Epidemiology of Human African Trypanosomiasis. In I. Maudlin, P. H. Holmes & M. A. Miles, *The Trypanosomiases* (pp. 219-232). Wellington, Oxfordshire: CAB International.
- Workman, P., White, R. A., Walton, M. I., Owen, L. N. & Twentyman, P. R. (1985). Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Brittish Journal of Cancer*, 50, 291-303.
- World Organization for Animal Health. (Outubro de 2009). OIE Disease Cards. Paris, França: OIE.
- World Organization for Animal Health. (2010). Chapter 2.1.17.: *Trypanosoma evansi* Infection (Surra). In W. O. Health, *OIE Terrestrial Manual 2010* (pp. 1-14). Paris: OIE.
- World Organization for Animal Health. (2013). Chapter 2.4.17.: *Trypanosomosis* (tsetse-transmitted). In W. O. Health, *OIE Terrestrial Manual 2013* (pp. 1-11). Paris: OIE.
- Zídková, L., Cepicka, I., Szabová, J. & Svobodová, M. (2011). Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 102-112.

Ziegelbauer, K. & Overath, P., 1993. Organization of Two Invariant Surface Glycoproteins in the Surface Coat of *Trypanosoma brucei*. *Infection and Immunity*, 61(11), pp.4540-4545.

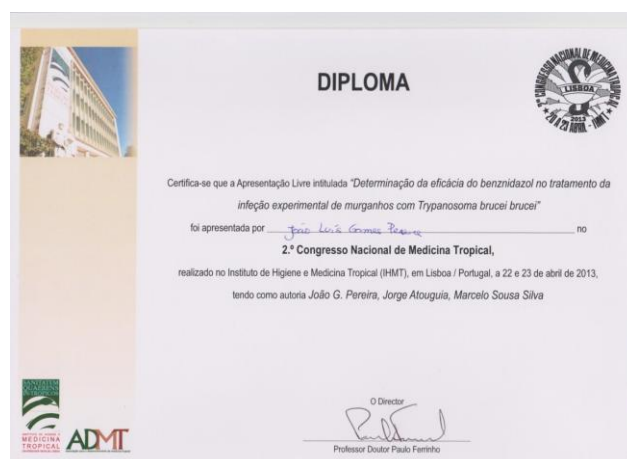
Anexo A

Certificados de comunicações orais:

Anexo A-1 - Certificado de participação como palestrante nas comemorações do II Aniversário do FAUNA a 23/10/12.



Anexo A-2 - Certificado de apresentação oral no 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical no dia 22/04/13.



Abstracts submetidos e aceites para apresentação em poster.

Anexo A-3: Abstract aceite para XI World Conference in Inflammation

Characterization of immune response in experimental murine African Trypanosomiasis treated with Benznidazole

JOÃO GOMES PEREIRA^{1,2}; JORGE MARQUES ATOUGUIA¹; MARCELO SOUSA SILVA¹

¹: Centre for Malaria and Tropical Diseases, Institute for Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon;

²: Faculty of Veterinary Medicine – University of Lisbon

Introduction: African Trypanosomiasis (AT) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma brucei* subspecies to human and animals in Sub-Saharan Africa [Parasit. Vectors. 3(1):15, 2010]. There are some efforts in order to produce new medications for AT in the absence of an effective vaccine. The medications currently in use are quite toxic, and some of them have reported resistances (Br. J. Pharmacol. 152:1155–1171, 2007). Therefore, there is a dire need to discover novel molecules less toxic and more effective against this disease. Benznidazole (BNZ) is an antichagasic of the nitroimidazole family. This molecule is the standart of treatment for Chagas disease, and was considered for mucocutaneous leishmaniasis. The mechanism of action is still poorly understood, being generally accepted that the main mechanism is the production of reactive nitrogen species that damage nucleic acids (Br. J. Cancer 50:291-303, 1984). Being highly liposoluble, BNZ crosses the blood brain barrier with ease, making it a good candidate for treating second stage of AT. The objective of this work is to ascertain differences in immune response in the treatment of murine AT with BNZ.

Methods and results: 24 CD-1 strain mice were infected IP with a dose of 500 parasites per animal of the *T.brucei brucei* GVR35/1.6 strain. The infection was detected in all animals by stained thick smear in the 6th day post-infection (DPI). 12 animals were medicated *per os* with the pediatric dose of BNZ (10mg/kg SID) from the 12th DPI until the death of the first animal (22nd DPI), 12 were untreated. 12 animals from both groups were sacrificed, 6 on 14DPI and 6 on 26DPI, to collect serum for anti-*T.brucei* (α -*Tbb*) antibody ELISA and cytokine quantification (IL-4, IFN- γ , TGF- β 1 and NO), compared with healthy controls. Parasitemia and survival were measured constantly during the duration of the experiment. The results show no significant differences in parasitemia and survival in both groups ($p=0.441$ and $p=0.507$, respectively). As for α -*Tbb* IgG1, IgG2a, IgG3 and IFN- γ , there were significant differences between the two groups (IgG1: $p(26DPI)<0.001$; IgG2a: $p(14DPI)<0.01$; $p(26DPI)<0.001$; IgG3: $p(14DPI)<0.05$; $p(26DPI)<0.001$; IFN- γ : $p(14DPI)<0.01$).

Conclusion: The results show that although clinically BNZ is ineffective in treating AT, it tends to stimulate a Th-1 response with increased titers of α -*Tbb* IgG subclasses and IFN- γ .

Financial support: The authors thank Berenice for the financial support.

Anexo A-4: Abstract aceite para iMed5.0

Determination of pharmacological effectiveness of Benznidazole in experimental African Trypanosomiasis.

João Gomes Pereira^{1,2}; Jorge Marques Atouguia¹; Marcelo Sousa Silva¹

¹Centre for Malaria and Tropical Diseases, Institute for Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon; ² Faculty of Veterinary Medicine – University of Lisbon

African Trypanosomiasis (AT) is a neglected disease transmitted by the haemoparasite protozoan *Trypanosoma brucei*. This species is divided in three subspecies: *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* responsible by the chronic and acute forms of sleeping sickness in man and *Trypanosoma brucei brucei*, one of the main agents of Animal African Trypanosomiasis, or *Nagana*, responsible for significant economic losses.

There are some efforts in order to produce new medications for AT or an effective vaccine. The medications currently in use are quite toxic, and some of them have reported resistances. Therefore, there is a dire need to discover novel molecules less toxic and more effective against this parasite.

Benznidazole (BNZ) is an antichagasic of the nitroimidazole family. This molecule is the standart of treatment for Chagas disease, and was considered for mucocutaneous leishmaniasis. The mechanism of action is still poorly understood, being generally accepted that the main pharmacological action is the production of reactive oxygen and nitrogen species that cause oxidative stress and damage nucleic acids. Being highly liposoluble this molecule crosses the blood brain barrier with ease, rendering it a good candidate for treating second stage of AT.

This drug was tested in 24 CD-1 mice infected with 500 parasites per animal of the *Trypanosoma brucei brucei* GVR 35/1.6 strain. The infection was confirmed at the 6th day post-infection by blood smear. All animals were medicated with benznidazole (Abarax® 50mg – ELEA Argentina), using the human pediatric dose of 10mg/kg SID, for 11 days until the natural death of the first animal. The variables measured were weight gain, parasitaemia and survival. Six animals were sacrificed in order to collect blood for antibody-ELISA, and cytokine quantification in two different points and were compared with healthy controls.

Both groups had tendency to weight loss, greater in the untreated animals. The parasitaemia and survival differences between the two groups were not statistically significant by the Two-way ANOVA and Mantel-Cox Tests, respectively. The antibody-ELISA results have shown the tendency for statistically significant higher titers of IgG1, IgG2a and IgG3 in the treated group by Two-way ANOVA. The cytokine quantification showed significant increase in IFN- γ in the transition between acute and chronic phase of the infection (14 days post-infection) in the treated group, with the test cited above. In conclusion, clinically this course of treatment with BNZ was ineffective to treat the infection and to improve the survival of the treated animals. Immunologically, BNZ stimulated a Th1 pattern immune response, and furthermore may be useful in other diseases that disrupt Th1 responses, like leishmaniasis, AIDS and mycobacteriosis.

Bibliography:

- Barrett, M. P., Vincent, I. M., Burchmore, R. J., Kazibwe, A. J., & Matovu, E. (2011). Drug resistance in human African trypanosomiasis. *Future Microbiol*, 6(9), 1037-1047.
- Maudlin, I., Holmes, P. H., & Miles, M. A. (2004). *The Trypanosomiasis*. Wallington, Oxfordshire: CAB International.
- Workman, P.; White, R.A.S.; Walton, M.I.; Owen, L.N.; Twentyman, P.R. (1984). Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br. J. Cancer*, 50, 291-303.

Anexo B - Análise estatística realizada no decurso do trabalho experimental

Ensaio de infeção por via oral:

Anexo B-1 - Resultado da análise estatística no ensaio de infeção por via oral recorrendo ao teste *One-way ANOVA*.

Valor F	Valor P	Significância estatística entre que pares (Após correção de Bonferroni)
10,88	0,013	VO 500p/animal ; VO 2x10 ⁵ p/animal; C. Negativo versus C.positivo

Ensaio de eficácia farmacológica do BNZ:

Anexo B-2 - Resultados das análises estatísticas para os Pesos recorrendo ao *Wilcoxon rank-sum test*.

Ensaio	Valor P	Significância do teste ($\alpha=0,05$)	Coeficiente de correlação (r)	Valor P (análise de emparelhamento)	Eficácia do emparelhamento
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico curto	0,004	Significativo	0,008	0,491	Ineficaz
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico longo	0,014	Significativo	0,8500	0,0014	Eficaz

Anexo B-3 - Resultados das análises estatísticas para as Parasitêmias médias recorrendo ao *Wilcoxon rank-sum test*.

Ensaio	Valor P	Significância do teste ($\alpha=0,05$)	Coefficiente de correlação (r)	Valor P (análise de emparelhamento)	Eficácia do emparelhamento
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico curto	0,151	Não significativo	0,781	0,001	Eficaz
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico longo	0,441	Não significativo	0,897	0,002	Eficaz

Anexo B-4 - Resultados das análises estatísticas para as Sobrevivências recorrendo ao *Mantel-Cox log-rank test*.

Ensaio	χ^2	Graus de liberdade	Valor P	Significância ($\alpha=0,05$)
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico curto	0,378	1	0,539	Não significativo
Determinação da eficácia do BNZ em protocolo terapêutico longo	0,441	1	0,507	Não significativo

Anexo B-5 – Resultados das análises estatísticas para as variáveis hematológicas usando os testes *Two-way ANOVA* e *Wilcoxon rank-sum test*.

Variável hematológica	Valor F para a variável tratamento (quando aplicável)	Valor P	Significância estatística entre que pares (Após correção de Bonferroni, quando aplicável)	
Contagem de eritrócitos	2,92	0,163	-	-
Hematócrito	1,33	0,313	-	-
Hemoglobina	1,28	0,321	-	-
VCM	4,15	0,111	26DPI tratados vs 26 DPI controlos	P<0,05
CHCM	8,20	0,050	26DPI tratados vs 26 DPI controlos	P<0,001
RDW	0,20	0,680	-	-
Contagem de leucócitos	<0,01	0,947	-	-
Granulócitos	0,09	0,783	-	-
Linfócitos	0,38	0,573	-	-
Monócitos e blastos	2,16	0,216	-	-
Contagem de plaquetas	-	0,167	-	-

Anexo B-6 - Resultados da análise estatística com recurso a *Two-way ANOVA* para as titulações de IgG e IgM

Classe de Imunoglobulina	Valor F (variável tratamento)	Valor P (variável tratamento)	Significância estatística entre que pares (Após correção de Bonferroni)
IgG	0,64	0,468	-
IgM	0,09	0,778	-

Anexo B-7 - Resultados da análise estatística com recurso a *Two-way ANOVA* das titulações de subclasses de IgG: IgG1, IgG2a e IgG3.

Subclasse de IgG	Valor F (variável tratamento)	Valor P (variável tratamento)	Significância estatística entre que pares (Após correção de Bonferroni)
IgG1	4,16	0,069	26DPI Tratados vs 26DPI Controlos P<0,001
IgG2a	1,04	0,332	14DPI Tratados vs 14DPI Controlos P<0,01
			26DPI Tratados vs 26DPI Controlos P<0,001
IgG3	2,65	0,134	14DPI Tratados vs 14DPI Controlos; P < 0,05
			26DPI Tratados vs 26DPI Controlos P<0,001

Anexo B-8 - Resultados da análise estatística com recurso a *Two-way ANOVA* das quantificações de citocinas.

Citocina	Valor F (variável tratamento)	Valor P (variável tratamento)	Significância estatística entre que pares (Após correção de Bonferroni)
IL-4	2,64	0,180	-
IFN-γ	4,56	0,100	14 DPI Controlos versus 14 DPI Tratados P<0,05
TGF-β1	1,97	0,233	-
NO	0,41	0,558	-

