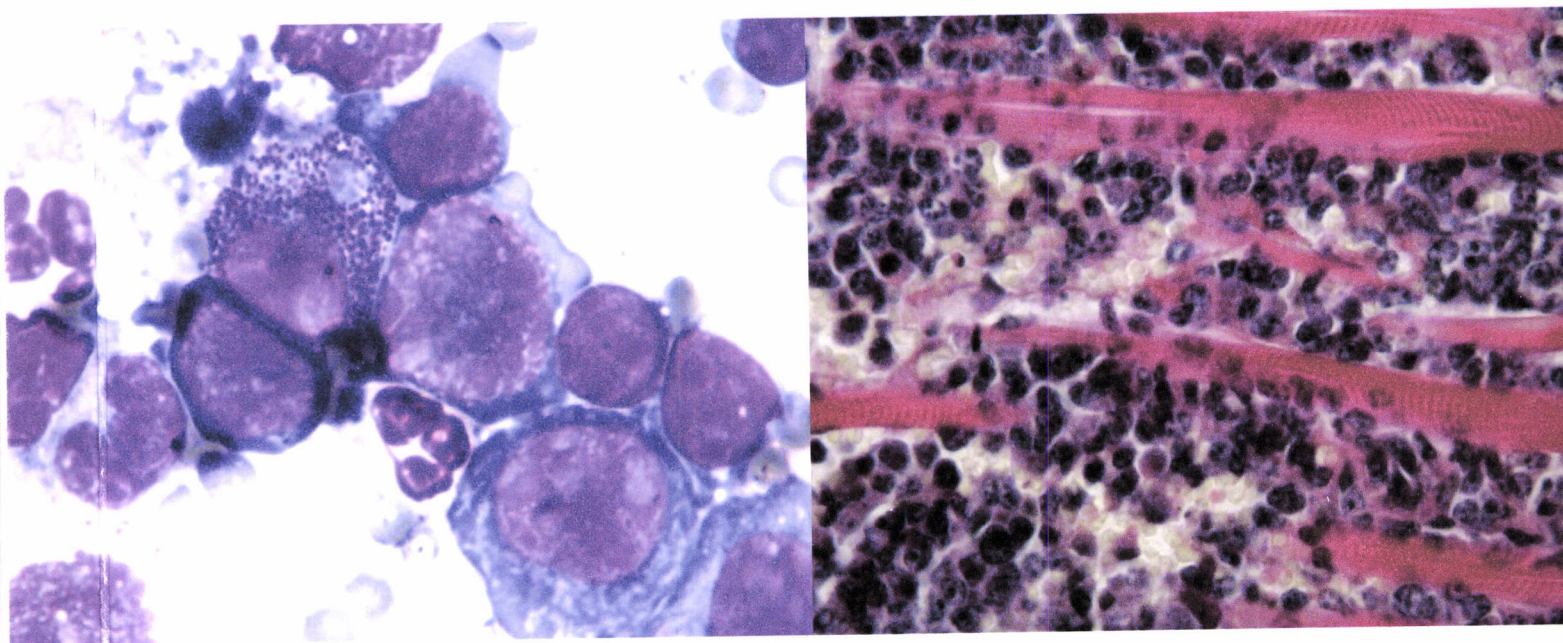




Caracterização morfológica das lesões de tipo neoplásico em vitelos infectados por *Theileria annulata*



Doutoranda: Sandra Maria da Silva Branco

Orientador: Maria da Conceição Peleteiro

Évora – 2010

Caracterização morfológica das lesões de tipo neoplásico em vitelos infectados por *Theileria annulata*

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária

Doutoranda: Sandra Maria da Silva Branco

Orientador: Maria da Conceição Peleteiro



176 409

Resumo

O presente trabalho descreve 16 casos de infecções agudas fatais pelo protozoário *Theileria annulata* em vitelos (idade ≤ 4 meses), que ocorreram no sul de Portugal. Os animais apresentaram intensa infestação por carrças do género *Hyalomma* e exibiram nódulos multifocais, dispersos na pele e linfadenomegália generalizada, semelhante a um linfoma maligno multicêntrico. Nos esfregaços de sangue e de linfonodo foram observadas formas de *Theileria annulata*. Na necrópsia foram identificados nódulos hemorrágicos, ou de halo hemorrágico, na pele, tecido subcutâneo, músculos esqueléticos, músculo cardíaco, faringe, traqueia e serosa intestinal. Histologicamente estes nódulos eram constituídos por células redondas, grandes, semelhantes a células linfoblásticas neoplásicas. Para identificação imunohistoquímica (IHC) das células que constituíam as lesões utilizaram-se em fragmentos de pele, tecido muscular esquelético e linfonodos, dois anticorpos monoclonais (anti-CD79 α y e anti-proteína mielomonocítica L1) e um policlonal (anti-CD3), respectivamente, para linfócitos B, macrófagos e linfócitos T. As células identificadas eram maioritariamente linfócitos T e macrófagos e mais raramente linfócitos B. Os esquizontes de *Theileria annulata* foram identificados por IHC através do uso de dois anticorpos monoclonais (1C7 e 1C12) e um anticorpo policlonal (R2185), anti-*Theileria annulata*. Foi realizado estudo ultraestrutural (microscopia electrónica de transmissão) das lesões nodulares, confirmando-se a presença de formas compatíveis com *Theileria annulata* no citoplasma de macrófagos. A análise do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt; fragmentos da região de controlo hipervariável D-loop) permitiu o estudo preliminar da clonalidade das células presentes nas lesões. As alterações observadas nos diferentes órgãos e tecidos parecem resultar da proliferação e disseminação de macrófagos infectados, produtores de citocinas, que estimulam a multiplicação descontrolada de linfócitos T.

Palavras chave: *Theileria annulata*, teileriose tropical, protozoário, proliferação de células linfóides

Morphological characterization of neoplastic-like lesions in calves infected with *Theileria annulata*

Abstract

The present work describes 16 cases of acute lethal infection by protozoan *Theileria annulata* in calves (≤ 4 months of age), occurring in the south of Portugal. Infestation with ticks (genus *Hyalomma*) was intense. The calves developed multifocal to coalescent nodular skin lesions and lymph node enlargement, similar to multicentric malignant lymphoma. *Theileria annulata* was seen in blood and lymph node smears. At necropsy, hemorrhagic nodules or nodules with a hemorrhagic halo were seen, particularly in the skin, subcutaneous tissue, skeletal and cardiac muscle, pharynx, trachea and intestinal serosa. Histologically the nodules were formed by large, round, lymphoblast neoplastic-like cells. Immunohistochemistry (IHC) was used for labelling in sections of skin and skeletal muscle nodules and lymph node with two monoclonal primary antibodies (anti-CD79 α cy and anti-myelomonocytic L1 protein) and one polyclonal primary antibody (anti-CD3), for B cells, macrophages and T cells, respectively. The cells present in the nodules were mostly T lymphocytes and macrophages. Very few B lymphocytes were also identified. *Theileria annulata* schizonts were also identified by IHC, through the use of two monoclonal antibodies (1C7 and 1C12) and one polyclonal antibody (R2185) anti-*Theileria annulata*. An ultrastructural (transmission electron microscopy) characterization of the lesions was performed and confirmed the presence of *Theileria annulata*-like organisms in the cytoplasm of macrophages. A mitochondrial desoxirribonucleic acid (DNAMt) analysis (D-loop fragments hypervariable control region) was used to perform a preliminary assessment of the clonality of the cells identified in the lesions. Changes in different organs and tissues were finally considered as being the result of proliferation and dissemination of cytokine producing and schizont infected macrophages, which stimulate the uncontrolled and severe proliferation of T lymphocytes.

Key words: *Theileria annulata*, tropical theileriosis, protozoa, lymphoid cell proliferation

Agradecimentos

Em primeiro lugar destaco a Professora Doutora Maria da Conceição Peleteiro, orientadora do presente trabalho, por todo o apoio prestado, “minha” professora de sempre na área da patologia veterinária. Obrigada ainda pelo apoio pessoal e amizade desenvolvida.

Aos Professor Doutor Costa Durão, Dr^a Madalena Monteiro e Dr. Rui Baptista, com quem aprendi muito, com quem continuarei a aprender e com quem tanto ficou por aprender....

A todos os colegas docentes e amigos não docentes do Departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, pelo apoio e carinho constante.

À Professora Doutora Paula Soares, Professor Doutor Valdemar Máximo e restantes investigadores do grupo “Cancer Biology” do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), pelo que me ensinaram, pela disponibilidade e simpatia com que sempre me receberam.

Ao Professor Doutor Brian Shiels pela cedência dos anticorpos anti-*Theileria annulata* e pela valiosa colaboração na revisão do artigo, aceite para publicação, na revista “Journal of Veterinary Science”.

Ao Professor Doutor Alexandre Leitão pela preciosa colaboração ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Pedro Matos pela colaboração nos trabalhos de microscopia electrónica.

À Professora Doutora Maria Ivone Clara, docente desta casa, minha primeira “chefe”, por todo o apoio e amizade desde o primeiro dia e que se mantém até hoje...

Ao Professor Doutor Manuel Cancela D`Abreu pela disponibilidade e amizade quotidiana.

À Luísa Fialho, licenciada em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica pelo profissionalismo, dedicação e ajuda na execução técnica dos trabalhos de laboratório.

Às minhas “companheiras” e amigas Catarina Lavrador e Elsa Duarte, obrigada por tantos momentos de apoio, incentivo e amizade.

À minha amiga Elisa Bettencourt pela amizade e apoio neste trabalho.

Aos meus colegas de todos os dias Ricardo Alves, Ricardo Romão, Nuno Alexandre e Teresa Figueiredo, pela amizade e incentivo.

Ao Pedro pela sensibilidade e honestidade com que vive todos os dias, contagiando quem o rodeia.

Aos meus pais, por tudo.... aos meus irmãos e cunhada pelo carinho constante.

À minha filha Madalena, a pessoa mais importante na minha vida, obrigada por, nesta fase, ter aceite não ser o centro das atenções...

Índice geral

Resumo.....	
Abstract.....	
Agradecimentos.....	i
Índice geral.....	iii
Índice de siglas e abreviaturas.....	vii
Prefácio.....	ix
Introdução geral.....	1
Taxonomia.....	1
Ciclo biológico.....	1
Epidemiologia.....	2
Sinais Clínicos.....	3
Patogenia.....	3
Bibliografia.....	9
Capítulo I: Caracterização macroscópica e microscópica das lesões identificadas em vitelos infectados por <i>Theileria annulata</i>	17
Introdução.....	17
Materiais e Métodos.....	17
Resultados.....	20
História Clínica.....	20
Exames citológicos.....	20
Exame anatomopatológico.....	22
Estabelecimento de linhas celulares infectadas com esquizontes e identificação do parasita.....	27
Discussão.....	27
Conclusão.....	34
Bibliografia.....	34
Capítulo II: Avaliação imunohistoquímica das lesões identificadas em vitelos infectados por <i>Theileria annulata</i>	43
Introdução.....	43
Materiais e Métodos.....	43
Resultados.....	46
Discussão.....	51
Conclusão.....	55
Bibliografia.....	55

Capítulo III: Identificação imunohistoquímica de esquizontes de <i>Theileria annulata</i>	61
Introdução.....	61
Materiais e Métodos.....	62
Resultados.....	63
Discussão	69
Conclusão.....	72
Bibliografia.....	73
Capítulo IV: Caracterização ultraestrutural (Microscopia Electrónica de Transmissão) das lesões identificadas em vitelos infectados por <i>Theileria annulata</i>	77
Introdução.....	77
Materiais e Métodos.....	78
Resultados.....	78
Discussão	81
Conclusão.....	82
Bibliografia.....	82
Capítulo V: Avaliação da clonalidade da população celular das lesões identificadas em vitelos infectados por <i>Theileria annulata</i> por análise do ADN mitocondrial	85
Introdução.....	85
Materiais e Métodos.....	87
Resultados.....	91
Discussão	93
Conclusão.....	95
Bibliografia.....	95
Conclusão geral.....	99
Anexos	I
Anexo I – Colorações de rotina utilizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora	II
Anexo II – Culturas celulares e identificação dos parasitas	V
Anexo III – Metodologia utilizada para imunohistoquímica com os anticorpos primários anti-CD79 α c γ , anti-CD3 e anti-proteína mielomonocítica L1	VII
Anexo IV – Soluções e coloração de contraste utilizadas para imunohistoquímica no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora	IX
Anexo V – Metodologia utilizada para imunohistoquímica com os anticorpos anti- <i>Theileria</i> (1C7, 1C12 e R2185)	XII
Anexo VI – Metodologia utilizada para microscopia electrónica de transmissão.....	XIV

Anexo VII – Protocolos das reacções de PCR para amplificação de dois fragmentos de ADNmt e para sequenciação dos produtos obtidos	XVII
Anexo VIII – Publicações	XIX

Índice de siglas e abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADNmt – ácido desoxirribonucleico mitocondrial

AP-1 – proteína activadora 1

ARN – ácido ribonucleico

ARNr – ácido ribonucleico ribossómico

BLV – vírus da Leucose Bovina

C – Citosina

CD – “cluster of differentiation”

DAB – 3.3` - diaminobenzidina

D-loop – “Displacement loop”

EC – “Enzyme Commission number”

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

H-E – hematoxilina-eosina

IgM – imunoglobulina M

IHC – imunohistoquímica

INF- α – interferão α

INF- γ – interferão γ

IL – interleuquina

Mc – monoclonal

MMP9 – metaloproteinase 9

N/C – relação núcleo/citoplasma

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

NF- κ B – factor nuclear κ B

pb – pares de bases

PBMC – células mononucleadas do sangue periférico

PBS – soro fisiológico tamponado

Pc – policlonal

PCR – reacção em cadeia da polimerase

TBS – solução tampão de Tris

TNF- α – factor de necrose tumoral α

Prefácio

Em Portugal, presume-se que a infecção por *Theileria annulata* é endémica, apesar da quase total inexistência de trabalhos publicados sobre esta doença. No entanto, vários laboratórios de diagnóstico veterinário, apresentam registos de infecções, principalmente de casos crónicos, por vezes, assintomáticos, verificados em animais adultos.

O único trabalho de que temos conhecimento sobre a doença foi desenvolvido pelo Professor Doutor José Luís Silva Leitão em 1945, intitulado “Theileriose bovina em Portugal” e publicado no Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária, volume II. Já neste trabalho se chamou a atenção para a importância da teileriose no nosso país e para a elevada quantidade de animais afectados:

“Mas este problema, porque na realidade se trata de problema importante para a nossa pecuária, apresenta aspectos que muito convém assinalar.”

“Esta esporozoose, convém para isso chamar a atenção, tem certas características, que a tornam traiçoeira no ataque aos organismos e é de difícil combate.”

“A moléstia estendia-se a centenas de animais, que se apresentavam tristes, deprimidos, com anorexia, pêlo arrepiado, grande emagrecimento, astenia, diarreia profusa constante, antecedendo, por vezes, outro qualquer sintoma, ...”

Na região do sul do Alentejo, num período de tempo que se estendeu desde o final de 1999 até Novembro de 2007, assistiu-se ao aparecimento de casos de doença aguda e fatal em vitelos muito jovens (idade igual ou inferior a 4 meses de vida). O aparecimento súbito, o quadro clínico e o quadro lesional exuberante, semelhante a linfoma maligno multicêntrico, despertou-nos a atenção para esta situação, tendo sido desencadeados os procedimentos indispensáveis ao diagnóstico e controle da afecção. É desses procedimentos e das suas conclusões que se dá conta no texto desta tese.

Introdução geral

Como dissemos no Prefácio, durante o período que decorreu do final de 1999 até Novembro de 2007, assistiu-se ao aparecimento de casos de doença aguda e fatal em vitelos muito jovens, na região do sul do Alentejo. Estes vitelos desenvolveram um quadro de lesões nodulares multifocais, dispersas na pele e aumento generalizado do volume dos linfonodos, semelhante a linfoma maligno multicêntrico. Vários médicos veterinários que desenvolvem actividade clínica nesta região do país, confirmaram a ocorrência esporádica de casos semelhantes no passado, sem que nunca tivesse sido obtido o diagnóstico.

A procura de explicação para o processo em causa facilitou o acesso aos animais doentes, permitindo o estudo aprofundado da doença.

Ao longo do texto da presente tese, descreve-se como foi possível concluir que a doença em causa correspondia a forma particularmente grave de teileriose tropical.

A teileriose tropical, também designada febre da Costa Mediterrânica, é uma doença provocada pelo protozoário *Theileria annulata*. Afecta bovinos domésticos e ruminantes silvestres como o búfalo aquático asiático, *Bubalus bubalis* (Barnett, 1977; Urquhart *et al.*, 1996; Navarrete *et al.*, 1999; Minjauw & McLeod, 2003).

Taxonomia

A espécie *Theileria annulata* pertence ao Género *Theileria*, Família Theileriidae, Ordem Piroplasmida, Classe Esporozoa, Filo Apicomplexa e sub-Reino Protozoa (Levine *et al.*, 1980).

Ciclo biológico

O ciclo biológico, heteroxeno, comporta dois hospedeiros: o vertebrado e o vector, este último, ixodídeos do género *Hyalomma* (Caeiro, 1973; Barnett, 1977; Brown, 1990; Bussiéras & Chermette, 1992; Navarrete *et al.*, 1999).

No hospedeiro bovino, a infecção inicia-se pela picada da carraça infectada que inocula esporozoítos presentes nas suas glândulas salivares. Estes esporozoítos invadem preferencialmente macrófagos, embora os

linfócitos B possam também ser infectados (Glass *et al.*, 1989; Bussiéras & Chermette, 1992; Campbell *et al.*, 1994; Forsyth *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 1999). No citoplasma da célula alvo, os esporozoítos evoluem para trofozoítos que se multiplicam, formando estruturas multinucleadas delimitadas por membrana, os esquizontes ou corpos azuis de Koch. Estes evoluem para merozoítos que, por rotura da célula hospedeira, invadem os glóbulos vermelhos aproximadamente 8 a 10 dias pós-infecção, constituindo a forma infectante para os ixodídeos vectores (Bussiéras & Chermette, 1992; Navarrete *et al.*, 1999).

Na carraça, o protozoário desenvolve-se no intestino da mesma, onde se formam os macro e micro-gâmetas, que, após fusão, originam os zigotos. Estes evoluem para cinetos, que migram para as glândulas salivares. O desenvolvimento desta forma parasitária é bloqueada até maturação da carraça para novo estadio, onde evoluem para esporoblastos. Estes originam esporozoítos que serão transmitidos pelo novo estadio da carraça ao hospedeiro bovino (transmissão transtadial; Bussiéras & Chermette, 1992; Navarrete *et al.*, 1999).

Epidemiologia

A teileriose tropical distribui-se por vários países tropicais e subtropicais, desde o sul da Europa, África (principalmente região norte), Próximo e Médio Oriente e países sul asiáticos, como a Índia e China (Caeiro, 1973; Purnell, 1978; Bussiéras & Chermette, 1992; Urquhart *et al.*, 1996; Habela *et al.*, 1999; Minjauw & McLeod, 2003). Em muitos destes países, esta doença assume carácter endémico, sendo responsável por elevada morbilidade e perdas de produtividade nos animais de raças indígenas, mas assumindo mortalidade elevada em animais de raças importadas ou que resultam de cruzamento com estas (Brown, 1990; Preston *et al.*, 1992a; Urquhart *et al.*, 1996; Bakheit & Latif, 2002; Minjauw & McLeod, 2003; Glass *et al.*, 2005; Gharbi *et al.*, 2006; Glass & Jensen, 2007; Ahmed *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2008).

Em Portugal, apesar do conhecimento generalizado da existência da teileriose tropical, apenas foi possível identificar uma única referência a casos de infecção por *Theileria annulata* (Leitão, 1945). No entanto, o registo

laboratorial, baseado principalmente no diagnóstico de casos crónicos e por vezes, assintomáticos, é do conhecimento geral, presumindo-se que a doença é endémica na região Sul do país, embora a região Centro também seja afectada (Leitão, 1945; Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Esta distribuição está, seguramente, relacionada com a presença do vector nestas regiões e o sistema de exploração e desenvolvimento animal predominante (Caeiro, 1999; Navarrete *et al.*, 1999; Brígido *et al.*, 2004).

Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da teileriose tropical quando esta se manifesta na forma aguda, ou mesmo, hiperaguda, iniciam-se aproximadamente uma semana após a infecção, caracterizando-se por febre elevada, linfadenopatia generalizada, nódulos cutâneos disseminados por toda a superfície corporal, petéquias nas mucosas, apatia, anorexia, anemia e, por vezes, diarreia e icterícia (Gill *et al.*, 1977; Urquhart *et al.*, 1996; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999). Os animais que apresentam sinais clínicos mais moderados, recuperam da infecção, mas mantêm-se portadores crónicos (Gill *et al.*, 1977; Urquhart *et al.*, 1996; Ilhan *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999).

Patogenia

As formas parasitárias que se desenvolvem no hospedeiro bovino não estão incluídas num vacúolo, ao contrário do que acontece com a maioria dos parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, apresentando-se livres no citoplasma da célula hospedeira (Morrissette & Sibley, 2002; Shaw, 2003; Dobbelaere & Küenzi, 2004). Os esquizontes são o estadio com maior responsabilidade pelas alterações fenotípicas das células alvo, induzidas pela interacção com diversas vias metabólicas, por sua vez, responsáveis pelas alterações que contribuem para justificar a patogenia desta doença (Sager *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Glass, 2001; Shiles *et al.*, 2004; Oura *et al.*, 2006; Shiels *et al.*, 2006). O modo como esta interacção é mediada ainda não está totalmente esclarecido, embora a presença de várias moléculas proteicas do parasita no núcleo e citoplasma da

célula hospedeira sugeriram a hipótese de indução da expressão de determinados genes pela célula hospedeira, que determinarão as alterações fenotípicas e de comportamento das células parasitadas (Ahmed *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2001; Swan *et al.*, 2003; Shiels *et al.*, 2004; Oura *et al.*, 2006; Shiels *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2008).

Os macrófagos infectados por esquizontes apresentam aumento da síntese e da actividade de metaloproteinases (Baylis *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1995), as quais actuam como factores de virulência, justificando algumas das lesões verificadas nesta doença, nomeadamente a capacidade metastática das células infectadas, a presença de úlceras em alguns órgãos (por exemplo, abomaso) e a caquexia, por digestão da matriz extracelular (Baylis *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1995; Birkedal-Hansen, 1995; Adamson & Hall, 1997; Somerville *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2000).

In vitro, foi demonstrado que as células infectadas por *Theileria* spp. apresentam aumento da actividade de determinadas quinases : serina/treonina proteína quinase receptor do tipo II (“Enzyme Commission number” - EC 2.7.11.30) e “mitogen-activated” proteína quinase (EC 2.7.11.24). A primeira é uma enzima responsável pela fosforilação de vários substratos que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular (Ahmed *et al.*, 1999; Biermann *et al.*, 2003) e a segunda, apresenta papel importante na resposta celular a factores de proliferação, a citoquinas, a situações de stress celular e na regulação da reorganização do citoesqueleto na transição interfase-metáfase do ciclo celular (Davis, 1993; Chaussepied *et al.*, 1998; Lizundia *et al.*, 2006).

As células infectadas também expressam vários factores de transcrição, por exemplo, factor nuclear κ B (NF- κ B) e proteína activadora 1 (AP-1). O primeiro implicado na regulação de vários genes (envolvidos, por exemplo, na resposta inflamatória e imunitária) e o segundo na regulação do ciclo celular (Baylis *et al.*, 1995; Chaussepied *et al.*, 1998; Dobbelaere & Küenzi, 2004; Lizundia *et al.*, 2006).

A patogenia da teileriose tropical está também intimamente ligada à resposta imunitária desenvolvida no hospedeiro bovino, já que um dos factos de maior relevância nesta patologia é a proliferação descontrolada de células infectadas e células linfóides do tipo T (Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*,

1995; Campbell *et al.*, 1997; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001).

A hipertrofia dos linfonodos e o desenvolvimento de nódulos em vários órgãos e tecidos estará associado à proliferação das células infectadas e de células linfóides resultantes da resposta imunitária (Gill *et al.*, 1977; Preston *et al.*, 1992b; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999).

O controlo da infecção é realizado tanto à custa da imunidade humoral como celular sendo, paradoxalmente, esta última a que mais contribui para a patogenia do processo (Preston *et al.*, 1983; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001; Ahmed *et al.*, 2008):

A imunidade humoral desenvolve-se à custa da produção de anticorpos contra todas os estadios de desenvolvimento do parasita, mas revelam-se pouco eficazes para impedir o desenvolvimento da doença, sendo detectáveis numa fase tardia da infecção, quando outros mecanismos de imunidade celular já se iniciaram (Hooshmand-Rad & Hashemi-Fesharki, 1971; Ahmed *et al.*, 1988; Kachani & Spooner, 1992; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Ahmed *et al.*, 2008).

A imunidade celular é feita, inicialmente, à custa de mecanismos inatos como a intervenção de células fagocitárias, neste caso, macrófagos e células "Natural Killer" (Ahmed *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 1999). Por um lado, os macrófagos infectados, ao produzirem inúmeras citoquinas pró-inflamatórias (interleuquina-1 α e 1 β , interleuquina-6, interleuquina-10, interleuquina-12, factor de necrose tumoral- α e interferão- α), estimulam a proliferação de macrófagos infectados e não infectados (Preston *et al.*, 1992b; Ahmed *et al.*, 1999; Forsyth *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2008). Por outro, ocorre a apresentação de antigénios pelos macrófagos infectados a linfócitos T citotóxicos (CD8+) e T helper (CD4+) via MHC classe I e II, respectivamente (Glass & Spooner, 1990; Ahmed *et al.*, 1999; Campbell & Spooner, 1999; Preston *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2008). Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que ambos os tipos celulares proliferam, em resposta à presença de células infectadas: os linfócitos T helper proliferam e produzem citoquinas, interferão- γ (IFN- γ) e interleuquina 2 (IL-2), esta última responsável pela proliferação dos linfócitos T citotóxicos que destroem as células infectadas. Ambas as citoquinas também estimulam a proliferação dos

macrófagos infectados (Preston *et al.*, 1992b; Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1999; Campbell & Spooner, 1999; Preston *et al.*, 1999; Nichani *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008).

As células “Natural Killer” actuam numa fase mais precoce da infecção, estimuladas pelo interferão- α (INF- α). Estas células também produzem INF- γ , que, activando os macrófagos, aumentam a produção de óxido nítrico, impedindo a multiplicação do protozoário e conduzindo a célula parasitada à apoptose (Visser *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2008).

A citocina factor de necrose tumoral- α (TNF- α) apresenta um papel muito importante na reacção inflamatória, nomeadamente no aparecimento da febre, anemia e caquexia, sintomas que também estão presentes na teileriose tropical (Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1989; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Glass *et al.*, 2003).

A imunidade celular é a responsável pelo facto de os animais que recuperam de infecções primárias serem imunes a novas infecções com estirpes homólogas e algumas heterólogas de *Theileria annulata* (Innes *et al.*, 1989; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001; Machugh *et al.*, 2008).

Deste modo, percebe-se que a patogenia da teileriose tropical está intimamente ligada à resposta imunitária desenvolvida, nomeadamente ao balanço entre a imunidade inata (macrófagos e células “Natural Killer”) e a imunidade adaptada (linfócitos T CD8+ e CD4+), sendo os esquizontes responsáveis pela alteração do estabelecimento da resposta imune, que conduz ao desenvolvimento da teileriose tropical (Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1998; Campbell & Spooner, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001; Graham *et al.*, 2001). O esquema que se segue pretende ilustrar a resposta imunitária desenvolvida na teileriose tropical (Adaptado de Ahmed & Mehlhorn, 1999 e Ahmed *et al.*, 2008):

Imunidade humoral (mediada por anticorpos)

Anticorpos anti	esporozoítos	→ neutralizam a capacidade infectante dos esporozoítos
	esquizontes	→ não são eficientes
	merozoítos	→ inibem a invasão dos eritrócitos

Imunidade celular

Específica

Linfócitos T CD8+ → lisam as células infectadas

Linfócitos T CD4+ → produzem citocinas (IL-2, INF- γ)



- activam os macrófagos

- promovem a proliferação de linfócitos T CD8+

- estimulam a produção de anticorpos

Inespecífica

Macrófagos activados não infectados → inibem a proliferação das células infectadas

Células "Natural Killer" → promovem a lise celular

A breve descrição que elaborámos, a propósito de aspectos importantes na patogenia da teileriose tropical, visa enquadrar o tema que nos propusemos desenvolver nos cinco capítulos que se seguem. Estes capítulos correspondem a trabalhos experimentais desenvolvidos na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, na Universidade de Évora e no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), com o apoio financeiro de bolsa de doutoramento concedida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/31987/2006).

No primeiro capítulo, apresenta-se a população em estudo, vitelos com menos de 4 meses de idade, oriundos da região sul de Portugal, com suspeita de teileriose tropical e descreve-se o quadro clínico e lesional (lesões macroscópicas e microscópicas) identificado nestes animais.

No segundo capítulo apresentam-se os resultados obtidos relativos à caracterização fenotípica das células presentes nas lesões microscópicas identificadas no capítulo I, com recurso a anticorpos específicos.

No primeiro e segundo capítulos sentimos necessidade de voltar a abordar vários aspectos da patogenia da teileriose tropical, tal como o fizemos nesta Introdução, o que se revelou importante para discussão dos resultados obtidos.

Os trabalhos descritos no terceiro capítulo pretenderam caracterizar esquizontes de *Theileria annulata*, através da utilização de dois anticorpos monoclonais e um policlonal, nas lesões descritas nos capítulos anteriores.

No quarto capítulo apresenta-se o estudo ultraestrutural das células descritas no capítulo I, que permitiu confirmar a origem das células identificadas e localizar no citoplasma de macrófagos formas suspeitas de *Theileria* spp..

O quinto capítulo apresenta um pequeno estudo dos polimorfismos de dois fragmentos da região D-Loop do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) bovino, com o objectivo de inferir acerca da clonalidade das células identificadas nas lesões de teileriose tropical.

Com o desenvolvimento destes trabalhos pretendeu-se alcançar os seguintes objectivos:

- Caracterização macroscópica e microscópica das lesões identificadas em vitelos com suspeita de infecção por *Theileria annulata*.
- Caracterização fenotípica e ultraestrutural das células envolvidas nas lesões dos animais doentes.
- Confirmação do diagnóstico etiológico de infecção por *Theileria annulata*.
- Contribuição para o conhecimento sobre a resposta inflamatória e imunitária de vitelos afectados por *Theileria annulata*.

Bibliografia

Ahmed J.S., Diesing L., Oechtering H., Ouhelli H. & Schein E. (1988). The role of antibodies in immunity against *Theileria annulata* infection in cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene [A]* 267, 425-431.

Ahmed J.S., Glass E.J., Salih D.A. & Seitzer U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity* 14, 5-12.

Ahmed J.S. & Mehlhorn H. (1999). Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitology Research* 85, 539-549.

Ahmed J.S., Schnittger L. & Mehlhorn H. (1999). Review: *Theileria* schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitology Research* 85, 527-538.

Adamson R.E. & Hall F.R. (1997). A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of *Theileria annulata* infections. *Parasitology Today* 13, 390-393.

Adamson R., Logan M., Kinnaird J., Langsley G. & Hall R. (2000). Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in *Theileria annulata*-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 106, 51-61.

Bakheit M.A. & Latif A.A. (2002). The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. *Annals of the New York Academy of Sciences* 969, 159-163.

INTRODUÇÃO GERAL

- Barnett S. F. (1977). *Theileria*. In Parasitic Protozoa Vol. IV. Ed Julius P. Kreier. New York : Academic Press, Inc., 71-113.
- Baylis H.A., Megson A. Brown C.G., Wilkie G.F. & Hall R. (1992). *Theileria annulata*-infected cells produce abundant proteases whose activity is reduced by long-term cell culture. *Parasitology* 105, 417-423.
- Baylis H.A., Megson A. & Hall R. (1995). Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, 211-222.
- Bielefeldt Ohmann H., Campos M., Snider M., Rapin N., Beskorwayne T., Popowych Y., Lawman M.J., Rossi A. & Babiuk L.A. (1989). Effect of chronic administration of recombinant bovine tumor necrosis factor to cattle. *Veterinary Pathology* 26, 462-472.
- Biermann R., Schnittger L., Beyer D. & Ahmed J.S. (2003). Initiation of Translation and Cellular Localization of *Theileria annulata* Casein Kinase II α : Implication for its Role in Host Cell Transformation. *Journal of Cellular Physiology* 196, 444-453.
- Birkedal-Hansen H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 728-735.
- Brígido C., Fonseca I.P., Parreira R., Fazendeiro I., Rosário V.E. & Centeno-Lima S. (2004). Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Veterinary Parasitology* 123, 17-23.
- Brown C.G.D. (1990). Control of Tropical Theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* 32, 23-31.
- Brown D.J., Campbell J.D., Russell G.C., Hopkins J. & Glass E.J. (1995). T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. *Clinical and Experimental Immunology* 102, 507-514.
- Bussi eras J. & Chermette R. (1992). Protozoologie. In Parasitologie V et rinaire (Fascicule II). Service de Parasitologie. École Nationale V et rinaire D'Alfort, France, 70-73.

Caeiro V.M.P. (1973). Aspectos morfo-biológicos das espécies do género *Theileria* Bettencourt, França e Borges, 1907, agentes etiológicos das Teilerioses bovinas na África ao sul do Equador. Interesse do seu estudo. Sumário de uma exposição para efeitos de concurso para provimento de um lugar de Professor Catedrático na Universidade de Luanda.

Caeiro V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia* 41, 11-15.

Campbell J.D.M., Brown D.J., Glass E.J., Hall F.R. & Spooner R.L. (1994). *Theileria annulata* sporozoite targets. *Parasite Immunology* 16, 501-505.

Campbell J.D.M., Brown D.J., Nichani A.K., Howie S.E.M., Spooner, R.L. & Glass E.J. (1997). A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan *Theileria annulata*. *Clinical and Experimental Immunology* 108, 463-470.

Campbell J.D., Howie S.E., Odling K.A. & Glass E.J. (1995). *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *Clinical and Experimental Immunology* 99, 203-210.

Campbell J.D. M., Nichani A.K., Brown D.J., Glass E.J. & Spooner R.L. (1998). A stage-specific, parasite-induced "window" of *in vivo* interferon- γ production is associated with pathogenesis in *Theileria annulata* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 152-154.

Campbell J.D. & Spooner R.L. (1999). Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 10-16.

Chaussepied M., Lallemand D., Moreau M.F., Adamson R., Hall R. & Langsley G. (1998). Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in *Theileria*-transformed leukocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 94, 215-226.

Criado-Fornelio A., Martnez-Marcos A., Buling-Saraña A. & Barba-Carretero J.C. (2003). Molecular studies on Babesia, *Theileria* and Hepatozoon in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* 113, 189-201.

Davis R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 14553-14556.

INTRODUÇÃO GERAL

Dobbelaere D. & Heussler V. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annual Review of Microbiology* 53, 1-42.

Dobbelaere D.A.E. & Küenzi P. (2004). The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology* 16, 524-530.

Forsyth L.M., Jackson L.A., Wilkie G., Sanderson A., Brown C.G. & Preston P.M. (1997). Bovine cells infected *in vivo* with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor. *Veterinary Research Communications* 21, 249-263.

Forsyth L.M.G., Minns F.C., Kirvar E., Adamson R.E., Hall F.R., McOrist S., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1999). Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 120, 39-57.

Gill B.S., Bhattacharyulu Y. & Kaur D. (1977). Symptoms and Pathology of experimental bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 52, 597-608.

Gharbi M., Sassi L., Dorchies P & Darghouth M.A. (2006). Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Veterinary Parasitology* 137, 231-241.

Glass E.J. (2001). The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis. *Research in Veterinary Science* 70, 71-75.

Glass E.J., Craigmile S.C., Springbett A., Preston P.M., Kirvar E., Wilkie G.M., Eckersall P.D., Hall F.R. & Brown C.G.D. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *International Journal of Parasitology* 33, 1409-1418.

Glass E.J., Innes E.A., Spooner R.L. & Brown C.G. (1989). Infection of bovine monocyte/macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22, 355-368.

Glass E.J. & Jensen K. (2007). Resistance and susceptibility to a protozoan parasite – gene expression differences in macrophages from different breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120, 20-30.

Glass E.J., Preston P.M., Springbett A., Craigmile S.C., Kirvar E., Wilkie G.M. & Brown C.G. (2005). *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *International Journal for Parasitology* 35, 337-347.

Glass E.J. & Spooner R.L. (1990). Parasite-accessory cell interactions in theileriosis. Antigen presentation by *Theileria annulata*-infected macrophages and production of continuously growing antigen-presenting cell lines. *European Journal of Immunology* 20, 2491-2497.

Graham S.P., Brown D.J., Vatansever Z., Waddington D., Taylor L.H., Nichani A.K., Campbell J.D.M., Adamson R.E., Glass E.J. & Spooner R.L. (2001). Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. *Vaccine* 19, 2932-2944.

Habela M., Rol J.A., Antón J.M., Peña J., Corchero E., van Ham I. & Jongejan F. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia* 41 (Suppl.1), 47-51.

Hooshmand-Rad P. & Hashemi-Fesharki R. (1971). Complement-fixing antibodies in cattle experimentally infected with *Theileria annulata* or vaccinated with tissue cultures. *British Veterinary Journal* 127, 244-249.

Ilhan T., Williamson S., Kirvar E., Shiels B. & Brown C.G. (1998). *Theileria annulata*: carrier state and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 109-125.

Innes E.A., Millar P., Brown C.G. & Spooner R.L. (1989). The development and specificity of cytotoxic cells in cattle immunized with autologous or allogeneic *Theileria annulata*-infected lymphoblastoid cell lines. *Parasite Immunology* 11, 57-68.

Jensen K., Paxton E., Waddington D., Talbot R., Darghouth M.A. & Glass E.J. (2008). Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. *International Journal for Parasitology* 38, 313-325.

Kachani M. & Spooner R.L. (1992). Anti-lymphocyte antibodies generated in animals immunized with *Theileria annulata*-infected cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33, 163-169.

INTRODUÇÃO GERAL

Leitão J.L.S. (1945). Teileriose bovina em Portugal. Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária II , 1-8.

Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. & Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27, 37-58.

Lizundia R., Chaussepied M., Huerre M., Werling D., Di Santo J.P. & Langsley G. (2006). c-Jun NH₂-Terminal Kinase/c-Jun Signaling Promotes Survival and Metastasis of B Lymphocytes Transformed by *Theileria*. *Cancer Research* 66, 6105-6110.

Machugh N.D., Burrells A.C. & Morrison W.I. (2008). Demonstration of strain-specific CD8 T cell responses to *Theileria annulata*. *Parasite Immunology* 30, 385-393.

Minjauw B. & McLeod A. (2003). Tick borne diseases and poverty. The impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihoods of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. DFID Animal Health Programme (www.dfid-ahp.org.uk/downloads/TickBorn_Book.pdf).

Moreau M.-F., Thibaud J.-L., Miled L.B., Chaussepied M., Baumgartner M., Davis W.C., Minoprio P. & Langsley G. (1999). *Theileria annulata* in CD5⁺ macrophages and B1 B cells. *Infection and Immunity* 67, 6678-6682.

Morrisette N.S. & Sibley L.D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 21-38.

Navarrete I., Serrano F.J. & Reina D. (1999). Parasitosis Hemáticas. *In Parasitología Veterinaria*. Eds M. Cordero del Campillo & F.A. Rôjo Vázquez. McGraw-Hill – Interamericana, Spain, 294-302.

Nichani A.K., Campbell J.D., Glass E.J., Graham S.P., Craigmile S.C., Brown C.G. & Spooner R.L. (2003). Characterization of efferent lymph cells and their function following immunization of cattle with na allogenic *Theileria annulata* infected cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93, 39-49.

Oura C.A., Mckellar S., Swan D.G., Okan E. & Shiels B.R. (2006). Infection of bovine cells by the protozoan parasite *Theileria annulata* modulates expression of the ISGylation system. *Cell Microbiology* 8, 276-288.

Preston P.M., Brown C.G., Bell-Sakyi L., Richardson W. & Sanderson A. (1992a). Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science* 53, 230-243.

Preston P.M., Brown C.G. & Richardson W. (1992b). Cytokines inhibit the development of trophozoite-infected cells of *Theileria annulata* and *Theileria parva* but enhance the proliferation of macroschizont-infected cell. *Parasite Immunology* 14, 125-141.

Preston P.M., Brown C.G. & Spooner R.L. (1983). Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. *Clinical and Experimental Immunology* 53, 88-100.

Preston P.M., Hall F.R., Glass E.J., Campbell J.D.M., Darghouth M.A., Ahmed J.S., Shiels B.R., Spooner R.L., Jongejan F. & Brown C.G.D. (1999). Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 268-274.

Purnell R.E. (1978). *Theileria annulata* as a hazard to cattle in the countries on the northern Mediterranean littoral. *Veterinary Research Communications* 2, 3-10.

Richardson J.O., Forsyth L.M.G., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1998). Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Veterinary Research Communications* 22, 31-45.

Sager H., Davis C., Dobbelaere D.A.E. & Jungi T. (1997). Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with *Theileria annulata*. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 459-468., 335-341.

Shaw M.K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology* 19, 2-6.

Shiels B., Langsley G., Weir W., Pain A., Mckellar S. & Dobbelaere D. (2006). Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *International Journal for Parasitology* 36, 9-21.

Shiels B.R., Mckellar S., Katzer F., Lyons K., Kinnaird J., Ward C., Wastling J.M. & Swan D. (2004). A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell

INTRODUÇÃO GERAL

nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryotic Cell* 3, 495-505.

Somerville R.P., Adamson R.E., Brown C.G. & Hall F.R. (1998). Metastasis of *Theileria annulata* macroschizont-infected cells in scid mice is mediated by matrix metalloproteinases. *Parasitology* 116, 223-228.

Swan D.G., Phillips K., Tait A. & Shiels B.R. (1999). Evidence for localisation of a *Theileria* parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 117-129.

Swan D.G., Stadler L., Okan E., Hoffs M., Katzer F., Kinnaird J., Mckellar S. & Shiels B.R. (2003). TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. *Cellular Microbiology* 5, 947-956.

Swan D.G., Stern R., Mckellar S., Phillips K., Oura C.A.L., Karagenc T.I., Stadler L. & Shiels B.R. (2001). Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *Journal of Cell Science* 114, 2747-2754.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M. & Junnings F.W. (1996). *Veterinary Protozoology. In Veterinary Parasitology*. 2nd edition. Blackwell Science, 209-253.

Visser A.E., Abraham A., Sakyi L.J., Brown C.G. & Preston P.M. (1995). *Parasite Immunology* 17, 91-102.

Capítulo I: Caracterização macroscópica e microscópica das lesões identificadas em vitelos infectados por *Theileria annulata*

Introdução

Em Portugal, são inexistentes as descrições sobre lesões macroscópicas e respectivo estudo histológico em cadáveres cuja morte resultou de infecção por *Theileria annulata*. A nível internacional são também escassas as referências às alterações morfológicas, macroscópicas e microscópicas, identificadas nas lesões em infecções por *Theileria annulata* (Caeiro, 1973; Gill *et al.*, 1977; Forsyth *et al.*, 1999). Caeiro (1973) e Gill *et al.* (1977) descreveram principalmente a sintomatologia e lesões macroscópicas, identificando quadros semelhantes, que se caracterizaram por febre, anorexia, anemia, icterícia, dispneia e lesões de hipertrofia generalizada dos linfonodos, hepatomegália, esplenomegália, úlceras no abomaso, hemorragias nas mucosas, serosas, tecido subcutâneo, endocárdio e epicárdio. Este último autor descreveu ainda a infiltração de alguns órgãos por linfócitos e macrófagos. Forsyth *et al.* (1999) analisaram a distribuição das células infectadas, fagócitos mononucleados, com esquizontes em diferentes órgãos e tecidos, provenientes de animais infectados experimentalmente com *Theileria annulata* e concluíram serem estas células as responsáveis pelo quadro clínico e lesional observado.

Neste capítulo pretendemos descrever as lesões macroscópicas identificadas em cadáveres de vitelos infectados por *Theileria annulata* e caracterizar as lesões histológicas correspondentes, com base na morfologia das células observadas. Estes vitelos desenvolveram a forma aguda da doença acabando por morrer, ou ser eutanasiados por ausência de recuperação clínica, entre uma a duas semanas após o início dos sintomas.

Materiais e Métodos

O presente estudo incidiu sobre 16 vitelos com idade igual ou inferior a 4 meses, oriundos do sul de Portugal continental. Na tabela 1 numeram-se

CAPÍTULO I

estes animais de 1 a 16, indicando-se a data da morte, a idade, o género, a raça e o concelho de origem (Figura 1).

Tabela 1: Data da morte, concelho de origem, idade, género e raça dos vitelos estudados.

DATA DA MORTE	CONCELHO	IDADE	GÉNERO	RAÇA
(1) Dezembro/1999	Elvas	3 meses	F	X Limousine
(2) Abril/2000	Vendas Novas	1 mês e ½	M	X Limousine
(3) Outubro/2000	Montemor-o-Novo	2 meses	F	X Limousine
(4) Abril/2001	Vendas Novas*	4 meses	M	X Limousine
(5) Junho/2001	Vendas Novas	1 mês	M	Limousine
(6) Julho/2001	Évora	2 meses	F	Charolês
(7) Março/2002	Viana do Alentejo	3 meses	F	X Charolês
(8) Abril/2002	Vendas Novas*	1 mês e ½	F	X Charolês
(9) Junho/2003	Montemor-o-Novo	21 dias	M	Limousine
(10) Setembro/2003	Évora	2 meses	M	X Charolês
(11) Setembro/2003	Montemor-o-Novo	2 meses	M	Charolês
(12) Setembro/2003	Montemor-o-Novo	3 meses	M	Limousine
(13) Setembro/2005	Évora**	3 semanas	F	Alentejana
(14) Outubro/2005	Évora**	3 semanas	F	Alentejana
(15) Outubro/2007	Évora**	2 meses	M	Alentejana
(16) Novembro/2007	Évora**	1 mês	F	Alentejana

(* animais oriundos da mesma exploração no concelho de Vendas Novas; ** animais oriundos da mesma exploração no concelho de Évora)

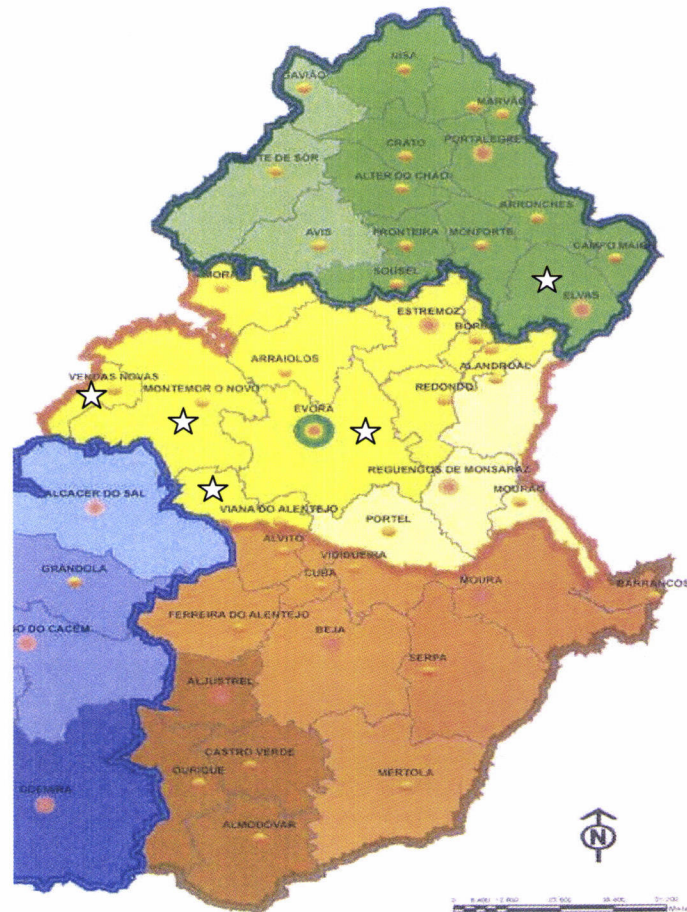


Figura 1: Mapa da região do Alentejo onde se assinalam os concelhos de origem dos animais deste estudo (Adaptado de Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo, 2008).

Todos os vitelos nasceram nas explorações de origem e, até à data da morte destes animais, nenhuma destas explorações registava casos de Leucose Bovina. A distância entre estas explorações varia entre 20 a 100 km.

O facto de não ter sido possível observar todos os animais doentes com vida, determinou a selecção das amostras para realização das diferentes análises. Assim, apenas em sete casos (animais n.ºs 4, 7, 8, 9, 10, 13 e 15) foram obtidos esfregaços de sangue periférico e em seis esfregaços de linfonodo (animais n.ºs 7, 8, 9, 10, 13 e 16), posteriormente corados pelo Giemsa (Anexo I). Os linfonodos utilizados para colheita foram aqueles que se apresentavam hipertrofiados.

Todos os cadáveres foram necropsiados e colhidos fragmentos de órgãos e tecidos que apresentaram lesões, os quais foram fixados em formaldeído tamponado (VWR, 1.00496) a 10% e processados pelo método de

rotina para exame histopatológico. Cortes de 3 µm de espessura foram corados pela hematoxilina-eosina (H-E; Anexo I) e pelo Giemsa (Anexo I).

Dos animais nºs 8 e 9 foi obtido sangue periférico (heparinizado 20UI/ml) para extracção de células mononucleadas (PBMC). A cultura e identificação dos parasitas foi coordenada pelo Professor Doutor Alexandre Leitão e realizada no laboratório do Instituto de Investigação Científica Tropical (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa). A metodologia utilizada consta do Anexo II (Sharma *et al.*, 1998; Rozen & Skaletsky, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

Resultados

História Clínica

Todos os animais apresentaram sinais clínicos semelhantes, de acordo com o observado por nós, ou relatado pelos médicos veterinários assistentes das explorações de origem destes vitelos.

Os animais revelaram hipertermia, anorexia, emaciação, por vezes acentuada, anemia, exoftalmia unilateral ou bilateral, petéquias nas mucosas oral, nasal e conjuntiva, bem como no pavilhão auricular. À palpação foi detectada a presença generalizada de nódulos cutâneos e subcutâneos, com diâmetro entre 0,5 e 3,0 cm, assim como hipertrofia dos linfonodos superficiais, com especial relevância para os submandibulares, os retrofaríngeos e, por vezes, os pré-escapulares.

Todos os animais apresentaram forte infestação por carraças do género *Hyalomma*.

Exames citológicos

Nos esfregaços de sangue identificaram-se formas compatíveis com merozoítos de *Theileria annulata* nos glóbulos vermelhos. Estas formas apresentaram maioritariamente morfologia em anel (Figura 2A e 2B) e mais raramente baciliforme. Muito raramente, identificaram-se formas compatíveis com esquizontes no citoplasma de leucócitos circulantes.

Os esfregaços de linfonodo permitiram identificar formas multinucleadas compatíveis com esquizontes de *Theileria annulata* no citoplasma de células mononucleadas (Figura 3A e 3B).

Os esquizontes caracterizavam-se pela presença de múltiplos pequenos pontos de morfologia arredondada no citoplasma de células mononucleadas, que coraram de púrpura pelo Giemsa (Anexo I).

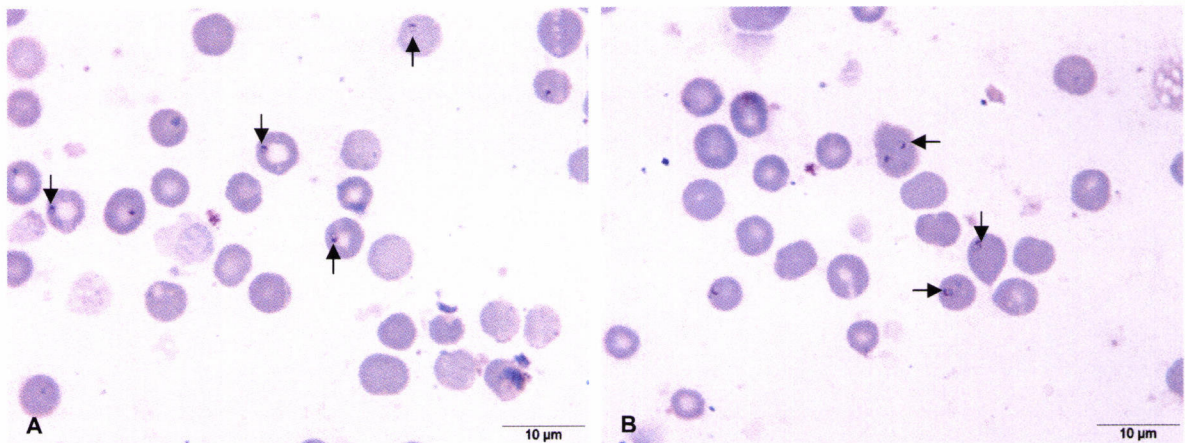


Figura 2: A e B - Esfregaços de sangue onde se observam, nos glóbulos vermelhos, várias formas anelares (setas) compatíveis com merozoítos de *Theileria annulata* (Giemsa).

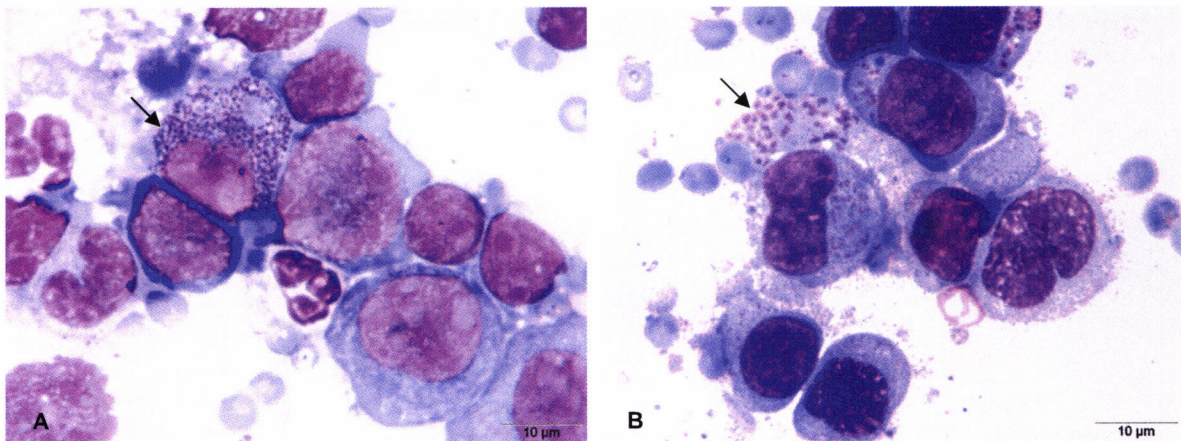


Figura 3: A e B - Esfregaços de linfonodo onde se observam, nas células mononucleadas, formas compatíveis com esquizontes de *Theileria annulata* (setas; Giemsa).

Exame anatomopatológico

Lesões macroscópicas

Nos animais nº 9 e 11 foi observada coloração icterica das mucosas conjuntiva e bucal. Nos restantes coloração pálida acentuada.

Em todos os cadáveres identificou-se inúmeros nódulos disseminados pela pele e tecido subcutâneo, de coloração branco/amarelada, por vezes hemorrágicos ou de halo hemorrágico, superfície de corte compacta e homogênea e com 0,2 a 3 cm de diâmetro (Figura 4 e 5). Nódulos semelhantes foram observados nos músculos esqueléticos, particularmente nos cervicais, sub-glóssicos (Figura 6) e língua, na gordura abdominal, no omento (Figura 7) e nas serosas, com especial relevância na intestinal.

Todos os cadáveres apresentavam hipertrofia generalizada dos linfonodos. Ao corte, tanto os internos como os superficiais exibiam edema e hemorragia ou, em alternativa, superfície homogênea, necrótica, de aspecto atoucinhado (Figura 8).

Alguns dos cadáveres apresentaram lesões nodulares semelhantes às anteriormente descritas na parede da faringe e traqueia, no músculo cardíaco, na hipófise, no timo e no tecido adiposo retro-ocular. Registaram-se, por vezes, outras lesões como hidrohemitórax, congestão e edema pulmonar, friabilidade do parênquima esplênico e hepatomegália.

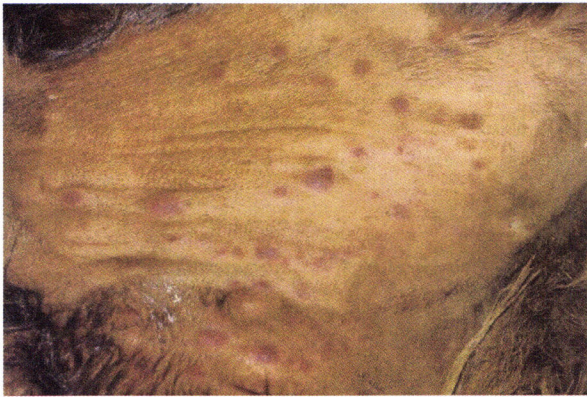


Figura 4: Pele da região inguinal de vitelo onde são visíveis nódulos hemorrágicos.

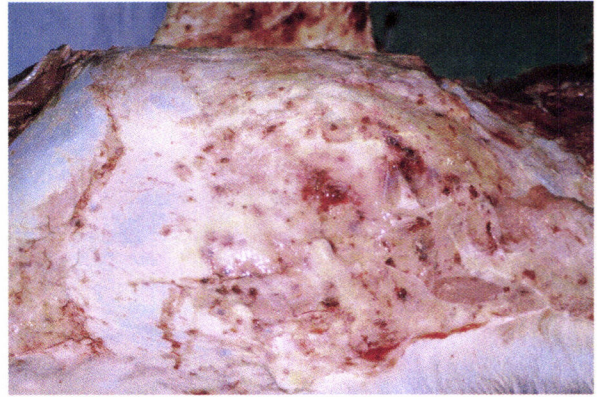


Figura 5: Tecido conjuntivo subcutâneo da região abdominal de vitelo. Pode observar-se múltiplas equimoses.



Figura 6: Nódulos de coloração branco/amarelada nos músculos subglóssicos (setas brancas) e nódulos de coloração branco/amarelada e halo hemorrágico na mucosa da laringe (setas pretas).

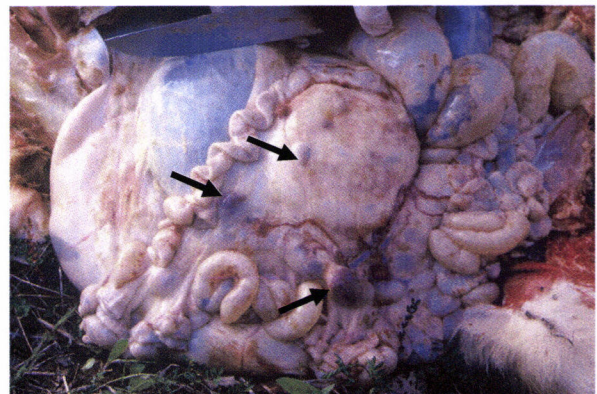


Figura 7: Nódulos hemorrágicos no omento (setas).

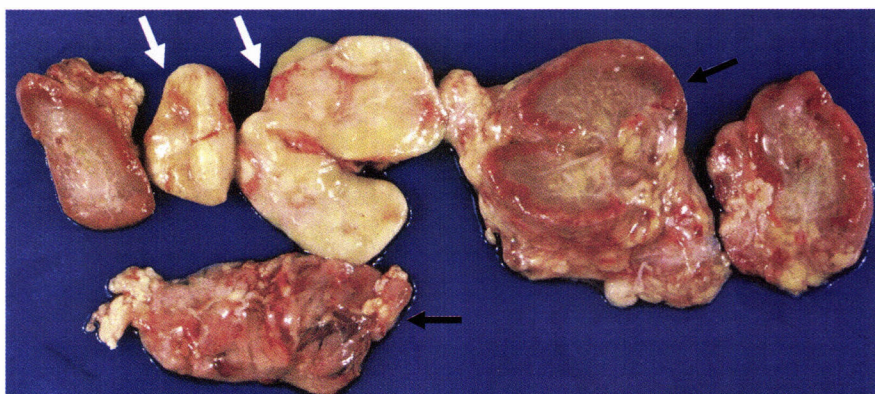


Figura 8: Linfonodos de vitelo com superfície de corte de cor homogênea e atoucinhada (setas brancas) e necrótica e hemorrágica (setas pretas).

Lesões microscópicas

Os nódulos identificados na necrópsia nos vários tecidos e órgãos correspondiam a infiltração exuberante por células redondas, semelhantes a células linfóides de morfologia blástica.

No tecido muscular esquelético e miocárdio a infiltração era compacta dissociando as fibras musculares e com necrose e calcificação ocasional destas fibras (Figura 9A, 9B, 9C e 9D).

Nos linfonodos e baço a infiltração pelas células linfóides de morfologia blástica, por vezes, discreta, era acompanhada por hipoplasia do tecido linfóide. No entanto, em alguns linfonodos, as lesões observadas eram, pelo contrário, de hiperplasia linfocitária difusa e de infiltração pelas células blásticas referidas, com esbatimento dos limites cortico-medulares, invasão dos seios subcapsulares, seios peritrabeculares e seios medulares (Figura 10A e 10B).

No timo as lesões caracterizavam-se por hiperplasia linfocitária difusa dos lobos, tornando pouco evidente a distinção da zona cortical e medular e sendo também observada a infiltração celular pelas células linfóides de morfologia blástica.

Na pele a infiltração celular por células linfóides e pelas células linfóides de morfologia blástica, localizava-se na derme média e profunda (Figura 11A e 11B), identificando-se raros casos em que se localizavam muito próximo da membrana basal (Figura 11C e 11D).

O fígado, o rim, a hipófise, a tiróide (Figura 12) e o tecido adiposo apresentaram infiltração intersticial pelas células linfóides de morfologia blástica descritas e os órgãos tubulares (laringe, faringe, traqueia, esófago e intestino) infiltração da parede (Figura 13 e 14).

A população celular constituindo os nódulos observados na necrópsia nos vários órgãos e tecidos era composta por linfócitos maduros e por células redondas, que apresentavam moderado pleomorfismo, morfologia semelhante a células linfóides neoplásicas do tipo blástico, com limites pouco claros, escasso citoplasma de coloração ligeiramente basófila, relação núcleo/citoplasma (N/C) elevada, núcleos, por vezes, com chanfraduras (Figura 9C), com a cromatina formando grânulos junto à membrana nuclear e

imagens de cariorrexis. A anisocariose era moderada e o índice mitótico moderado a elevado com 2 a 3 mitoses por campo observado com objectiva de 40x. Por vezes, no citoplasma destas células, observou-se formas multinucleadas compatíveis com esquizontes de *Theileria annulata*, que coraram de púrpura pela coloração de Giemsa (Figura 9D; Anexo I).

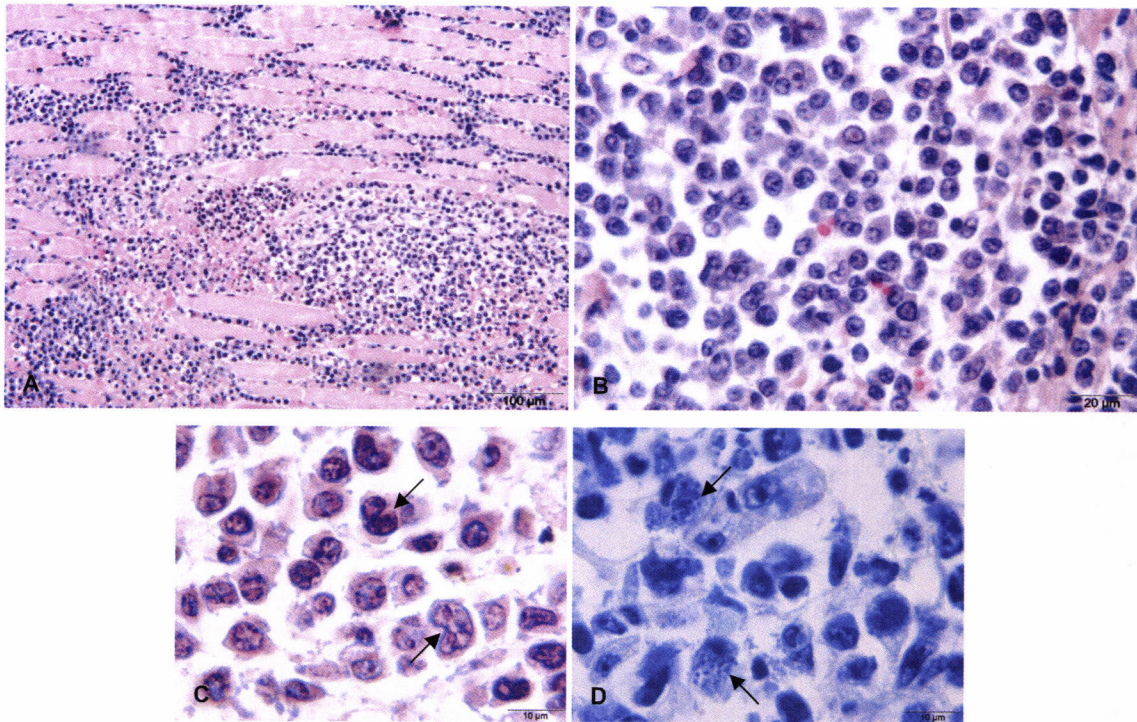


Figura 9: A - Infiltração do tecido muscular esquelético por células redondas de morfologia linfóide tipo blástica que afastam as fibras musculares (H-E); B - Ampliação de A, onde se observa a morfologia linfóide e blástica das células observadas (H-E); C - As mesmas células observadas em A e B. Estas caracterizam-se pela presença de escasso citoplasma de coloração basófila, relação N/C elevada e núcleos com chanfraduras (setas; H-E); D - Formas multinucleadas compatíveis com esquizontes de *Theileria annulata*, identificadas no citoplasma de algumas das células identificadas em A, B e C (setas; Giemsa).

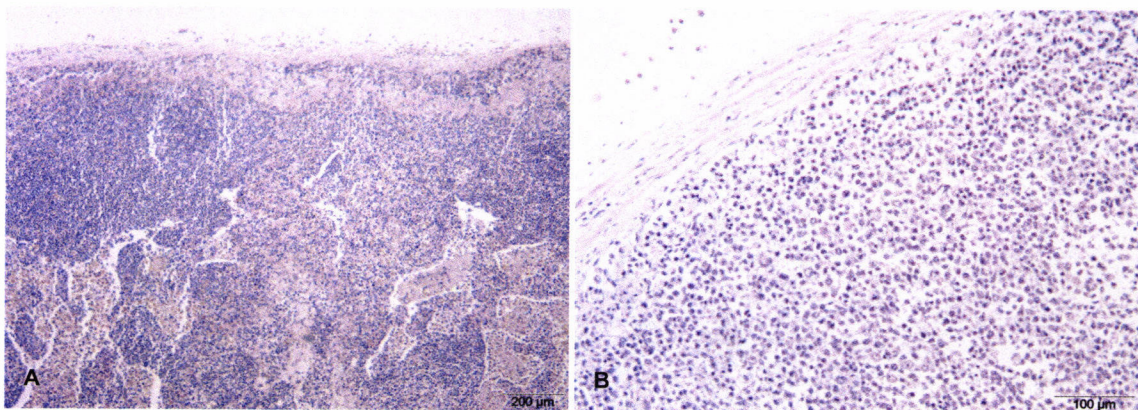


Figura 10: A - Hiperplasia linfocitária difusa, esbatimento dos limites cortico-medulares e infiltração celular do seio subcapsular e perituberculares de linfonodo (H-E); B - Pormenor de A, onde é possível observar a hiperplasia linfocitária difusa e a infiltração celular do seio subcapsular (H-E).

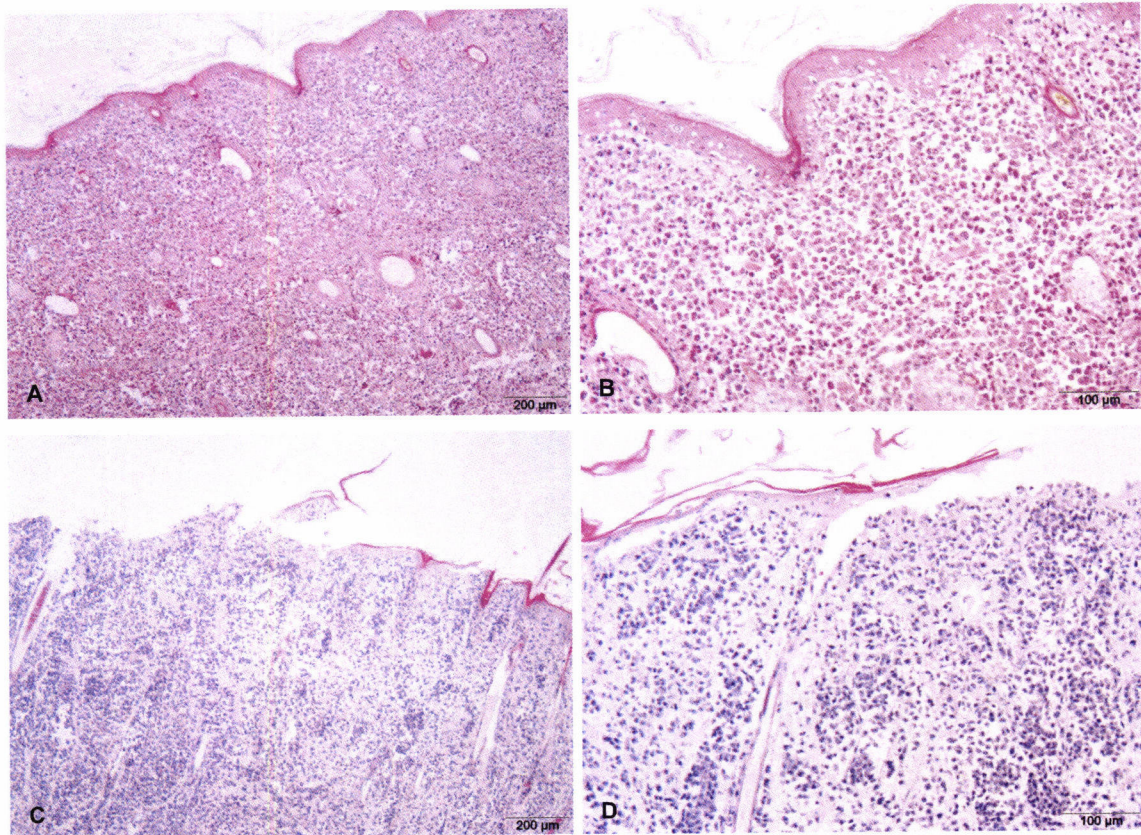


Figura 11: A - Infiltração da derme superficial, média e profunda por células linfóides do tipo blástico (H-E); B - Maior ampliação de A onde é possível observar a ausência de infiltração celular da epiderme e a infiltração da derme superficial e média (H-E); C - Infiltração da derme superficial, média e profunda por células linfóides do tipo blástico e ulceração da epiderme (H-E); D - Pormenor de C onde se observa a infiltração celular da derme superficial e média (H-E).

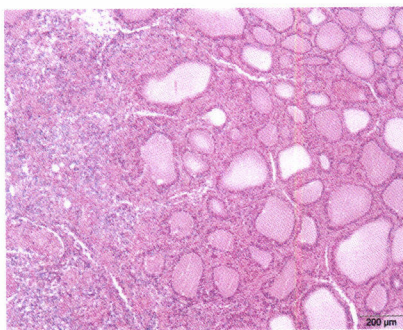


Figura 12: Infiltração intersticial da tiróide por células linfóides de morfologia blástica (H-E).

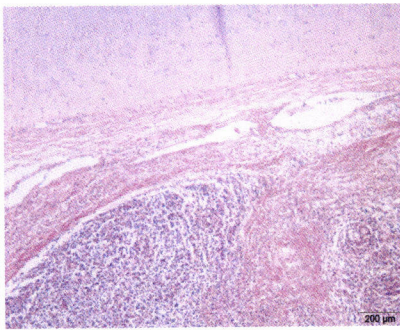


Figura 13: Infiltração da serosa da traqueia por células linfóides de morfologia blástica (H-E).

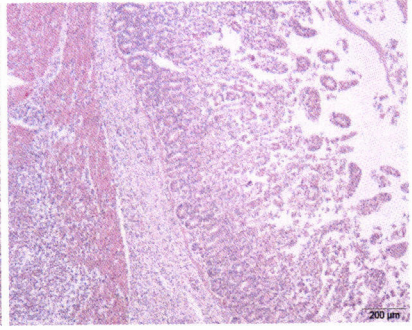


Figura 14: Infiltração por células linfóides de morfologia blástica da submucosa e camada muscular da parede intestinal (H-E).

Estabelecimento de linhas celulares infectadas com esquizontes e identificação do parasita

A partir do sangue periférico dos animais nºs 8 e 9 foram estabelecidas com sucesso culturas de células mononucleadas. As linhas celulares obtidas foram utilizadas para identificar o parasita responsável pela infecção e alteração destas células. A colheita do sangue periférico aos animais referidos foi realizada com 14 meses de intervalo (Tabela 1) e as explorações de origem destes animais eram diferentes, distando cerca de 20 km entre elas (Tabela 1).

A amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR) da região hipervariável 4 da subunidade menor do gene 18S ácido ribonucleico ribossómico (ARNr), permitiu obter fragmentos de 500 pares de bases (um do animal nº 8 e dois do animal nº 9), que foram directamente sequenciados em ambos os sentidos (Anexo II).

As sequências dos três fragmentos amplificados foram idênticas e depositadas no “GenBank” (acesso nº GQ465761). Estas sequências apresentam 100% de homologia com a sequência da estirpe Ankara (National Center for Biotechnology Information-NCBI-, acesso nº NW_001091929, 2009) e 99 a 100% de semelhança com as sequências de outras estirpes de *Theileria annulata* depositadas no “GenBank”. A comparação da sequência obtida, com sequências derivadas de outras espécies do género *Theileria* que infectam os bovinos, revelou 97% de semelhança com *Theileria parva* e 96% com *Theileria taurotragi*.

A sequência determinada apresenta ainda 99% de semelhança com a sequência correspondente de *Theileria lestoquardi*, parasita que infecta os ovinos.

Discussão

As lesões descritas no presente trabalho levantaram, inicialmente, a possibilidade de se tratar de casos da variante juvenil da Leucose Esporádica Bovina. No entanto, a localização e as características das lesões não estavam totalmente de acordo com os quadros clássicos desta doença (Valli, 2007).

A Leucose Esporádica Bovina não está associada a infecções pelo vírus da Leucose Bovina (BLV) e manifesta-se sob vários quadros lesionais que englobam (Valli, 2007):

- A forma esporádica, que se manifesta a partir dos seis meses de idade, cujas características lesionais mais evidentes são a hipertrofia simétrica generalizada dos linfonodos internos e superficiais e a invasão dos rins.
- A forma cutânea presente em animais com 2-3 anos de idade. As lesões mais evidentes são as cutâneas, com aparecimento de placas ulceradas, principalmente na cabeça, tronco e períneo.
- A forma juvenil ou tímica que afecta animais com menos de seis meses de idade, caracterizando-se pela presença de nódulos de tamanho variável, coloração branca e superfície homogênea, localizados preferencialmente nos rins, timo, fígado e baço e por hipertrofia exuberante da maioria dos linfonodos internos e superficiais, que apresentam, ao corte, coloração branca e superfície compacta e homogênea. O envolvimento do timo é muito frequente podendo, em alguns casos, apresentar hipertrofia muito exuberante.

Todas as formas descritas se afastam das observadas nos animais deste estudo, pois raramente os rins, fígado, timo e baço estavam alterados e as lesões nodulares localizavam-se maioritariamente noutros órgãos.

Todos os animais apresentavam forte infestação por carraças do género *Hyalomma* e identificaram-se formas compatíveis com *Theileria annulata* em esfregaços de sangue e linfonodos, o que permitiu formular a hipótese de relação entre a infecção por este protozoário e o quadro lesional observado.

De facto, as carraças do género *Hyalomma* são as responsáveis pela transmissão da *Theileria annulata* ao hospedeiro bovino (Caeiro, 1973; Barnett, 1977; Brown, 1990; d'Oliveira *et al.*, 1995; Navarrete *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2008), apesar de experimentalmente, ter sido possível a transmissão de *Theileria annulata* por *Dermacentor marginatus* (Habela *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999). Em Portugal, as carraças do género *Hyalomma* estão presentes, principalmente, nas regiões do Ribatejo e do Alentejo, tendo sido identificadas as espécies *Hyalomma lusitanicum* e

Hyalomma marginatum marginatum por Caeiro (1999). Estas espécies estão entre as que são reconhecidas como responsáveis pela transmissão da teileriose tropical (Caeiro, 1973; Habela *et al.*, 1999).

No gado bovino a espécie *Theileria annulata* é a única dentro do género *Theileria* considerada patogénica identificada em Portugal (Leitão, 1945; Caeiro, 1973). A infecção por *Theileria parva* não está descrita no nosso país. Apenas existem dados não publicados de suspeita de infecções por outra espécie de *Theileria*, nomeadamente *Theileria mutans* (Caeiro, 1973) e infecções não sintomáticas por espécies do grupo *Theileria buffeli* em bovinos de raça Mirandesa na região norte do país (Brígido *et al.*, 2004). As espécies pertencentes a este grupo, apesar de identificadas em regiões de clima temperado, não estão associadas a doença, pelo que não foram consideradas no nosso estudo. No entanto, sabe-se que podem ser concomitantes com infecções por *Theileria annulata* (d'Oliveira *et al.*, 1995; Brígido *et al.*, 2004).

A infecção por *Theileria mutans* é mais frequente em África, não é considerada patogénica, não lhe estando atribuído quadro lesional semelhante ao que aqui descrevemos (Caeiro, 1973; Barnett, 1977; Irvin, 1985; d'Oliveira *et al.*, 1995; Urquhart *et al.*, 1996; Navarrete *et al.*, 1999).

Nos esfregaços de sangue observaram-se merozoítos nos glóbulos vermelhos, principalmente em forma de anel. Mais raramente foram observadas formas com outra morfologia. As formas em anel estão descritas como as mais características e predominantes nas infecções por *Theileria annulata* (Leitão, 1945; Caeiro, 1973; Barnett, 1977; Bussierras & Chermette, 1992; Navarrete *et al.*, 1999).

Nos esfregaços de linfonodo foram observados esquizontes nos leucócitos. Os esquizontes são estruturas multinucleadas dispersas no citoplasma da célula hospedeira como múltiplas pequenas formas poliédricas, bastante frequentes nas infecções por *Theileria annulata* (Caeiro, 1973; Gill *et al.*, 1977; Bussierras & Chermette, 1992; Forsyth *et al.*, 1999). Formas compatíveis com esquizontes foram também identificadas em cortes histológicos de vários órgãos e tecidos, o que está de acordo com as descrições feitas por outros autores, assim como a maioria das lesões

macroscópicas observadas (Gill *et al.*, 1977; Preston *et al.*, 1992a; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999).

A etiologia da infecção foi confirmada pela sequenciação da região hipervariável 4 da subunidade menor do gene 18S ARNr do parasita. As sequências obtidas apresentaram 100% de semelhança com a estirpe Ankara de *Theileria annulata* e 99 a 100% de semelhança com as sequências de outras estirpes depositadas nas bases de dados internacionais (“GenBank”), inclusivamente isolados oriundos de países próximos de Portugal, nomeadamente Espanha e França, mas também, de outros mais distantes geograficamente, como Turquia, Tunísia, Índia e China.

A semelhança com a sequência correspondente de *Theileria lestoquardi* poderá conduzir a problemas de diagnóstico quando se analisam isolados provenientes do vector (carraças do género *Hyalomma*) ou de ovinos infectados com ambas as espécies (Spitalska *et al.*, 2004). No entanto, a espécie bovina não é susceptível à infecção por *Theileria lestoquardi*, razão pela qual não foi considerado como etiologia para os casos que aqui descrevemos (Leemans *et al.*, 1999).

A complexidade do ciclo biológico da *Theileria annulata* tem impedido o total esclarecimento da patogenia da infecção por este protozoário, bem como a sua relação com as lesões verificadas nos tecidos e órgãos dos animais atingidos. Na bibliografia consultada são poucos os trabalhos que descrevem o quadro lesional desta doença, nomeadamente as alterações macroscópicas e as características das células observadas, infectadas ou não, relacionando estes dados com a patogenia da teileriose tropical.

Até ao início deste século assumiu-se que a infecção por *Theileria annulata* e a resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro era em tudo semelhante à infecção por *Theileria parva* (Dobbelaere *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1997; Preston *et al.*, 1999). No entanto, as diferenças tornaram-se mais evidentes a partir do momento em que se identificaram as células alvo de cada um dos protozoários em causa (Baldwin *et al.*, 1988; Spooner *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1994; Sager *et al.*, 1998; Mckeever *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999).

A patogenia da teileriose tropical tem na invasão dos leucócitos (predominantemente macrófagos, embora linfócitos B possam também ser

infectados) e na sua proliferação descontrolada, um dos aspectos mais importantes para a compreensão da resposta imunitária à infecção por *Theileria annulata* (Glass *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1994; Forsyth *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Forsyth *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001; Graham *et al.*, 2001; Ahmed, *et al.*, 2008). De facto, as explicações desenvolvidas para a resposta imune suscitada por cada fase de evolução deste protozoário no hospedeiro bovino (Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Glass *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008) justificam as lesões observadas. Sabe-se também que a dose e virulência do parasita influenciam esta resposta e, como consequência, também as lesões (Preston *et al.*, 1992a; Glass *et al.*, 2003).

Numa primoinfecção a destruição do parasita no citoplasma da célula hospedeira passa pela lise enzimática do mesmo, à custa dos mecanismos internos da célula, mas passa igualmente pela lise das células infectadas por células “Natural Killer” e linfócitos T (Preston *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1998; Campbell & Spooner, 1999; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Glass, 2001). A activação desta última resposta é iniciada, por um lado, pela produção de citoquinas pelos macrófagos infectados que se revelam potencialmente eficientes na apresentação inespecífica de antigénios a células linfóides do tipo T (Shiels *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999). Por outro lado, a presença do parasita no citoplasma da célula hospedeira parece ser a responsável pela activação dos mecanismos que conduzem à produção de citoquinas pelas células parasitadas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α , TNF- α e metaloproteinase 9 - MMP9), constituindo um mecanismo autócrino de proliferação destas mesmas células (Preston *et al.*, 1992b; Preston *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995; Adamson & Hall, 1997; Campbell & Spooner, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Preston *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2008). Também a produção de elementos deste grupo de substâncias pelos linfócitos T activados, nomeadamente INF- γ e IL-2 constitui um factor de estimulação acrescido para estes mesmos linfócitos e para macrófagos quer estejam infectados ou não (Preston *et al.*, 1983; Preston *et al.*, 1992b; Collins *et al.*,

1996; Campbell *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1998; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Ahmed *et al.*, 2008).

A multiplicação e a alteração fenotípica e funcional das células infectadas parece estar relacionada com a presença de *Theileria* spp. no seu citoplasma, nomeadamente pela intervenção de proteínas parasitárias nos mecanismos de controlo do ciclo celular e da apoptose (Shiels *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1994; Baylis *et al.*, 1995; Sager *et al.*, 1997; Swan *et al.*, 1999; Heussler *et al.*, 2001; Swan *et al.*, 2001; Biermann *et al.*, 2003; Swan *et al.*, 2003; Dobbelaere & Küenzi, 2004; Shiels *et al.*, 2004; Shiels *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2008). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários estudos sobre a actividade enzimática acrescida das quinases (Palmer *et al.*, 1997; Galley *et al.*, 1997; Shayan & Ahmed, 1997; Fich *et al.*, 1998; Dobbelaere & Küenzi, 2004; Lizundia *et al.*, 2006; Shiels *et al.*, 2006) e das metaloproteinases de matriz, por exemplo da metaloproteinase 9, nestas células, como factores que também contribuem para a patogenia da teileriose tropical (Baylis *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1995; Adamson & Hall, 1997; Somerville *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2001; Shiels *et al.*, 2006).

Para Forsyth *et al.* (1999), as alterações nos diferentes órgãos e tecidos resultam apenas da proliferação de macrófagos infectados, sendo a restante sintomatologia da responsabilidade das citoquinas proinflamatórias produzidas por estas células, principalmente TNF- α (Graham *et al.*, 2001). Esta citoquina está implicada principalmente no aparecimento de anemia e febre (Ahmed & Melrhon, 1999). No entanto, os resultados obtidos no trabalho que desenvolvemos (ver capítulo II), permitem-nos concluir que o quadro lesional e sintomatológico identificado, não será apenas da responsabilidade destas células mas, também, da infiltração dos diferentes órgãos e tecidos por macrófagos não infectados e linfócitos T.

Por um lado, as características morfológicas das células identificadas nas lesões microscópicas descritas neste capítulo, apontam no sentido da sua semelhança com células linfóides do tipo blásticas (morfologia redonda, mononucleadas e de escasso citoplasma), o que não deixa de estar de acordo com o observado por vários autores (Gill *et al.*, 1977; Campbell *et al.*, 1995; Sager *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*,

1999; Shiels *et al.*, 2004). Por outro, a observação de formas compatíveis com esquizontes no citoplasma de células alvo, com as colorações de rotina que utilizamos (hematoxilina-eosina e Giemsa) é insuficiente para distinguir as diferentes espécies do género *Theileria*. Assim, só a caracterização imunohistoquímica destas células e a revelação da presença de *Theileria annulata* no citoplasma das mesmas permitirá identificar as células presentes nas lesões e o agente responsável pela infecção. Estes aspectos serão abordados em capítulos posteriores.

A sintomatologia observada está de acordo com a evolução das lesões: numa fase inicial, a hipertrofia dos linfonodos e o desenvolvimento de nódulos em vários órgãos e tecidos estará associado à proliferação das células infectadas e de células linfóides resultantes da resposta imune; numa fase mais tardia, de parasitémia elevada, instala-se anemia hemolítica, por vezes, severa, por destruição dos eritrócitos infectados (Gill *et al.*, 1977; Preston *et al.*, 1992a; Forsyth *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999).

Como dissemos no início deste capítulo, as raças importadas ou animais que resultem de cruzamentos com estas são as mais susceptíveis à teileriose tropical (Brown, 1990; Preston *et al.*, 1992a; Urquhart *et al.*, 1996; Glass *et al.*, 2005; Glass & Jensen, 2007; Ahmed *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2008). A susceptibilidade rática, a esta doença, dos animais deste estudo, não está totalmente de acordo com esta indicação, pois 25% dos animais são de raça Alentejana. No entanto, existem muito poucos estudos de susceptibilidade das diferentes raças embora, aquelas que têm origem na espécie *Bos taurus* ou de cruzamentos com esta, são mais vulneráveis à doença, do que as raças com origem em *Bos indicus* (Preston *et al.*, 1992a; Bakheit & Latif, 2002; Glass *et al.*, 2005; Glass & Jensen, 2007; Jensen *et al.*, 2008). Na Europa são reconhecidas cerca de 480 raças, todas com origem em *Bos taurus* (Food and Agriculture Organization, 2000; Beja-Pereira *et al.*, 2006), embora estudos recentes apontem para cruzamentos com *Bos indicus* em algumas raças do sul da Europa (Beja-Pereira *et al.*, 2006).

Conclusão

Em Portugal, nos últimos anos, algumas infecções de vitelos por *Theileria annulata* têm manifestado carácter particularmente patogénico, conduzindo invariavelmente à morte dos animais.

Desde 1999 que temos vindo a coligir dados relativos ao quadro lesional, macroscópico e microscópico, identificado em vitelos infectados por *Theileria annulata*, com aspectos sobreponíveis com processos neoplásicos. A descrição das lesões macroscópicas e microscópicas observadas e a confirmação da disseminação e invasão da maioria dos órgãos e tecidos por células redondas, semelhantes a células linfóides do tipo blástico e, por vezes, infectadas com formas compatíveis de *Theileria annulata*, contribui para caracterizar o quadro lesional desta patologia em Portugal.

Bibliografia

Adamson R.E. & Hall F.R. (1997). A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of *Theileria annulata* infections. *Parasitology Today* 13, 390-393.

Adamson R., Logan M., Kinnaird J., Langsley G. & Hall R. (2000). Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in *Theileria annulata*-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 106, 51-61.

Ahmed J.S., Glass E.J., Salih D.A. & Seitzer U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity* 14, 5-12.

Ahmed J.S. & Mehlhorn H. (1999). Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitology Research* 85, 539-549.

Ahmed J.S., Schnittger L. & Mehlhorn H. (1999). Review: *Theileria* schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitology Research* 85, 527-538.

Baldwin C.L. (1988). Bovine T cells, B cells and null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 56, 462-467.

Bakheit M.A. & Latif A.A. (2002). The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. *Annals of the New York Academy of Sciences* 969, 159-163.

Barnett S. F. (1977). *Theileria*. In *Parasitic Protozoa Vol. IV*. Ed Julius P. Kreier. New York : Academic Press, Inc., 71-113.

Baylis H.A., Megson A. Brown C.G., Wilkioe G.F. & Hall R. (1992). *Theileria annulata*-infected cells produce abundant proteases whose activity is reduced by long-term cell culture. *Parasitology* 105, 417-423.

Baylis H.A., Megson A. & Hall R. (1995). Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, 211-222.

Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetit J., Barbujani G., Luikart G. & Bertorelle G. (2006). The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8113-8118.

Biermann R., Schnittger L., Beyer D. & Ahmed J.S. (2003). Initiation of Translation and Cellular Localization of *Theileria annulata* Casein Kinase II α : Implication for its Role in Host Cell Transformation. *Journal of Cellular Physiology* 196, 444-453.

Brígido C., Fonseca I.P., Parreira R., Fazendeiro I., Rosário V.E. & Centeno-Lima S. (2004). Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Veterinary Parasitology* 123, 17-23.

Brown C.G.D. (1990). Control of Tropical Theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* 32, 23-31.

Brown D.J., Campbell J.D., Russell G.C., Hopkins J. & Glass E.J. (1995). T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. *Clinical and Experimental Immunology* 102, 507-514.

Bussi eras J. & Chermette R. (1992). Protozoologie. *In* Parasitologie V et erinaire (Fascicule II). Service de Parasitologie. École Nationale V et erinaire D'Alfort, France, 70-73.

Caeiro V.M.P. (1973). Aspectos morfo-biológicos das espécies do género *Theileria* Bettencourt, França e Borges, 1907, agentes etiológicos das Teilerioses bovinas na África ao sul do Equador. Interesse do seu estudo. Sumário de uma exposição para efeitos de concurso para provimento de um lugar de Professor Catedrático na Universidade de Luanda.

Caeiro V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia* 41, 11-15.

Campbell J.D.M., Brown D.J., Glass E.J., Hall F.R. & Spooner R.L. (1994). *Theileria annulata* sporozoite targets. *Parasite Immunology* 16, 501-505.

Campbell J.D., Howie S.E., Odling K.A. & Glass E.J. (1995). *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *Clinical and Experimental Immunology* 99, 203-210.

Campbell J.D. M., Nichani A.K., Brown D.J., Glass E.J. & Spooner R.L. (1998). A stage-specific, parasite-induced "window" of *in vivo* interferon-  production is associated with pathogenesis in *Theileria annulata* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 152-154.

Campbell J.D., Nichani A.K., Brown D.J., Howie S.E., Spooner R.L. & Glass E.J. (1997). Parasite-mediated steps in immune response failure during primary *Theileria annulata* infection. *Tropical Animal Health and Production* 29 (Suppl. 4), 133s-135s.

Campbell J.D. & Spooner R.L. (1999). Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 10-16.

Collins R.A., Sopp P., Gelder K.I., Morrison W.I. & Howard C.J. (1996). Bovine gamma/delta TcR+ T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. *Scandinavian Journal of Immunology* 44, 444-452.

Das G., Ghosh S., Ray D.D. (2005). Reduction of *Theileria annulata* infection in ticks fed on calves immunized with purified larval antigens of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Tropical Animal Health and Production* 37, 345-361.

Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo (2008). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. A região Alentejo. In <http://www.draal.min-agricultura.pt/> (acesso em 27 de Outubro de 2009).

Dobbelaere D.A.E., Coquerelle T.M., Roditi I.J., Eichhorn M. & Williams R.O. (1988). *Theileria parva* infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4730-4734.

Dobbelaere D. & Heussler V. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annual Review of Microbiology* 53, 1-42.

Dobbelaere D.A.E. & Küenzi P. (2004). The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology* 16, 524-530.

d'Oliveira C., Weide M., Habela M.A., Jacquet P. & Jongejan F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2665-2669.

Fich C., Klauenberg U., Fleischer B. & Broker B.M. (1998). Modulation of enzymatic activity of Src-family kinases in bovine T cells transformed by *Theileria parva*. *Parasitology* 117, 107-115.

Food and Agriculture Organization - FAO (2000). World Watch List for Domestic Animal Diversity. In FAO-United Nations Environmental Programme, Rome. Ed B.D. Scherf.

Forsyth L.M., Jackson L.A., Wilkie G., Sanderson A., Brown C.G. & Preston P.M. (1997). Bovine cells infected *in vivo* with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor. *Veterinary Research Communications* 21, 249-263.

Forsyth L.M.G., Minns F.C., Kirvar E., Adamson R.E., Hall F.R., McOrist S., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1999). Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 120, 39-57.

CAPÍTULO I

Galley Y., Hagens G., Glaser I., Davis W., Eichhorn M. & Dobbelaere D. (1997). Jun NH₂-terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva*. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 94, 5119-5124.

Gill B.S., Bhattacharyulu Y. & Kaur D. (1977). Symptoms and Pathology of experimental bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 52, 597-608.

Glass E.J. (2001). The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis. Research in Veterinary Science 70, 71-75.

Glass E.J., Craigmile S.C., Springbett A., Preston P.M., Kirvar E., Wilkie G.M., Eckersall P.D., Hall F.R. & Brown C.G. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. International Journal of Parasitology 33, 1409-1418.

Glass E.J., Innes E.A., Spooner R.L. & Brown C.G. (1989). Infection of bovine monocyte/macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. Veterinary Immunology and Immunopathology 22, 355-368.

Glass E.J. & Jensen K. (2007). Resistance and susceptibility to a protozoan parasite – gene expression differences in macrophages from different breeds. Veterinary Immunology and Immunopathology 120, 20-30.

Glass E.J., Preston P.M., Springbett A., Craigmile S.C., Kirvar E., Wilkie G.M. & Brown C.G. (2005). *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. International Journal for Parasitology 35, 337-347.

Graham S.P., Brown D.J., Vatansever Z., Waddington D., Taylor L.H., Nichani A.K., Campbell J.D.M., Adamson R.E., Glass E.J. & Spooner R.L. (2001). Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. Vaccine 19, 2932-2944.

Habela M., Rol J.A., Antón J.M., Peña J., Corchero E., van Ham I. & Jongejan F. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. Parasitologia 41 (Suppl.1), 47-51.

Heussler V.T., Kuenzi P. & Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* 31, 1166-1176.

Irvin A.D. (1985). Immunity in Theileriosis. *Parasitology Today* 1, 124-128.

Jensen K., Paxton E., Waddington D., Talbot R., Darghouth M.A. & Glass E.J. (2008). Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. *International Journal for Parasitology* 38, 313-325.

Leemans I., Brown D., Hooshmand-Rad P., Kirvar E. & Ugglá A. (1999). Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: I. In vivo responses. *Veterinary Parasitology* 82, 179-192.

Leitão J.L.S. (1945). Teileriose bovina em Portugal. Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária II , 1-8.

Lizundia R., Chaussepied M., Huerre M., Werling D., Di Santo J.P. & Langsley G. (2006). c-Jun NH₂-Terminal Kinase/c-Jun Signaling Promotes Survival and Metastasis of B Lymphocytes Transformed by *Theileria*. *Cancer Research* 66, 6105-6110.

Mckeever D.J., Taracha E.L.N., Morrison W.I., Musoke A.J. & Morzaria S.P. (1999). Protective Immune Mechanisms against *Theileria parva*: Evolution of Vaccine Development Strategies. *Parasitology Today* 15, 263-267.

National Center for Biotechnology Information (2009). U.S. National Library of Medicine. *In* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (acesso em Setembro e Outubro de 2009).

Navarrete I., Serrano F.J. & Reina D. (1999). Parasitosis Hemáticas. *In* *Parasitología Veterinaria*. Eds M. Cordero del Campillo & F.A. Rôjo Vázquez. McGraw-Hill – Interamericana, Spain, 294-302.

Palmer G.H., Jr J.M., Fernandez P., Heussler V., Perinat T. & Dobbelaere DAE (1997). Parasite-mediated nuclear factor kB regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12527-12532.

CAPÍTULO I

Preston P.M., Brown C.G.D., Entrican G., Richardson W. & Boid R. (1993). Synthesis of tumor necrosis factor alpha and interferons by mononuclear cells from *Theileria annulata* infected cattle. *Parasite Immunology* 15, 525-534.

Preston P.M., Brown C.G., Bell-Sakyi L., Richardson W. & Sanderson A. (1992a). Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science* 53, 230-243.

Preston P.M., Brown C.G. & Richardson W. (1992b). Cytokines inhibit the development of trophozoite-infected cells of *Theileria annulata* and *Theileria parva* but enhance the proliferation of macroschizont-infected cell. *Parasite Immunology* 14, 125-141.

Preston P.M., Brown C.G. & Spooner R.L. (1983). Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. *Clinical and Experimental Immunology* 53, 88-100.

Preston P.M., Hall F.R., Glass E.J., Campbell J.D.M., Darghouth M.A., Ahmed J.S., Shiels B.R., Spooner R.L., Jongejan F. & Brown C.G.D. (1999). Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 268-274.

Preston P.M. & Jongejan F. (1999). Protective immune mechanisms to ticks and tick-borne diseases of ruminants. *Parasitology Today* 15, 255-258.

Richardson J.O., Forsyth L.M.G., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1998). Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Veterinary Research Communications* 22, 31-45.

Rozen S. & Skaletsky H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Eds S. Krawetz S & S. Misener. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Sager H., Bertoni G. & Jungi T.W. (1998). Differences Between B Cell and Macrophage Transformation by the Bovine Parasite, *Theileria annulata*: A Clonal Approach. *The Journal of Immunology* 161, 335-341.

Sager H., Davis C., Dobbelaere D.A.E. & Jungi T. (1997). Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of

macrophages infected with *Theileria annulata*. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 459-468.

Schneider I., Haller D., Kullmann B., Beyer D., Ahmed J.S., Seitzer U. (2007). Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitology Research* 101, 1471-1482.

Sharma G., Sharma R.D. & Nichani A.K. (1998). Successful long-term in vitro cultivation of *Theileria annulata* schizonts in media supplemented with homologous and heterologous sera. *Veterinary Parasitology* 79, 135-141.

Shayan P. & Ahmed J.S. (1997). *Theileria*-mediated constitutive expression of the casein kinase II-alpha subunit in bovine lymphoblastoid cells. *Parasitology Research* 83, 526-532.

Shiels B., Hall R., Glascodine J., McDougall C., Harrison C., Taracha E., Brown D. & Tait A. (1989). Characterization of surface polypeptides on different life-cycle stages of *Theileria annulata*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 34, 209-220.

Shiels B., Langsley G., Weir W., Pain A., Mckellar S. & Dobbelaere D. (2006). Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *International Journal for Parasitology* 36, 9-21.

Shiels B.R., Mckellar S., Katzer F., Lyons K., Kinnaird J., Ward C., Wastling J.M. & Swan D. (2004). A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryotic Cell* 3, 495-505.

Somerville R.P., Adamson R.E., Brown C.G. & Hall F.R. (1998). Metastasis of *Theileria annulata* macroschizont-infected cells in scid mice is mediated by matrix metalloproteinases. *Parasitology* 116, 223-228.

Spitalska E., Torina A., Cannella V., Caracappa S. & Sparagano O.A. (2004). Discrimination between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene. *Parasitology Research* 94, 318-320.

Spooner R.L., Innes E.A., Glass E.J. & Brown C.G.D. (1989). *Theileria annulata* and *Theileria parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunology* 66, 284-288.

Swan D.G., Phillips K., Tait A. & Shiels B.R. (1999). Evidence for localisation of a *Theileria* parasite AT hook DNA-binding protein to the nucleus of immortalised bovine host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 101, 117-129.

Swan D.G., Stadler L., Okan E., Hoffs M., Katzer F., Kinnaird J., Mckellar S. & Shiels B.R. (2003). TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. *Cellular Microbiology* 5, 947-956.

Swan D.G., Stern R., Mckellar S., Phillips K., Oura C.A.L., Karagenc T.I., Stadler L. & Shiels B.R. (2001). Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *Journal of Cell Science* 114, 2747-2754.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M. & Junnings F.W. (1996). *Veterinary Protozoology*. In *Veterinary Parasitology*. 2nd edition. Blackwell Science, 209-253.

Valli, V.E.O. (2007). The Hematopoietic System. In Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals*. 5th edition. Eds M. Grant Maxie. Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 199-201.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7, 203-214.

Capítulo II: Avaliação imunohistoquímica das lesões identificadas em vitelos infectados por *Theileria annulata*

Introdução

Para melhor conhecimento sobre o processo inflamatório desenvolvido nos quadros lesionais de teileriose tropical e febre da Costa Oriental (cujo agente etiológico é *Theileria parva*) contribuiu, decisivamente, a identificação das células alvo de cada um dos protozoários em questão (Baldwin *et al.*, 1988; Glass *et al.*, 1989; Campbell *et al.*, 1994; Forsyth *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Spooner *et al.*, 1989; Mckeever *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999). No entanto, são escassos os estudos que identificaram as células envolvidas em infecções espontâneas nestas lesões (Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997b; Sager *et al.*, 1997; Forsyth *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2008).

Grande parte das células por nós observadas têm características semelhantes a células linfóides neoplásicas, de tipo blástico (descritas no Capítulo I). Os estudos desenvolvidos por vários autores comprovam que as células alvo das infecções por *Theileria annulata* sofrem alterações fenotípicas (Sager *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Biermann *et al.*, 2003; Shiels *et al.*, 2004). Assim, a caracterização fenotípica destas células é vital para o conhecimento da patogenia da teileriose tropical.

Materiais e Métodos

O estudo imunohistoquímico incidiu sobre fragmentos de linfonodo (escolhido aleatoriamente entre os vários que apresentaram alterações), tecido muscular esquelético e pele de cada um dos 16 animais (Tabela 1). Em alguns casos (Tabela 3) não foi possível realizar este estudo nas lesões da pele por não dispormos de fragmentos da mesma (cadáveres que não foram necropsiados por nós e que, apenas, tivemos acesso aos fragmentos de órgãos e tecidos colhidos durante a necrópsia).

Efectuaram-se cortes seriados de 3 µm de espessura que foram montados em lâminas adesivadas (Thermo Scientific[®], Superfrost Plus),

posteriormente desparafinados e rehidratados e, aos quais, foi aplicado o método indirecto da marcação pela estreptavidina-biotina-peroxidase. A revelação foi efectuada com “HRP Polymer Conjugate” (kit de detecção SuperPicture™ Polymer, Zymed Laboratories). Utilizou-se a solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromogéneo e hematoxilina de Mayer (Anexo IV) para contraste.

Os três anticorpos primários utilizados foram seleccionados de acordo com critérios de especificidade para as células a identificar e para a espécie bovina. No entanto, todos os anticorpos primários utilizados são dirigidos contra antígenos humanos, mas apresentando reactividade cruzada para a espécie bovina (Mason *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 1999).

Para a marcação de macrófagos foi utilizado o anticorpo anti-macrófagos (MAC387, ABD Serotec) que reconhece a proteína mielomonocítica L1 presente no citoplasma de macrófagos/monócitos, histiócitos, granulócitos e células epiteliais escamosas (Brandtzaeg *et al.*, 1988). As células positivas a este anticorpo apresentam marcação do citoplasma.

Para a marcação dos linfócitos T foi utilizado o anticorpo anti-CD3 (Dako) que reconhece uma sequência peptídica do complexo proteico CD3, presente no citoplasma de todas as células T (Mason *et al.*, 1989). A marcação considera-se positiva quando localizada no citoplasma e/ou membrana celular.

A marcação dos linfócitos B foi efectuada com o anticorpo anti-CD79 α (Dako) que reconhece a porção citoplasmática da proteína transmembranária associada à IgM, CD79 α ou mb-1, presente nos linfócitos B, plasmócitos e células musculares lisas (Mason *et al.*, 1991). As células positivas a este anticorpo apresentam marcação do citoplasma.

A metodologia foi semelhante para os três anticorpos primários utilizados, diferindo na solução tampão para recuperação antigénica e na diluição e tempo de incubação para cada um deles, conforme indicação do fabricante. Todos estes dados encontram-se referidos na Tabela 2. A diluição dos soros primários foi realizada com solução tampão de Tris [“Tris Buffered Saline” - TBS (Anexo IV)] e as incubações efectuadas em câmara húmida.

Os controlos positivos utilizados constam da Tabela 2. Estes controlos foram obtidos a partir de órgãos sem lesões, provenientes de vitelos com aproximadamente a mesma idade dos animais deste estudo.

Os controlos negativos foram obtidos substituindo o anticorpo primário por TBS.

O procedimento seguido consta do Anexo III, com as variações referidas na Tabela 2.

Tabela 2: Detalhes da técnica de imunohistoquímica utilizada

Anticorpo primário/clone	Célula alvo	Fabricante/referência	Solução de recuperação antigénica	Diluição do anticorpo primário	Tempo de incubação	Controlo positivo
Anti-CD79 α cy humano/HM57(Mc, rato)	Linfócitos B	Dako/M7051	EDTA pH 9.0	1:50	1 hora, à temperatura ambiente	Linfonodo
Anti-CD3 humano (Pc, coelho)	Linfócitos T	Dako/A0452	EDTA pH 9.0	1:100	1 hora, à temperatura ambiente	Linfonodo
Anti-macrófagos humanos/MAC387 (Mc, rato)	Macrófagos/ Monócitos	ABDSerotec/MCA874G	Tampão citrato pH 6.0	1:100	Durante a noite, à temperatura ambiente	Baço

Mc-monoclonal ; Pc-policlinal

A quantificação da imunorreactividade para cada um dos anticorpos primários utilizados foi efectuada por avaliação semiquantitativa. Quantificou-se, em percentagem, a infiltração de células positivas (macrófagos, linfócitos T e linfócitos B) em cada um dos fragmentos de tecido seleccionados. A quantificação foi efectuada pela observação de todo o corte histológico, no caso dos linfonodos, e pela observação da totalidade da lesão no caso dos cortes de pele e tecido muscular esquelético. As observações foram realizadas com a objectiva de ampliação de 40 vezes, considerando-se os seguintes parâmetros de infiltração por células positivas, para cada um dos anticorpos primários utilizados : $\leq 10\%$ (+); 10-25% (++); 25-50% (+++); $\geq 50\%$ (++++).

A intensidade da marcação foi registada como fraca, moderada e intensa.

Resultados

Para cada um dos anticorpos primários utilizados, os controlos positivos apresentaram a imunorreactividade esperada.

Os resultados globais podem ser avaliados pela consulta da Tabela 3.

Macrófagos/MAC387

Os linfonodos dos animais nº 11 e 12 apresentaram invasão $\leq 10\%$ (+) por células positivas a MAC387 (Tabela 3; Figura 15A). Em três casos (animais nºs 5, 12 e 14), as lesões no tecido muscular também apresentaram invasão $\leq 10\%$ (+) por células macrofágicas. Apenas o animal nº 4 apresentou elevada (++++) percentagem de infiltração por células MAC387 positivas no linfonodo (Tabela 3; Figura 15B). Na pele dos animais nº 5, 6 e 12 a invasão por células positivas a MAC387 foi $\leq 10\%$ (+) e elevada (++++) no animal nº 8 (Tabela 3), que também revelou a mesma percentagem de células positivas no tecido muscular esquelético (Tabela 3).

Nos restantes animais, tanto nos linfonodos como nas lesões cutâneas e musculares, a presença de macrófagos positivos para a proteína em questão variou entre 10-25% (++) e 25-50% (+++; Tabela 3; Figura 16A).

A intensidade da marcação do citoplasma das células macrofágicas presentes nos linfonodos e nas lesões da pele e tecido muscular esquelético foi moderada a intensa (Figura 16B).

Linfócitos T/CD3

Os linfócitos CD3 positivos foram as células predominantes na generalidade dos linfonodos, com infiltração elevada (++++) dos mesmos (Tabela 3; Figura 17A) e localizando-se de forma marcada nos cordões medulares. Apenas em dois casos (animais nºs 9 e 12) a presença destas células é $\leq 10\%$ (+; Tabela 3).

Nas lesões musculares e cutâneas do animal nº 12 verificou-se infiltração $\leq 10\%$ por linfócitos CD3 positivos (Tabela 3). Nas lesões cutâneas do animal nº 6 a presença destas células também foi $\leq 10\%$ (+; Tabela 3).

Com exceção dos casos mencionados anteriormente, das lesões musculares dos animais n^{os} 2, 5 e 10 e das lesões cutâneas do animal n^o 5, nos restantes casos a presença destas células variou entre 25-50% (+++) e \geq 50% (++++; Tabela 3; Figura 17B).

Em todos os fragmentos estudados, a intensidade de marcação das células CD3 positivas foi intensa (Figura 17C).

Linfócitos B/CD79 α cy

Nos linfonodos colhidos de catorze animais (n^{os} 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) a presença de linfócitos B variou entre \leq 10% (+) e 10-25% (++; Tabela 3). Apenas em dois casos (animais n^{os} 15 e 16) esta presença foi de 25-50% (Tabela 3; Figura 18A). Estes dois casos apresentaram, respectivamente, infiltração de 10-25% (++) e 25-50% (+++) nas lesões do tecido muscular (Tabela 3) e 10-25% (++) nas lesões cutâneas (Tabela 3).

Nas lesões cutâneas e musculares, todos os restantes animais apresentaram infiltração \leq 10% (+) por linfócitos CD79 α cy (Tabela 3).

Todas as células cuja imunorreactividade foi positiva para CD79 α cy apresentaram intensidade de marcação fraca a moderada (Figura 18B).

Tabela 3: Avaliação da imunorreatividade para MAC387, CD3 e CD79 α cy das células presentes nos linfonodos, nas lesões do tecido muscular esquelético e da pele (Ln – linfonodo; Me – músculo esquelético; P – pele; nd – não determinado)

Anticorpos primários	Orgãos	Animais (Tabela 1)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
MAC387	Ln	+++	+++	++	++++	++	+++	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	++	++
	Me	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+	+++	+++	++
	P	+++	nd	++	+++	+	+	nd	++++	nd	nd	++	+	+++	nd	+++	+++	++
CD3	Ln	++++	++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	+	++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++
	Me	+++	++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++++	+	++++	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	+++	+++	++	+	nd	++++	nd	nd	+++	+	+++	nd	+++	+++	+++
CD79αcy	Ln	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	+	+++	+++	+++
	Me	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+++
	P	+	nd	+	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	nd	++	++	++

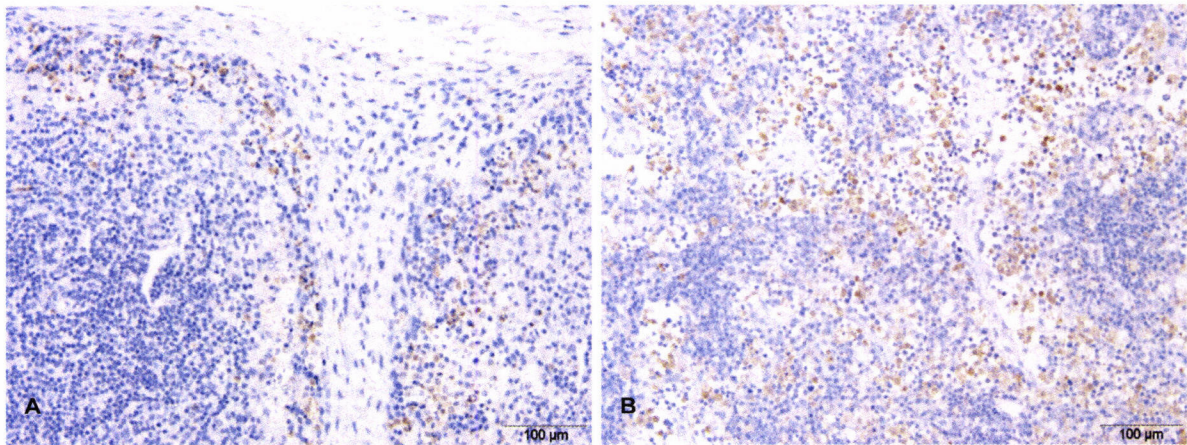


Figura 15: A - Infiltração escassa por células MAC387 positivas do córtex de linfonodo. B - Infiltração elevada por células MAC387 positivas da zona medular de linfonodo (A e B: rato anti-macrófagos humanos, estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

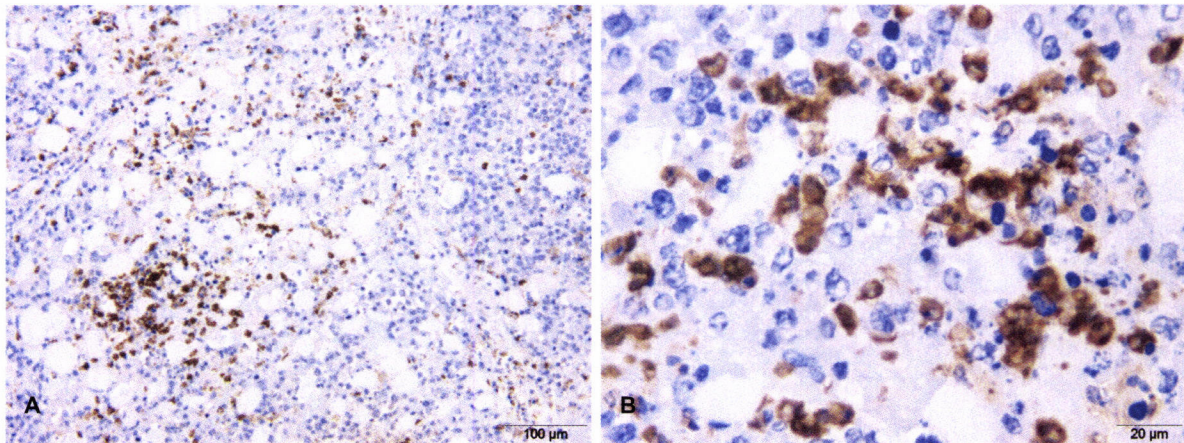


Figura 16: A - Infiltração do tecido muscular esquelético por células MAC387 positivas. B - Células MAC387 positivas, com marcação intensa do citoplasma, presentes entre as fibras musculares esqueléticas (A e B: rato anti-macrófagos, estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

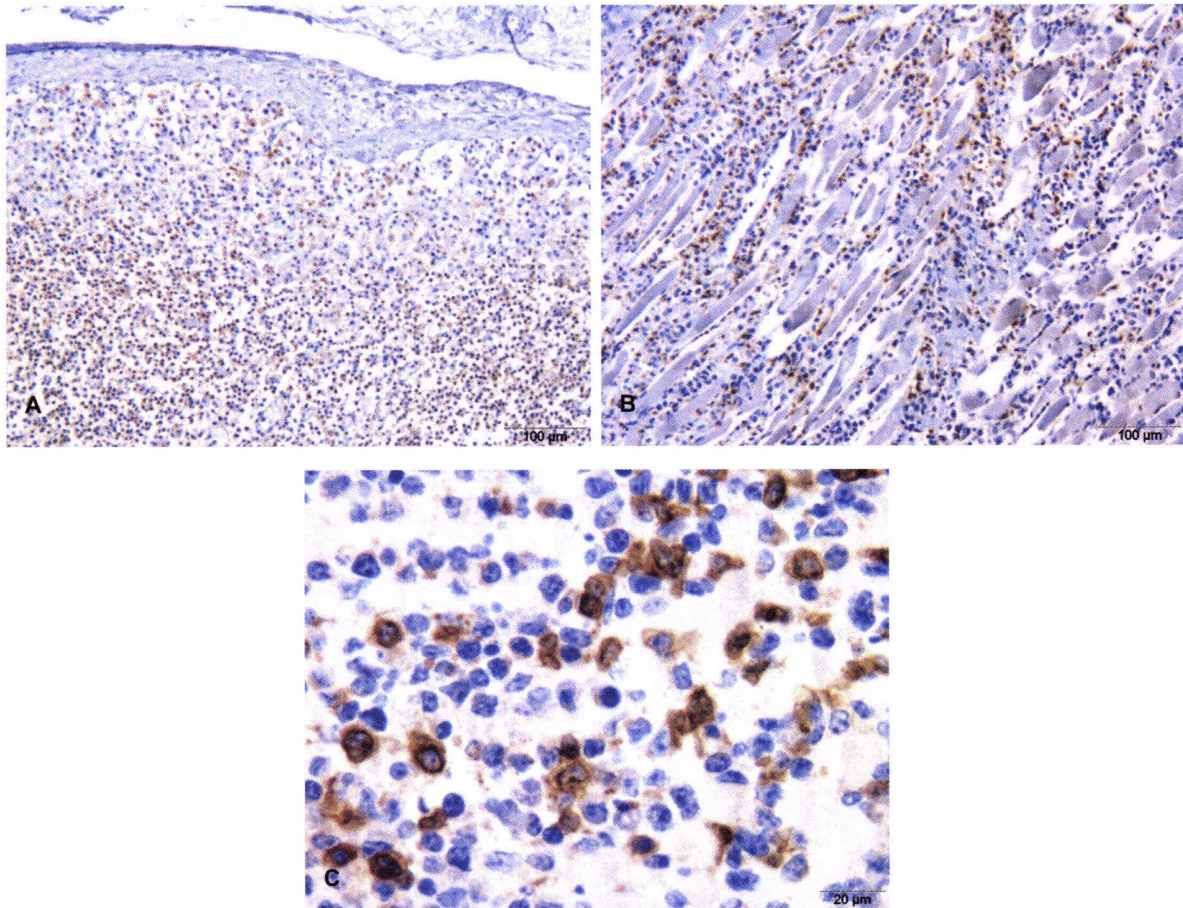


Figura 17: A - Infiltração difusa de linfonodo por células CD3 positivas. B - Infiltração do tecido muscular esquelético por células CD3 positivas. C - Células CD3 positivas com marcação intensa do citoplasma (A, B e C: coelho anti-CD3, estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

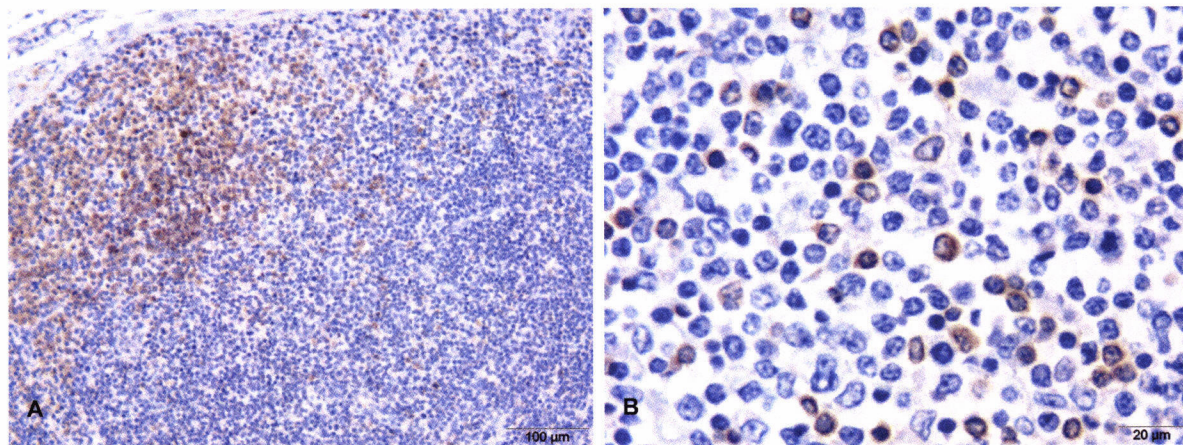


Figura 18: A - Presença de células CD79 α positivas no córtex de linfonodo. B - Células CD79 α positivas com intensidade de marcação fraca a moderada do citoplasma (A e B: rato anti-CD79 α , estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

Discussão

A patogenia da teileriose tropical tem na invasão dos leucócitos (macrófagos) e na sua proliferação descontrolada, um dos aspectos mais importantes para a compreensão da resposta inflamatória/imunitária à infecção por *Theileria annulata* (Glass *et al.*, 1989; Glass & Spooner, 1990; Campbell *et al.*, 1994; Forsyth *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Forsyth *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass, 2001; Graham *et al.*, 2001; Ahmed, *et al.*, 2008). Vários estudos *in vitro* relatam a proliferação das células infectadas, sendo estas da linha mielóide, de acordo com a expressão de vários marcadores característicos desta linhagem celular (Spooner *et al.*, 1989; Glass & Spooner, 1990; Howard *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Forsyth *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 1999).

Tal como dissemos no Capítulo I, as explicações desenvolvidas para a resposta imunitária suscitada por cada fase de evolução deste protozoário no hospedeiro bovino justificam as lesões observadas (Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Glass *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008).

Nos animais do nosso estudo, estas lesões caracterizaram-se por proliferação predominante de macrófagos, identificados com anticorpo monoclonal MAC387, e de linfócitos T, CD3 positivos.

Se por um lado, a capacidade invasora multisistémica adquirida pelos macrófagos após infecção por *Theileria annulata* (Baylis *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Adamson *et al.*, 2000; Biermann *et al.*, 2003), justifica a sua presença, por outro, a capacidade destas células estimularem a proliferação de mais células macrofágicas como parte integrante da resposta inflamatória ao protozoário, vem justificar a marcada presença destas células nas lesões dos animais infectados (Glass & Spooner 1990; Campbell *et al.*, 1995; Adamson *et al.*, 2000; Biermann *et al.*, 2003). A capacidade invasora acrescida dos macrófagos infectados parece estar relacionada com a expressão e aumento da actividade de metaloproteinases e moléculas de adesão, como CD2, CD11b e CD9. As primeiras actuam por digestão de componentes da matriz extracelular e as segundas facilitam a migração dos macrófagos através dos tecidos (Baylis *et al.*, 1995; Birkedal-Hansen, 1995; Adamson & Hall, 1997;

Forsyth *et al.*, 1997; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Adamson *et al.*, 2000). De acordo com Campbell *et al.* (1998) também o INF- γ estimula a proliferação destas células.

Apesar de no Capítulo I termos abordado a resposta inflamatória/imunitária, mediada pelas células T em infecções primárias por *Theileria annulata*, não podemos deixar novamente de enfatizar a mesma questão de forma a justificarmos os resultados por nós obtidos e que apresentamos no presente Capítulo:

De um modo geral, os linfócitos T (CD4⁺, linfócitos T helper e CD8⁺, linfócitos T citotóxicos) têm um papel fundamental na resposta inflamatória/imunitária desencadeada contra protozoários que infectam células da linha mielóide (Preston *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1995; Campbell & Spooner, 1999; Preston *et al.*, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Glass, 2001).

Nas infecções por *Theileria annulata*, a proliferação dos linfócitos T é estimulada pela presença de citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α , TNF- α e MMP9) produzidas pelos macrófagos infectados. Esta proliferação é também ajudada pela apresentação eficaz de antígenos pelas células infectadas às células T (Glass & Spooner, 1990; Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997a; Campbell & Spooner, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Preston & Jongejan, 1999; Glass *et al.*, 2003). Esta interacção possibilita a activação das células T, particularmente os linfócitos T helper, que sintetizam INF- γ e IL-2, constituindo um factor de estimulação acrescido para linfócitos T citotóxicos e para macrófagos infectados e não infectados (Preston *et al.*, 1983; Preston *et al.*, 1992; Preston *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1996; Adamson & Hall, 1997; Campbell *et al.*, 1997b; Campbell *et al.*, 1998; Ahmed & Mehlhorn, 1999; Campbell & Spooner, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Preston *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008).

Vários autores (Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997a; Campbell & Spooner, 1999) identificaram, nos linfonodos que drenam a zona da pele sujeita a picada de carraças infectadas com *Theileria annulata*, células que expressaram vários marcadores para macrófagos mas, maioritariamente, células que expressaram marcadores compatíveis com linfócitos T. Estes autores verificaram ainda que a presença de linfócitos T era particularmente

evidente na zona medular desses linfonodos. A identificação de macrófagos em vários órgãos e tecidos, para além dos linfonodos, foi também descrita por Forsyth *et al.* (1997) e Forsyth *et al.* (1999). Os resultados por nós obtidos, relativamente ao fenótipo das células identificadas e à sua localização, estão de acordo com os observados por estes autores.

De um modo geral, está descrito que a activação e apresentação de antígenos a linfócitos T ocorre, preferencialmente, na zona paracortical dos linfonodos (Bogen *et al.*, 1991). No entanto, foi observado que a proliferação de macrófagos na zona medular dos linfonodos que drenaram a zona da picada de carraças infectadas com *Theileria annulata* é geralmente exuberante (Campbell *et al.*, 1995; Nichani *et al.*, 2003). Campbell *et al.* (1995) sugerem que, nos linfonodos, a apresentação de antígenos de *Theileria annulata* pelos macrófagos infectados aos linfócitos T, ocorre na zona medular, induzindo a proliferação policlonal destas células, que posteriormente abandonam os linfonodos (Nichani *et al.*, 2003). A alteração do local de apresentação antigénica e activação das células T poderá ser a responsável pela expansão destas células a todo o linfonodo e a outros órgãos e tecidos. Estes autores descrevem ainda a perda da morfologia normal dos centros germinativos dos linfonodos (ausência de distinção da “zona clara” e da “zona escura”), como consequência da proliferação das células T, o que está de acordo com as lesões por nós observadas nos linfonodos e que foram descritas no Capítulo I. Em nossa opinião, a alteração do local de apresentação antigénica pode estar relacionado com a infiltração marcada de células T nos cordões medulares, possibilitando o contacto com macrófagos infectados. Esta interacção, tal como foi referida, ao estimular a multiplicação das células T, aumenta a quantidade destas células no linfonodo, particularmente na zona medular, permitindo a saída rápida das mesmas por via linfática (vasos linfáticos eferentes). Aliás, também a saída dos macrófagos infectados por esta via de circulação, poderá justificar a sua rápida proliferação pelos diferentes órgãos e tecidos.

A presença de linfócitos B nos linfonodos por nós estudados foi na generalidade escassa, ou seja, frequentemente a quantidade destas células era seguramente inferior à verificada nos linfonodos sem alterações (Junqueira & Carneiro, 2004; Young *et al.*, 2007). Por outro lado, a localização destas

células nem sempre obedecia à localização descrita para os linfócitos B, nomeadamente nos centros germinativos e cordões medulares (Junqueira & Carneiro, 2004; Young *et al.*, 2007). Nos linfonodos analisados localizavam-se, preferencialmente, nos centros germinativos. Estes resultados estão de acordo com o observado por Campbell *et al.* (1995) relativamente aos linfonodos que drenaram o local de picada das carraças infectadas. Aliás, a presença destas células foi, segundo os mesmos autores, tanto mais escassa, quanto maior o tempo decorrido após a infecção. Mais raramente, a quantidade e distribuição dos linfócitos B nos linfonodos por nós estudados, não apresentava alterações significativas, quando comparadas com linfonodos usados como controlo positivo, reproduzindo a distribuição celular descrita em linfonodos sem alterações (Junqueira & Carneiro, 2004; Young *et al.*, 2007).

Campbell *et al.* (1997a) sugerem que a presença de elevados níveis de INF- γ , produzido pelos linfócitos T, poderá bloquear a diferenciação de linfócitos B na “zona escura” dos centros germinativos. A activação dos linfócitos B e a sua deslocação da “zona escura” para a “zona clara” dos centros germinativos, está dependente da expressão de imunoglobulinas. Após activação das células B, antes da produção de imunoglobulinas, estas tornam-se bastante sensíveis à acção do INF- γ . Esta citocina pode, então, bloquear a produção de imunoglobulinas por estas células, não permitindo a sua diferenciação e proliferação (Abed *et al.*, 1994).

A análise dos resultados obtidos, permite verificar, em alguns casos, ausência de imunoreactividade das células para os marcadores utilizados. Estes resultados podem estar associados com o estado de conservação do cadáver na altura da colheita dos fragmentos de órgãos e tecidos, com a fixação prolongada deste material e as condições em que decorreu essa fixação, contribuindo para a perda de antígenos. Os resultados obtidos para o animal nº 12 podem ser um exemplo desta situação, pois demonstram a ausência de marcação pelos três anticorpos primários em todos os tecidos analisados. A ausência de marcação das células infectadas por *Theileria annulata*, pode ainda ser devida a alterações fenotípicas, em consequência da modificação da expressão de alguns genes induzidas pelo protozoário (Spooner *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1994; Sager *et al.*,

1997; Sager *et al.*, 1998; Dobbelaere & Heussler, 1999; Adamson *et al.*, 2000; Shiels *et al.*, 2004; Shiels *et al.*, 2006).

Conclusão

As lesões microscópicas identificadas nos linfonodos, na pele e no tecido muscular esquelético de vitelos infectados com *Theileria annulata*, caracterizaram-se pela infiltração nodular de células mononucleadas, nomeadamente macrófagos e linfócitos T e em quantidade mais escassa de linfócitos B.

Bibliografia

Abed N.S., Chace J.H. & Cowdery J.S. (1994). T cell-independent and T cell-dependent B cell activation increases IFN-gamma R expression and renders B cells sensitive to IFN-gamma-mediated inhibition. *Journal of Immunology* 153, 3369-3377.

Adamson R.E. & Hall F.R. (1997). A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of *Theileria annulata* infections. *Parasitology Today* 13, 390-393.

Adamson R., Logan M., Kinnaird J., Langsley G. & Hall R. (2000). Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in *Theileria annulata*-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 106, 51-61.

Ahmed J.S., Glass E.J., Salih D.A. & Seitzer U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity* 14, 5-12.

Ahmed J.S. & Mehlhorn H. (1999). Review: the cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitology Research* 85, 539-549.

Baldwin, C.L., (1988). Bovine T cells, B cells and null cells are transformed by the protozoan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 56, 462-467.

Baylis H.A., Megson A. & Hall R. (1995). Infection with *Theileria annulata* induces expression of matrix metalloproteinase 9 and transcription factor AP-1 in bovine leucocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, 211-222.

CAPÍTULO II

Biermann R., Schnittger L., Beyer D. & Ahmed J.S. (2003). Initiation of Translation and Cellular Localization of *Theileria annulata* Casein Kinase II α : Implication for its Role in Host Cell Transformation. *Journal of Cellular Physiology* 196, 444-453.

Birkedal-Hansen H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 728-735.

Bogen S.A., Weinberg D.S. & Abbas A.K. (1991). Histologic analysis of T lymphocyte activation in reactive lymph nodes. *Journal of Immunology* 147, 1537-1541.

Brandtzaeg P., Jones P., Flavell D.J. & Fagerhol M.K. (1988). Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *Journal of Clinical Pathology* 41, 963-970.

Brown D.J., Campbell J.D., Russell G.C., Hopkins J. & Glass E.J. (1995). T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. *Clinical and Experimental Immunology* 102, 507-514.

Campbell J.D.M., Brown D.J., Glass E.J., Hall F.R. & Spooner R.L. (1994). *Theileria annulata* sporozoite targets. *Parasite Immunology* 16, 501-505.

Campbell J.D., Howie S.E., Odling K.A. & Glass E.J. (1995). *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *Clinical and Experimental Immunology* 99, 203-210.

Campbell J.D.M., Brown D.J., Nichani A.K., Howie S.E.M., Spooner, R.L. & Glass E.J. (1997a). A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan *Theileria annulata*. *Clinical and Experimental Immunology* 108, 463-470.

Campbell J.D., Nichani A.K., Brown D.J., Howie S.E., Spooner R.L. & Glass E.J. (1997b). Parasite-mediated steps in immune response failure during primary *Theileria annulata* infection. *Tropical Animal Health and Production* 29 (4 Suppl.), 133s-135s.

Campbell J.D. M., Nichani A.K., Brown D.J., Glass E.J. & Spooner R.L. (1998). A stage-specific, parasite-induced "window" of *in vivo* interferon- γ production is associated with pathogenesis in *Theileria annulata* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 152-154.

Campbell J.D. & Spooner R.L. (1999). Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 10-16.

Collins R.A., Sopp P., Gelder K.I., Morrison W.I. & Howard C.J. (1996). Bovine gamma/delta TcR+ T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. *Scandinavian Journal of Immunology* 44, 444-452.

Dobbelaere D. & Heussler V. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annual Review of Microbiology* 53, 1-42.

Forsyth L.M., Jackson L.A., Wilkie G., Sanderson A., Brown C.G. & Preston P.M. (1997). Bovine cells infected *in vivo* with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor. *Veterinary Research Communications* 21, 249-263.

Forsyth L.M.G., Minns F.C., Kirvar E., Adamson R.E., Hall F.R., McOrist S., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1999). Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 120, 39-57.

Glass E.J. (2001). The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis. *Research in Veterinary Science* 70, 71-75.

Glass E.J., Craigmile S.C., Springbett A., Preston P.M., Kirvar E., Wilkie G.M., Eckersall P.D., Hall F.R. & Brown C.G.D. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *International Journal of Parasitology* 33, 1409-1418.

Glass E.J., Innes E.A., Spooner R.L. & Brown C.G. (1989). Infection of bovine monocyte/macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22, 355-368.

Glass E.J. & Spooner R.L. (1990). Parasite-accessory cell interactions in theileriosis. Antigen presentation by *Theileria annulata*-infected macrophages and production of continuously growing antigen-presenting cell lines. *European Journal of Immunology* 20, 2491-2497.

Graham S.P., Brown D.J., Vatansever Z., Waddington D., Taylor L.H., Nichani A.K., Campbell J.D.M., Adamson R.E., Glass E.J. & Spooner R.L. (2001). Proinflammatory

cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. *Vaccine* 19, 2932-2944.

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

Howard C.J., Sopp P., Preston P.M., Jackson L.A. & Brown C.G. (1993). Phenotypic analysis of bovine leukocyte cell line infected with *Theileria annulata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 39, 275-282.

Jones M., Cordell J.L., Beyers A.D., Tse A.G. & Mason D.Y. (1993). Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *Journal of Immunology* 150, 5429-5435.

Junqueira L.C. & Carneiro J. (2004). Sistema Imunitário e órgãos linfáticos. *In* *Histologia Básica*. 10ª edição. Guanabara-Koogan S.A., 254-283.

Kelley L.C., Mahaffey E.A., Bounous D.I., Antczak D.F. & Brooks R.L.Jr (1997). Detection of equine and bovine T- and B-lymphocytes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 57, 187-200.

Mason D.Y., Cordell J., Brown M., Pallesen G., Ralfkiaer E., Rothbard J., Crumpton M. & Gatter K.C. (1989). Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *Journal of Clinical Pathology* 42, 1194-1200.

Mason D.Y., Cordell J.L., Tse A.G., van Dongen J.J., van Noesel C.J., Micklem K., Pulford K.A., Valensi F., Comans-Bitter W.M. & Borst J. (1991). The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *Journal of Immunology* 147, 2474-2482.

Mckeever D.J., Taracha E.L.N., Morrison W.I., Musoke A.J. & Morzaria S.P. (1999). Protective Immune Mechanisms against *Theileria parva*: Evolution of Vaccine Development Strategies. *Parasitology Today* 15, 263-267.

Nichani A.K., Campbell J.D., Glass E.J., Graham S.P., Craigmile S.C., Brown C.G. & Spooner R.L. (2003). Characterization of efferent lymph cells and their function following immunization of cattle with an allogenic *Theileria annulata* infected cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93, 39-49.

Preston P.M., Brown C.G.D., Entrican G., Richardson W. & Boid R. (1993). Synthesis of tumor necrosis factor alpha and interferons by mononuclear cells from *Theileria annulata* infected cattle. *Parasite Immunology* 15, 525-534.

Preston P.M., Brown C.G. & Richardson W. (1992). Cytokines inhibit the development of trophozoite-infected cells of *Theileria annulata* and *Theileria parva* but enhance the proliferation of macroschizont-infected cell. *Parasite Immunology* 14, 125-141.

Preston P.M., Brown C.G. & Spooner R.L. (1983). Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. *Clinical and Experimental Immunology* 53, 88-100.

Preston P.M., Hall F.R., Glass E.J., Campbell J.D.M., Darghouth M.A., Ahmed J.S., Shiels B.R., Spooner R.L., Jongejan F. & Brown C.G.D. (1999). Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 268-274.

Preston P.M., Jongejan F. (1999). Protective immune mechanisms to ticks and tick-borne diseases of ruminants. *Parasitology Today* 15, 255-258

Sager H., Bertoni G. & Jungi T.W. (1998). Differences between B cell and macrophage transformation by the bovine parasite, *Theileria annulata*: a clonal approach. *Journal of Immunology* 161, 335-341.

Sager H., Davis C., Dobbelaere D.A.E. & Jungi T. (1997). Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with *Theileria annulata*. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 459-468.

Shiels B., Langsley G., Weir W., Pain A., Mckellar S. & Dobbelaere D. (2006). Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *International Journal for Parasitology* 36, 9-21.

CAPÍTULO II

Shiels B.R., Mckellar S., Katzer F., Lyons K., Kinnaird J., Ward C., Wastling J.M. & Swan D. (2004). A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line. *Eukaryotic Cell* 3, 495-505.

Spooner R.L., Innes E.A., Glass E.J. & Brown C.G.D. (1989). *Theileria annulata* and *Theileria parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunology* 66, 284-288.

Young B., Lowe J.S., Stevens A. & Heath J.W. (2007). Sistema Imunológico e órgãos linfáticos. *In* Wheater Histologia Funcional. 5ª edição. Churchill Livingstone Elsevier, 207-233.

Capítulo III: Identificação imunohistoquímica de esquizontes de *Theileria annulata*

Introdução

O diagnóstico em vida de teileriose tropical é realizado por rotina com recurso a esfregaços de sangue periférico e de linfonodos, baseando-se em critérios morfológicos característicos das formas parasitárias em questão. O mesmo diagnóstico pode ser realizado *post-mortem*, através de esfregaços por aposição de fragmentos de tecidos ou órgãos. As características morfológicas são, no entanto, insuficientes para distinguir as diferentes espécies do género *Theileria*, sendo necessário recorrer conjuntamente a critérios clínicos, epidemiológicos e moleculares para um diagnóstico mais específico (Leitão, 1945; Tait & Hall, 1990; Campbell *et al.*, 1995; d'Oliveira *et al.*, 1995; Urquhart *et al.*, 1996; Chae *et al.*, 1999; Forsyth *et al.*, 1999; Habela *et al.*, 1999; Navarrete *et al.*, 1999; Manuja *et al.*, 2001; Glass *et al.*, 2003; Brígido *et al.*, 2004).

O uso de testes serológicos para detecção de anticorpos circulantes tem sido menos utilizado devido à reactividade cruzada entre diferentes espécies do género *Theileria* e à detecção de falsos negativos em animais portadores crónicos assintomáticos (Hooshmand-Rad & Hashemi-Fesharki, 1971; Burridge *et al.*, 1974; d'Oliveira *et al.*, 1995; Habela *et al.*, 1999; Gubbels *et al.*, 2000a; Manuja *et al.*, 2001; Renneker *et al.*, 2008).

As técnicas de biologia molecular, como a reacção em cadeia da polimerase (PCR), que utilizam sangue ou mesmo aspirado de punção de linfonodo, permitem a identificação de fragmento(s) de ácido desoxirribonucleico (ADN) específico(s) de *Theileria annulata* (d'Oliveira *et al.*, 1995; Chae *et al.*, 1999; Habela *et al.*, 1999; Kirvar *et al.*, 2000; Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Salih *et al.*, 2005).

A identificação de esquizontes, com base na sua morfologia, em cortes histológicos (biópsias de linfonodos ou fragmentos de órgãos colhidos em exame *post-mortem*) corados pela hematoxilina-eosina e Giemsa torna-se

ainda mais difícil. A obtenção de diagnóstico mais específico pode ser alcançada por imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos anti-*Theileria annulata*, em cortes de tecidos supostamente afectados (Tait & Hall, 1990; Campbell *et al.*, 1995; Forsyth *et al.*, 1999; Renneker *et al.*, 2008).

Materiais e Métodos

A detecção de esquizontes de *Theileria annulata* incidiu sobre fragmentos de linfonodo e lesões nodulares do tecido muscular esquelético ou pele dos 16 animais (Tabela 1). Pelo facto dos anticorpos primários utilizados, dois monoclonais (1C7 e 1C12) e um policlonal produzido em coelho (R2185) terem sido gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Brian Shiels (Departamento de Parasitologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Glasgow), não dispusemos de quantidade suficiente de anticorpo para realizar este estudo em todos os mesmos fragmentos utilizados no trabalho experimental apresentado no Capítulo II. Deste modo, optou-se, em cada caso, pela escolha de um fragmento de linfonodo, um de tecido muscular esquelético e, por vezes, um fragmento de pele, principalmente quando as lesões neste tecido se caracterizavam por exuberante infiltração celular e presença de formas suspeitas de esquizontes (visualizadas com coloração pela hematoxilina-eosina) em algumas das células que constituem estas lesões.

Todos os fragmentos seleccionados foram sujeitos a cortes seriados de 3 µm de espessura, montados em lâminas adesivadas (Thermo Scientific®, Superfrost Plus), posteriormente desparafinados e rehidratados, aos quais, de seguida, foi aplicado o método indirecto da marcação pela estreptavidina-biotina-peroxidase. A revelação foi efectuada com “HRP Polymer Conjugate” (kit de detecção SuperPicture™ Polymer, Zymed Laboratories). Utilizou-se a solução de 3.3'-diaminobenzidina (DAB) como cromogéneo e hematoxilina de Mayer (Anexo IV) para contraste. O procedimento seguido encontra-se descrito no Anexo V.

Ambos os anticorpos monoclonais (1C7 e 1C12) reconhecem epítomos na superfície da membrana dos esquizontes de *Theileria annulata* e o policlonal (R2185) é dirigido contra proteínas do tipo proteínas de choque

térmico (Shiels *et al.*, 1986a; Shiels *et al.*, 1986b; Renneker *et al.*, 2008). Os primeiros foram utilizados puros (a partir do sobrenadante da cultura), sem necessidade de diluição e o último foi diluído a 1:800 (conforme indicação do Professor Doutor Brian Shiels) em solução tampão de Tris (Anexo IV). As incubações foram efectuadas em câmara húmida à temperatura ambiente durante 1 hora.

Os resultados da utilização do anticorpo policlonal R2185 ainda não foram concluídos pelo grupo de trabalho coordenado pelo Professor Doutor Brian Shiels, pelo que não dispunhamos de informação sobre a metodologia empregue com sucesso na sua utilização. Por esta razão, realizaram-se previamente alguns testes para averiguar a necessidade de recuperação antigénica. Para os anticorpos monoclonais foi necessário recorrer a recuperação antigénica. Já para o anticorpo policlonal os resultados foram mais satisfatórios sem recuperação.

Os controlos positivos só foram obtidos depois de realizados com sucesso os primeiros ensaios com cada um dos anticorpos. A imunorreactividade positiva é visualizada como pigmentação castanha no citoplasma das células alvo.

Resultados

A marcação obtida com anticorpos anti-*Theileria annulata* para a(s) estirpe(s) portuguesa(s) é aqui apresentada pela primeira vez.

Os resultados que apresentamos (Tabela 4) foram considerados após observação de toda a extensão do corte seleccionado no caso dos linfonodos, e toda a extensão das lesões observadas no tecido muscular esquelético e pele. Realizou-se avaliação semiquantitativa para quantificação da imunorreactividade para cada um dos anticorpos anti-*Theileria annulata*. Considerou-se, para cada anticorpo, como negativos (-) os casos em que não foram observadas células infectadas.

CAPÍTULO III

Para os casos positivos considerou-se a seguinte classificação:

≤10% de células infectadas : +

10% a 25% de células infectadas : ++

25 a 50% de células infectadas : +++

≥50% de células infectadas : ++++

Tabela 4: Avaliação da imunorreactividade para 1C7, 1C12 e R2185 (Ln – linfonodo; Me – músculo esquelético; P – pele; nd – não determinado)

Anticorpos primários	Orgãos	Animais (Tabela nº 1, Capítulo I)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1C7	Ln	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	++	+++	+++	+++
	Me	+++	+++	++	++++	+	+++	++++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	nd	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+++	+++	+++	++
1C12	Ln	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	-	++++	++++	++++	++
	Me	+++	+++	+++	+++	+++	++	++++	+++	++++	+++	+++	-	++++	++++	++++	++
	P	+++	nd	nd	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+++	nd	+++	++
R2185	Ln	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+++
	Me	+++	++++	++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	nd	++++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+++	nd	+++	+++

Tabela 5: Avaliação da imunorreatividade para MAC387, CD3, CD79 α y, 1C7, 1C12 e R2185 (Ln – linfonodo; Me – músculo esquelético; P – pele; nd – não determinado)

Anticorpos primários	Orgãos	Animais (Tabela nº 1, Capítulo I)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
MAC387	Ln	+++	+++	++	++++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+	++	++	++	++
	Me	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
	P	+++	nd	++	+++	+	+++	+++	+++	nd	++	+++	+	+++	nd	+++	+++
CD3	Ln	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++	+	+	+	++++	++++	++++	++++
	Me	+++	++	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	+++	+++	++	+++	+++	+	nd	+++	+++	+	+++	nd	+++	+++
CD79 α y	Ln	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	++	+	++	+++
	Me	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
	P	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	++	+++
1C7	Ln	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	Me	+++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	nd	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+++	nd	+++	+++
1C12	Ln	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
	Me	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	nd	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+++	nd	+++	+++
R2185	Ln	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	Me	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	P	+++	nd	nd	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+++	nd	+++	+++

A análise da Tabela 4 permite verificar que quase todos os casos apresentaram resultados semelhantes para todos os anticorpos testados, com mais de 50% de células infectadas (Figura 19A, 20A e 21A), ou em alguns casos 25% a 50%. Apenas um caso, nº 12, apresentou resultados negativos para a marcação com os anticorpos 1C7 e 1C12 e poucas células ($\leq 10\%$) com marcação positiva para o anticorpo R2185.

Os resultados obtidos para a marcação com o anticorpo R2185 não foram publicados na bibliografia internacional, até à data de realização deste trabalho.

Na Tabela 5 apresentamos os resultados obtidos para a marcação imunohistoquímica de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e esquizontes de *Theileria annulata*, em fragmentos de linfonodo, músculo esquelético e pele (sempre que possível), para cada um dos vitelos alvo deste estudo.

De acordo com o exposto no Capítulo II e voltando a analisar os resultados pela Tabela 5, as células identificadas nas lesões descritas em infecções por *Theileria annulata* correspondem maioritariamente a macrófagos e linfócitos T. Após marcação imunohistoquímica destas lesões com os anticorpos anti-*Theileria annulata* avaliou-se a percentagem de células infectadas e verificou-se que, com excepção do caso nº 12, todos apresentaram células infectadas nos linfonodos e nas lesões do tecido muscular esquelético e pele (nos casos em que foi possível realizar esta avaliação neste tecido).

A intensidade da marcação foi, em todos os casos, moderada com o anticorpo 1C12 (Figura 20B) e bastante intensa com os anticorpos 1C7 (Figura 19B) e R2185 (Figura 21B).

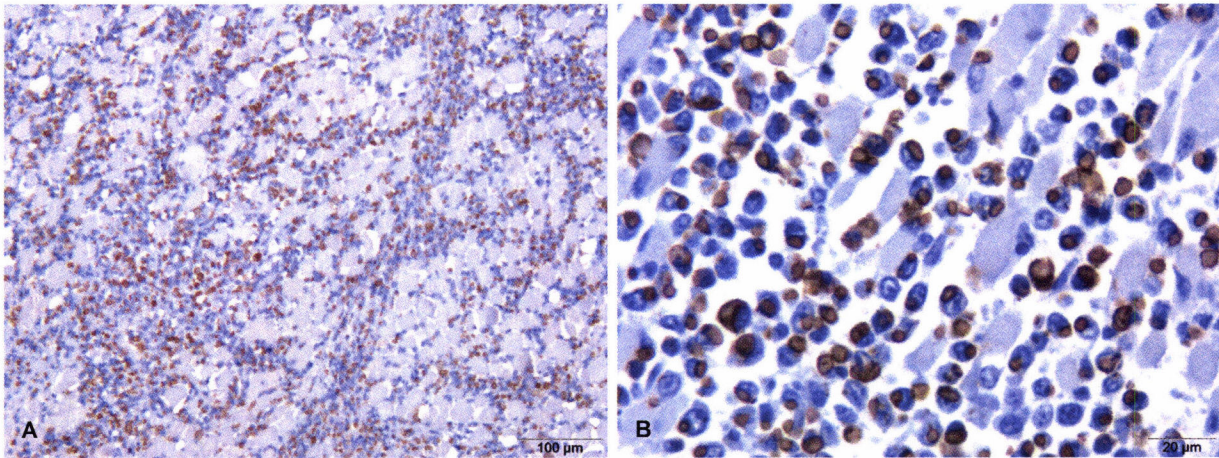


Figura 19: A - Infiltração exuberante do tecido muscular esquelético por células infectadas, positivas para o anticorpo monoclonal 1C7. B - Células infectadas, positivas para o anticorpo 1C7, cuja intensidade de marcação é muito forte, presentes entre as fibras musculares esqueléticas (A e B: estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

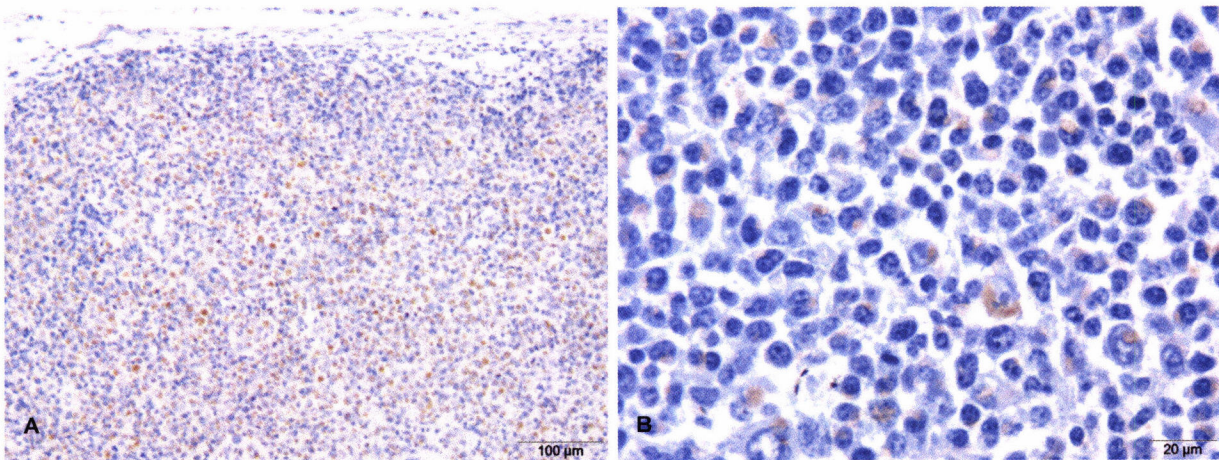


Figura 20: A - Infiltração do linfonodo por células infectadas, positivas para o anticorpo monoclonal 1C12. B - Células infectadas positivas para o anticorpo 1C12, onde se observa marcação de intensidade moderada (A e B: estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

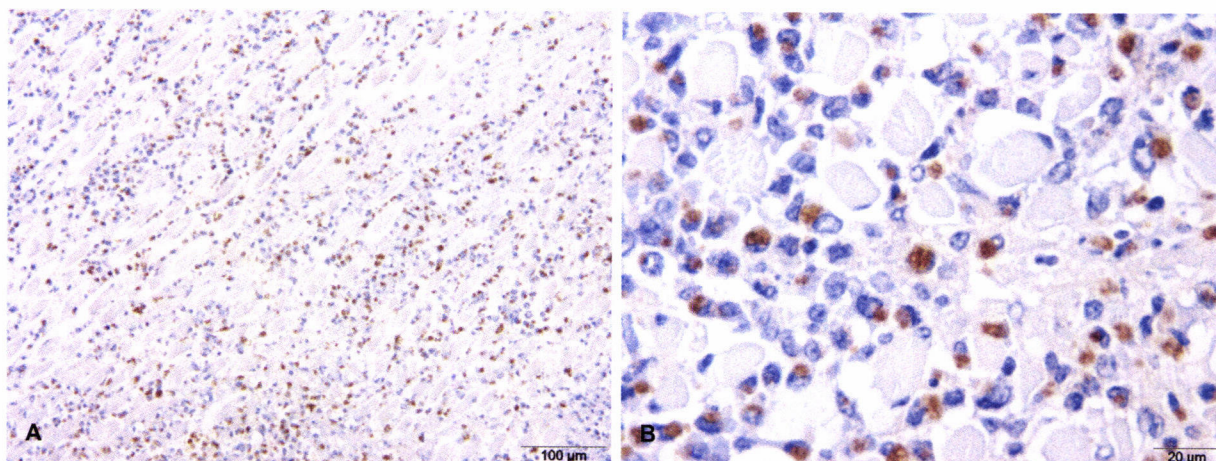


Figura 21: A - Infiltração do tecido muscular esquelético por células infectadas, positivas para o anticorpo policlonal R2185. B - No tecido conjuntivo intersticial do tecido muscular esquelético observam-se células infectadas, positivas para o anticorpo R2185, com elevada intensidade de marcação (A e B: estreptavidina-biotina-peroxidase, contraste com hematoxilina de Mayer).

Discussão

O diagnóstico de teileriose tropical, com base na utilização de cortes histológicos a partir de biópsias de linfonodo realizadas em animais vivos com suspeita de infecção por *Theileria annulata*, não é comum na actividade clínica diária. São utilizados preferencialmente esfregaços de sangue ou de linfonodos, pela maior facilidade de execução, com as limitações já abordadas na Introdução deste capítulo.

A identificação das formas parasitárias, com recurso à imunohistoquímica e utilização de anticorpos específicos anti-*Theileria* é possível, tanto em esfregaços como em cortes histológicos de fragmentos fixados em formol (Campbell *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 1999; Forsyth *et al.*, 1999; Shayan *et al.*, 1999). A aplicação da técnica de imunohistoquímica no diagnóstico diário também não é de todo relevante, devido à morosidade da mesma e aos custos associados. No entanto, pode ser importante para confirmação *post-mortem* do diagnóstico e para caracterização fenotípica de diferentes estirpes de *Theileria annulata*, pois foi demonstrado que a *Theileria annulata* apresenta variedade antigénica entre estirpes oriundas de diferentes regiões, inclusivamente no mesmo país e, por vezes, na mesma exploração

(Shiels *et al.*, 1986a; Shiels *et al.*, 1986b; Irvin, 1987; Ben Miled *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1995; Sutherland *et al.*, 1996; Forsyth *et al.*, 1999; Shayan *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2004; Manuja *et al.*, 2006).

A utilização com sucesso dos dois anticorpos monoclonais está descrita por vários autores (Shiels *et al.*, 1986a; Shiels *et al.*, 1986b; Campbell *et al.*, 1995; Forsyth *et al.*, 1999; Shayan *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2004; Manuja *et al.*, 2006), mas geralmente aplicados em culturas de células infectadas com esquizontes de *Theileria annulata*.

Os resultados por nós descritos estão de acordo com os obtidos por vários autores. Assim, Campbell *et al.* (1995) identificaram, com o anticorpo monoclonal 1C7, esquizontes nos linfonodos a partir do 5º dia pós-infecção e de uma forma crescente até ao 10º dia pós-infecção. Forsyth *et al.* (1999) identificaram, com o mesmo anticorpo, esquizontes em linfonodos e diversos órgãos, a partir do 7º dia pós-infecção.

Manuja *et al.* (2006) utilizaram vários anticorpos monoclonais, incluindo o 1C7, para identificar a variedade fenotípica de quatro estirpes de *Theileria annulata*, oriundas de diferentes estados indianos. No estudo desenvolvido por estes autores, estas quatro estirpes apresentaram imunorreactividade diferente para os anticorpos utilizados. Para o anticorpo 1C7 a marcação foi bastante diferente entre duas das estirpes analisadas, mostrando a diferença de expressão antigénica entre ambas. Os resultados obtidos no trabalho que desenvolvemos não foram semelhantes. Os animais utilizados no presente estudo são todos oriundos de regiões muito próximas, onde não é previsível que se encontre mais do que uma estirpe de *Theileria annulata*.

Shiels *et al.* (1986b) também evidenciaram a diversidade antigénica de doze estirpes de *Theileria annulata* através do estudo da imunorreactividade para anticorpos dirigidos contra este protozoário. O anticorpo 1C7 foi aquele que apresentou maior diversidade de reacção entre as estirpes estudadas. Pelo contrário, o anticorpo 1C12 reconheceu epítomos em todas elas. Comparativamente com os resultados por nós obtidos, os primeiros não estão de acordo com a marcação observada nos nossos casos, nos quais não era previsível encontrar diversidade fenotípica. Já a marcação com o anticorpo 1C12 está de acordo com o que também observámos. Segundo o mesmo

autor, também é possível identificar alguma variabilidade fenotípica na mesma estirpe.

No trabalho desenvolvido por este autor, não foi estudado qualquer material de animais infectados oriundo de Portugal e foram utilizadas culturas de células infectadas e não fragmentos de órgãos e tecidos obtidos de infecções naturais (fixados em formol e processados segundo metodologia de rotina para obtenção de cortes histológicos), como no estudo que aqui apresentamos, não tornando possível a sobreposição de resultados.

A comparação dos resultados por nós obtidos com a marcação com o anticorpo policlonal R2185, com os resultados obtidos por outros autores, ainda não pode ser concretizada, devido à inexistência de publicações com estes dados.

Os resultados da marcação negativa para 1C7 e 1C12 obtidos para o caso nº 12 não nos surpreenderam, pois trata-se do mesmo caso que apresentou fraca imunorreactividade para os anticorpos MAC 387, CD3 e CD79 α cy (Capítulo II), provavelmente devido às alterações degenerativas e necróticas identificadas nestas células. A marcação positiva apenas com o anticorpo R2185 pode estar associada à natureza policlonal deste anticorpo, que poderá apresentar maior probabilidade de detecção de epítomos, mesmo em células com alterações degenerativas e necróticas. Aliás, este anticorpo não necessitou de recuperação antigénica para melhorar a eficácia da marcação.

A possibilidade do anticorpo R2185 detectar epítomos de outros parasitas próximos do género *Theileria*, nos linfonodos e lesões do animal nº 12, parece-nos pouco provável. Por um lado, a origem deste animal e o quadro clínico e lesional foram semelhantes aos identificados nos restantes animais deste estudo. Por outro, a única doença que apresenta quadro clínico e lesional aproximado é a infecção por *Theileria parva*, que nunca foi identificada em Portugal. As restantes espécies do género *Theileria* são consideradas não patogénicas e não apresentam quadro clínico e lesional semelhante (Capítulo I).

Conclusão

A confirmação da presença da *Theileria annulata* nas células alvo dos casos em estudo veio, por um lado, reforçar o diagnóstico de teileriose tropical no sul de Portugal e, por outro, indicar a ausência de polimorfismo fenotípico de *Theileria annulata* presente nesta região. Serão ainda necessários novos estudos para averiguar o polimorfismo genético desta espécie para mais correcta caracterização do agente presente no sul do nosso País, onde a teileriose tropical tem mais importância (Capítulo I).

Para este estudo, atrevemo-nos a sugerir uma metodologia:

- 1 - identificação das explorações com animais infectados através da realização de esfregaços de sangue e/ou linfonodos a todos os animais suspeitos de teileriose tropical e também, aleatoriamente, a número significativo de animais assintomáticos de cada exploração.
- 2 - estabelecimento de culturas celulares, a partir de sangue ou aspirados de linfonodos de animais infectados.
- 3 - identificação e caracterização fenotípica do(s) isolado(s) presente(s) nas culturas celulares, com recurso a painel de anticorpos monoclonais (em colaboração com o Professor Doutor Brian Shiels).
- 4 - caracterização genotípica do(s) isolado(s) identificado(s), com recurso a ensaios de restrição enzimática de genes específicos da *Theileria annulata* (por exemplo, *Tams1*, o gene que codifica para um antigénio de superfície dos merozoítos, ou o gene codificante para uma proteína da membrana dos esporozoítos e esquizontes, TaSP). Este procedimento tem como objectivo a amplificação de fragmentos de ADN (PCR) dos genes referidos, e comparação das sequências de nucleotídeos obtidas, para cada um dos isolados (Gubbels *et al.*, 2000b; Schnittger *et al.*, 2002; Manuja *et al.*, 2006).

Bibliografía

Ahmed J.S., Schnittger L. & Mehlhorn H. (1999). Review: *Theileria* schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitology Research* 85, 527-538.

Ben Miled L., Dellagi K., Bernardi G., Melrose T.R., Darghouth M., Bouattour A., Kinnaird J., Shiels B., Tait A. & Brown C.G. (1994). Genomic and phenotypic of Tunisian *Theileria annulata* isolates. *Parasitology* 108, 51-60.

Brígido C., Fonseca I.P., Parreira R., Fazendeiro I., Rosário V.E. & Centeno-Lima S. (2004). Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Veterinary Parasitology* 123, 17-23.

Burridge M.J., Brown C.G.D. & Kimber C.D. (1974). *Theileria annulata*: Cross reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. *Experimental Parasitology* 35, 374-380.

Campbell J.D., Howie S.E., Odling K.A. & Glass E.J. (1995). *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *Clinical and Experimental Immunology* 99, 203-210.

Chae J.-S., Levy M., Jr Hunt J., Schlater J., Snider G., Waghela S.D., Holman P.J. & Wagner G.G. (1999). *Theileria* sp. Infections Associated with Bovine Fatalities in the United States Confirmed by Small-Subunit rRNA Gene Analyses of Blood and Tick Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3037-3040.

Criado-Fornelio A., Martnez-Marcos A., Buling-Saraña A. & Barba-Carretero J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* 113, 189-201.

d'Oliveira C., Weide M., Habela M.A., Jacquet P. & Jongejan F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2665-2669.

Forsyth L.M.G., Minns F.C., Kirvar E., Adamson R.E., Hall F.R., McOrist S., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1999). Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 120, 39-57.

Glass E.J., Craigmile S.C., Springbett A., Preston P.M., Kirvar E., Wilkie G.M., Eckersall P.D., Hall F.R. & Brown C.G.D. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *International Journal of Parasitology* 33, 1409-1418.

Gubbels M.-J., d'Oliveira C. & Jongejan F. (2000a). Development of an Indirect *Tams1* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Theileria annulata* Infection in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 404-411.

Gubbels M.-J., Katzer F., Hide G., Jongejan F. & Shiels B.R. (2000b). Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of *Theileria annulata*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110, 23-32.

Habela M., Rol J.A., Antón J.M., Peña J., Corchero E., van Ham I. & Jongejan F. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia* 41 (Suppl.1), 47-51.

Hooshmand-Rad P. & Hashemi-Fesharki R. (1971). Complement-fixing antibodies in cattle experimentally infected with *Theileria annulata* or vaccinated with tissue cultures. *British Veterinary Journal* 127, 244-249.

Irvin A.D. (1987). Characterization of species and strains of *Theileria*. *Advances in Parasitology* 26, 145-197.

Kirvar E., Ilhan T., Katzer F., Hooshmand-Rad P., Zwegarth E., Gerstenberg C., Phipps P. & Brown C.G. (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the *Tams1* gene sequences. *Parasitology* 120, 245-254.

Leitão J.L.S. (1945). Teileriose bovina em Portugal. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária II*, 1-8.

Manuja A., Malhotra D.V., Sikka V.K., Sangwan A.K., Sharma R., Kumar B., Mehta B.D., Gulati B.R. & Nichani A.K. (2006). Isolates of *Theileria annulata* collected from different parts of India show phenotypic and genetic diversity. *Veterinary Parasitology* 137, 242-252.

Manuja A., Nichani A.K., Kumar R., Sharma R.D. & Kumar B. (2001). Single dilution ELISAs using soluble piroplasm, cellular schizont and soluble schizont antigens for the detection of antibodies against *Theileria annulata*. *Veterinary Research* 32, 165-173.

- Navarrete I., Serrano F.J. & Reina D. (1999). Parasitosis Hemáticas. *In* Parasitología Veterinaria. Eds M. Cordero del Campillo & F.A. Rôjo Vázquez. McGraw-Hill – Interamericana, Spain, 294-302.
- Renneker S., Kullmann B., Gerber S., Dobschanski J., Bakheit M.A., Geysen D., Shiels B., Tait A., Ahmed J.S. & Seitzer U. (2008). Development of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Transboundary and emerging diseases* 55, 249-256.
- Salih D.E., Ahmed J.S., Bakheit M.A., Ali E.B., El Hussein A.M., Hassan S.M., Shariff O.E., Fadl M. & Jongejan F. (2005). Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitology Research* 97, 302-308.
- Schneider I., Haller D., Seitzer U., Beyer D. & Ahmed J.S. (2004). Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. *Parasitology Research* 94, 405-415.
- Schnittger L., Katzer F., Biermann R., Shayan P., Boguslawski K., Mckellar S., Beyer D., Shiels B.R. & Ahmed J.S. (2002). Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 247-256.
- Shayan P., Gerlach C., Hügel F.-U., Kay G., Campbell J.D.M., Gerdes J. & Ahmed J.S. (1999). The proliferation-associated nuclear protein Ki-67 in the bovine system: partial characterisation and its application for determination of the proliferation of *Theileria*-infected bovine cells. *Parasitology Research* 85, 613-620.
- Shiels B.R., McDougall C., Tait A. & Brown C.G.D. (1986a). Identification of Infection-associated antigens in *Theileria annulata* transformed cells. *Parasite Immunology* 8, 69-77.
- Shiels B.R., McDougall C., Tait A. & Brown C.G.D. (1986b). Antigenic diversity of *Theileria annulata* macroschizonts. *Veterinary Parasitology* 21, 1-10.
- Sutherland I.A., Shiels B.R., Jackson L., Brown D.J., Brown C.G.D. & Preston P.M. (1996). *Theileria annulata*: Altered Gene Expression and Clonal Selection during Continuous *in Vitro* Culture. *Experimental Parasitology* 83, 125-133.

CAPÍTULO III

Tait A. & Hall F.R. (1990). *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 9, 387-403.

Taylor L.H., Katzer F., Shiels B.R. & Welburn S.C. (2003). Genetic and phenotypic analysis of Tunisian *Theileria annulata* clones. *Parasitology* 126, 241-252.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M. & Junnings F.W. (1996). *Veterinary Protozoology. In Veterinary Parasitology*. 2nd edition. Blackwell Science, 209-253.

Capítulo IV: Caracterização ultraestrutural (Microscopia Electrónica de Transmissão) das lesões identificadas em vitelos infectados por *Theileria annulata*

Introdução

A principal importância da microscopia electrónica de transmissão é a capacidade de revelar a ultraestrutura da célula para além da sua morfologia histológica. Esta capacidade é atingida pelo poderoso aumento de resolução do microscópio electrónico face ao microscópio óptico (Woods & Stirling, 2002).

A utilização da microscopia electrónica para o diagnóstico de infecções de etiologia microbiana e parasitária (principalmente protozoários) caiu em desuso devido ao avanço das técnicas de biologia molecular, que se revelaram mais rápidas e mais económicas.

No entanto, ainda hoje, o estudo mais aprofundado da morfologia de alguns agentes etiológicos deverá passar pela caracterização ultraestrutural dos mesmos. Esta caracterização permite também localizar de forma precisa, a nível celular ou intersticial, estes agentes e avaliar a sua interacção com organitos celulares ou componentes tecidulares, com relevância na patogenia da doença em causa (Jarrett *et al.*, 1967; Jura & Brown, 1983; Jura *et al.*, 1983; Ahmed *et al.*, 1999; Shaw, 2003).

O primeiro estudo ultraestrutural sobre a infecção *in vitro* por *Theileria annulata* foi realizado por Jura em 1981 (citado por Jura *et al.*, 1983), que descreveu a forma de entrada deste protozoário na célula hospedeira e identificou os trofozoítos como as formas intermediárias entre os esporozoítos e os esquizontes.

Vários estudos demonstraram que após a entrada do esporozoíto na célula hospedeira, à custa da invaginação da membrana celular desta célula, o vacúolo em que o esporozoíto fica envolvido desaparece aproximadamente em 24 horas, permitindo a presença livre do trofozoíto e posteriormente do esquizonte no citoplasma da célula alvo. O contacto directo com o citoplasma destas células pode proporcionar a ligação a diversos organelos e/ou

activação de vias de metabolismo celular que influenciam a expressão genotípica e fenotípica das células infectadas (Jura & Brown, 1983; Morrissette & Sibley, 2002; Shaw, 2003).

O objectivo do estudo que descrevemos neste Capítulo é a caracterização ultraestrutural das células envolvidas nas lesões verificadas nos animais infectados e, quando possível, a identificação de formas parasitárias compatíveis com *Theileria annulata* no citoplasma das células hospedeiras.

Materiais e Métodos

De um dos casos em estudo, vitelo nº 8, procedeu-se à colheita durante a necrópsia de amostras de músculo, pele e linfonodo para microscopia electrónica de transmissão.

A selecção deste vitelo para realização deste estudo baseou-se no facto de a necrópsia ter sido realizada imediatamente após a eutanásia.

O processamento das amostras foi baseado na descrição de Woods & Stirling (2002) e descreve-se no Anexo VI.

A observação das amostras foi efectuada no Microscópio Electrónico de Transmissão JEOL, JEM-100SX, cuja aceleração do feixe de electrões é de 80 quilovolts (KVolts). O registo fotográfico foi efectuada em película Kodak® "electron microscope" em filme 4489 (6,5cm x 9cm). Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral, sob orientação do Professor Doutor António Pedro Matos.

Resultados

Nos cortes analisados foi possível identificar vários tipos celulares. No entanto, as células predominantes em todos eles foram os macrófagos e os linfócitos.

Os macrófagos apresentaram como característica principal a presença de inúmeros vacúolos no citoplasma.

Os linfócitos apresentaram na sua maioria, características que permitiram classificá-las como células blásticas: núcleos de morfologia heterogénea, com aglomerações de heterocromatina à periferia e restante nucleoplasma preenchido com eucromatina, elevada relação N/C, mitocôndrias

com cristas e, por vezes, cisternas isoladas de retículo endoplasmático rugoso. Algumas células linfóides mostraram também alterações degenerativas e necróticas do citoplasma, principalmente as observadas em cortes de linfonodo.

Alguns macrófagos, com mais frequência os presentes nos cortes de músculo esquelético e pele, exibiam no citoplasma estruturas compatíveis com formas parasitárias, frequentemente muito próximas do núcleo da célula hospedeira. Estas formas parasitárias apresentaram características que permitiram identificá-las como trofozoítos e esquizontes de *Theileria annulata*. As características observadas em cada uma destas estruturas parasitárias são enumeradas em seguida.

Trofozoítos (Figura 22A e 22B):

- presença livre no citoplasma, não incluídos num vacúolo e próximo do núcleo da célula hospedeira
- um único núcleo excêntrico de cromatina não condensada
- mitocôndrias sem cristas desenvolvidas
- ausência de roptrias

Esquizontes (Figura 23A e 23B):

- presença livre no citoplasma, não incluídos num vacúolo e próximo do núcleo da célula hospedeira
- mais do que um núcleo
- mitocôndrias sem cristas desenvolvidas

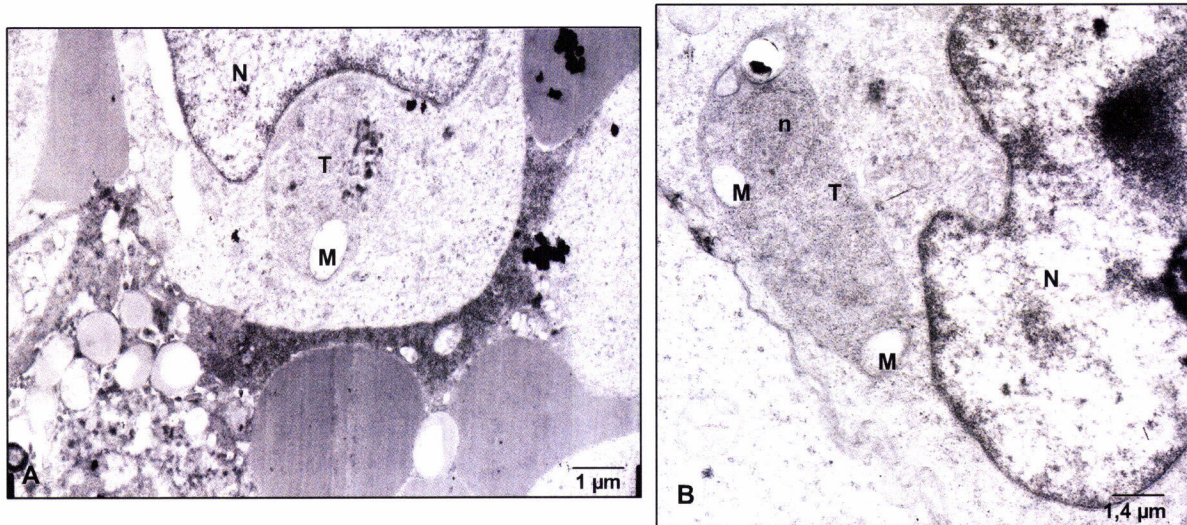


Figura 22: A - Forma compatível com trofozoíto (T) de *Theileria annulata* no citoplasma de um macrófago, não incluída num vacúolo e próxima do núcleo desta célula (N), que apresenta chanfradura. No trofozoíto (T) pode observar-se uma mitocôndria sem cristas (M); B - Forma compatível com trofozoíto (T) de *T. annulata*, livre, no citoplasma de um macrófago, cujo núcleo (N) apresenta uma chanfradura. No trofozoíto pode ver-se mitocôndrias sem cristas (M) e núcleo excêntrico (n).

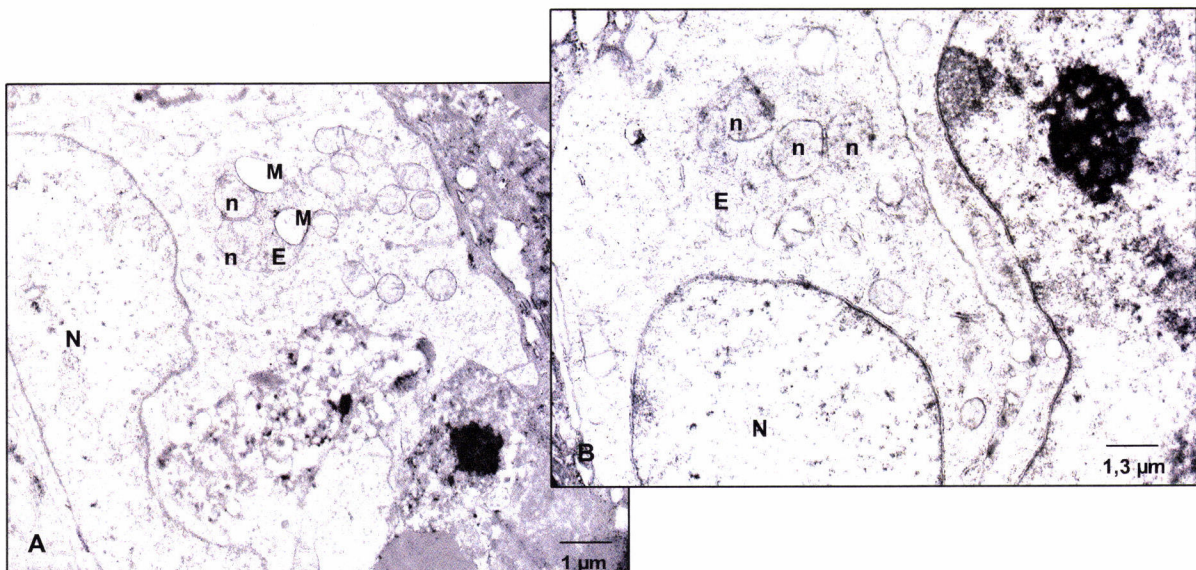


Figura 23: A e B - Formas compatíveis com esquizontes (E) de *Theileria annulata* próxima do núcleo (N) de macrófago. Os esquizontes são estruturas multinucleadas (n) e apresentam mitocôndrias sem cristas (M).

Discussão

Este estudo permitiu identificar trofozoítos e esquizontes de *Theileria annulata* no citoplasma de macrófagos presentes nos linfonodos, tecido muscular esquelético e pele, num vitelo que morreu vítima de teileriose tropical.

Em Portugal nunca foram desenvolvidos trabalhos de caracterização ultraestrutural deste protozoário. Também a bibliografia internacional é bastante escassa, com trabalhos desenvolvidos apenas em infecções provocadas *in vitro* em culturas celulares (Musisi *et al.*, 1981; Jura & Brown, 1983; Jura *et al.*, 1983). Já os trabalhos desenvolvidos a partir de infecções com *Theileria parva* são mais numerosos (Jarrett & Brocklesby, 1966; Jarrett *et al.*, 1967; DeMartini & Moulton, 1973; Kimeto, 1978; Jura & Brown, 1983).

Jura & Brown (1983) e Jura *et al.* (1983) realizaram estudos *in vitro* a partir de infecções de linfócitos por *Theileria annulata* e *Theileria parva*, demonstrando o tipo de interacção inicial entre esporozoíto e a célula hospedeira e posterior desenvolvimento para trofozoíto e esquizonte no citoplasma desta célula. As características que descrevemos, nas formas parasitárias que identificámos e que permitiram classificá-las como trofozoítos e esquizontes, estão de acordo com as relatadas por estes autores.

A presença livre no citoplasma, não incluída num vacúolo, destas formas parasitárias reforça a possibilidade de interacção que as mesmas poderão ter com diversas vias de metabolismo da célula hospedeira (Jura & Brown, 1983; Ahmed *et al.*, 1999; Dobbelaere & Heussler, 1999; Morrissette & Sibley, 2002; Biermann *et al.*, 2003). A ausência de vacúolo permite ainda escapar à lise lisossomal, pois a libertação de enzimas por estes organitos celulares não ocorre aleatoriamente no citoplasma (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995; Shaw, 2003; Dobbelaere & Küenzi, 2004).

As características identificadas para os macrófagos e células linfóides observadas estão de acordo com a morfologia ultraestrutural já descrita para as mesmas (Jura & Brown, 1983; Junqueira & Carneiro, 2004; Young *et al.*, 2007).

Conclusão

Os nossos resultados permitiram confirmar a presença de células linfóides de características blásticas e macrófagos nas lesões desenvolvidas em casos de teileriose tropical. Alguns dos macrófagos identificados apresentavam no seu citoplasma formas compatíveis com um protozoário, cujas características permitem suspeitar de *Theileria* spp..

Bibliografia

- Ahmed J.S., Schnittger L. & Mehlhorn H. (1999). Review: *Theileria* schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitology Research* 85, 527-538.
- Biermann R., Schnittger L., Beyer D. & Ahmed J.S. (2003). Initiation of Translation and Cellular Localization of *Theileria annulata* Casein Kinase II α : Implication for its Role in Host Cell Transformation. *Journal of Cellular Physiology* 196, 444-453.
- DeMartini J.C. & Moulton J.E. (1972). Responses of the bovine lymphatic system to infection by *Theileria parva*. I. Histology and ultrastructure of lymph nodes in experimentally-infected calves. *Journal of Comparative Pathology* 83, 281-298.
- Dobbelaere D. & Heussler V. (1999). Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annual Review of Microbiology* 53, 1-42.
- Dobbelaere D.A.E. & Küenzi P. (2004). The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology* 16, 524-530.
- Garcia-del Portillo F. & Finlay B.B. (1995). The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends in Microbiology* 3, 373-380.
- Jarrett W.F.H. & Brocklesby D.W. (1966). A preliminary electron microscopic study of East Coast Fever (*Theileria parva* infection). *The Journal of Protozoology* 13, 301-310.
- Jarrett W.F.H., Crighton G.W. & Pirie H.M. (1967). Quantitative and Ultrastructural Studies on the Replication of *Theileria parva*. *Veterinary Medical Review: "The Reaction of the Host to Parasitism"*, 280-287.

Junqueira L.C. & Carneiro J. (2004). Tecido conjuntivo. *In* Histologia Básica. 10ª edição. Guanabara-Koogan S.A., Rio de Janeiro, 92-124.

Jura W.G.Z.O. & Brown C.G.D. (1983). Ultrastructural characteristics of in vitro parasite-lymphocyte behavior in invasions with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Veterinary Parasitology* 12, 115-134.

Jura W.G.Z.O., Brown C.G.D. & Kelly B. (1983). Fine structure and invasive behavior of the early developmental stages of *Theileria annulata* in vitro. *Veterinary Parasitology* 12, 31-44.

Kimeto B.A. (1978). Histopathologic and electron microscopic studies of cutaneous lesions in calves with experimentally induced East Coast Fever (*Theileriosis*). *American Journal of Veterinary Research* 39, 1117-1122.

Morrisette N.S. & Sibley L.D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 21-38.

Musisi F.L., Bird R.G., Brown C.G. & Smith M. (1981). The fine structural relationship between *Theileria* schizonts and infected bovine lymphoblasts from cultures. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 65, 31-41.

Shaw M.K. (2003). Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology* 19, 2-6.

Woods A.E. & Stirling J.W. (2002). Electron Microscopy: The preparative techniques. *In* Theory and Practice of Histological Techniques. 5th edition. Eds John D. Bancroft & Marilyn Gamble. Churchill Livingstone, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 679-700.

Young B., Lowe J.S., Stevens A. & Heath J.W. (2007). Sangue. *In* Wheater Histologia Funcional. 5ª edição. Churchill Livingstone Elsevier, Rio de Janeiro, 46-64.

Capítulo V: Avaliação da clonalidade da população celular das lesões identificadas em vitelos infectados por *Theileria annulata* por análise do ADN mitocondrial

Introdução

O “Displacement loop” (D-loop), é uma estrutura de ácido desoxirribonucleico (ADN) onde duas cadeias em dupla hélice são separadas numa determinada zona por uma terceira cadeia de ADN. Esta terceira cadeia é complementar de uma das outras duas afastando a excedente, cuja morfologia, formando uma alça, lembra a letra “D” (Figura 24). Esta estrutura ocorre em situações de reparação do ADN genómico, protegendo-o de alterações que podem conduzir a mutações nos telómeros e no ADN mitocondrial (ADNmt), nomeadamente numa região não codificante, denominada região de controlo do ADNmt (Kasamatsu *et al.*, 1971; King & Low, 1987a). Esta região é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o ADNmt, sendo também uma região hipervariável, onde frequentemente se verifica polimorfismos e ocorrem mutações somáticas (Kasamatsu *et al.*, 1971; Anderson *et al.*, 1981; Hauswirth *et al.*, 1984; King & Low, 1987a; King & Low, 1987b; Butler & Levin, 1998; Fliss *et al.*, 2000; Máximo *et al.*, 2002; Beja-Pereira *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008).

O ADNmt bovino encontra-se totalmente sequenciado, contando com 16,338 nucleótidos e formando uma molécula circular fechada, em dupla hélice (Anderson *et al.*, 1982; National Center for Biotechnology Information, 2009). A região D-loop (posições 1-363 e 15,792-16,338) tem sido utilizada para estudos filogenéticos e filogeográficos, devido à elevada frequência de polimorfismos que apresenta (Bruford *et al.*, 2003; Beja-Pereira *et al.*, 2006).

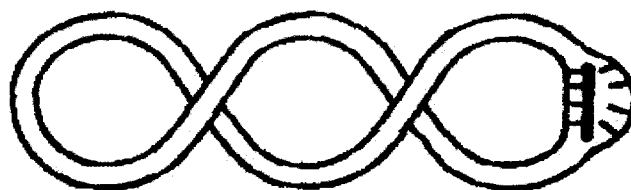


Figura 24: Representação esquemática de ADNmt com uma estrutura D-loop (Adaptado de Kasamatsu *et al.*, 1971).

Devido ao elevado número de mitocôndrias por célula e a existência de várias moléculas de ADNmt por mitocôndria, a ocorrência de heteroplasmia (presença no mesmo indivíduo de mais de um genótipo de ADNmt) é um importante factor a considerar ao analisar o ADNmt. Este fenómeno pode ocorrer por mutação de uma ou várias moléculas de ADNmt, de uma ou mais mitocôndrias, originando uma mistura de moléculas mutantes e normais. A expansão clonal de células neoplásicas facilita o desenvolvimento de homoplasmia e pode ser utilizado como método de avaliação da clonalidade das células tumorais, através da pesquisa destas mutações, permitindo a distinção, por exemplo, entre tumores primitivos, metástases e lesões múltiplas, dispersas e independentes (Duddy *et al.*, 1998; Fliss *et al.*, 2000; Nomoto *et al.*, 2002).

A extracção de ADN de tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina torna-se, de uma maneira geral, problemática para amplificação de fragmentos de ADNmt de boa qualidade, aptos para serem sequenciados correctamente (Goelz *et al.*, 1985; Tokuda *et al.*, 1990; Miething *et al.*, 2006). A análise de ADNmt, a partir de tecidos mal preservados e/ou fixados por tempo excessivo ou em más condições, apresenta vantagens relativamente ao ADN genómico, devido ao elevado nº de mitocôndrias e de moléculas de ADNmt em cada célula, o que potencia a possibilidade de obtenção de fragmentos de ADN de boa qualidade (Alonso *et al.*, 2006; Miething *et al.*, 2006).

Neste estudo pretendeu-se extrair ADNmt das lesões e de tecido normal dos fragmentos colhidos durante as necrópsias dos vitelos (Tabela 1), para avaliação dos polimorfismos e heteroplasmia das regiões repetitivas de dois fragmentos do D-loop mitocondrial, com o objectivo de inferir acerca da clonalidade da população celular identificada.

Materiais e Métodos

Extracção de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial

Para a extracção de ADN mitocondrial (ADNmt) de cada um dos casos em estudo, realizaram-se 4 cortes de parafina de 10 µm de espessura, das lesões e de tecidos normais do mesmo animal. Estes cortes foram submetidos a microdissecção manual com lâmina de bisturi e auxílio de lupa. O material obtido foi recolhido para tubos de 1,5 ml e sujeito a desparafinação e extracção de ADN através de um “kit” comercial específico para fragmentos de tecidos embebidos em parafina (Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kit, Invitek). O processamento das amostras realizou-se segundo as instruções do fabricante, com algumas modificações:

A digestão ocorreu por incubação em tampão de lise (200 µl) e proteinase K (20 µl) a 56°C com agitação suave constante, durante toda a noite. Regra geral esta digestão foi suficiente, demonstrada pela ausência de turvação e fragmentos de tecido não digerido na solução obtida. No entanto, nos casos em que tal não se verificou, continuou-se a digestão com adição de 20 µl de proteinase K e incubação por mais 8 horas a 56°C. A eluição do ADN ocorreu por incubação com o tampão de eluição durante 5 minutos, recolhendo-se 33 µl de volume total de ADN eluído de cada amostra. Todas as homogeneizações foram feitas de forma suave, por pipetagem, para evitar a destruição do ADN. O ADN extraído foi armazenado a 4°C durante 24 horas para posterior utilização.

A medição da quantidade de ADNmt extraído foi realizada no espectrofotómetro (Nanodrop) e processada por programa informático. Esta avaliação permite não só indicar a quantidade de ADN extraído (ng/µl), mas também avaliar a contaminação do produto extraído por outras moléculas, como ácido ribonucleico (ARN) e proteínas.

Amplificação e purificação dos fragmentos de D-Loop mitocondrial

Para amplificação dos fragmentos de D-loop mitocondrial recorreu-se à técnica da Reacção em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). Utilizaram-se dois “primers” (sequências que permitem a iniciação da

CAPÍTULO V

replicação do fragmento ADN pretendido. Invitrogen™), que permitiram a amplificação de dois fragmentos de D-loop com menos de 200 pares de bases (pb):

Fragmento 1 (178 pb):

DLOOPB1F (“forward”): 5`- TCT TGA GCA CCA GCA TAA TGA TA - 3`

DLOOPB1R (“reverse”): 5`- GCT AAA TTG AGT ATT GAA AGC GT - 3`

Fragmento 2 (173 pb):

DLOOPB2F (“forward”): 5`- CAC TTT TAA CAG ACT TTT CCC TA - 3`

DLOOPB2R (“reverse”): 5`- TTA TGG AGT TGG GAG ACT CAT CT - 3`

1 actaatggctaatacagcccatgctcacacataactgtgctgtcatacatttggtatTTTT

61 ttattttgggggatgcttgactcagctatggccgtcaaaggccctgacccggagcatct

121 attgtagctggacttaactgcacttgagcaccagcataatgataagcatggacattaca

181 gtcaatggtcacaggacataaattatattatataatcccccttcataaaaattccccct

241 taaatactaccaccactttaacagactttccctagatacttatttaaattttcacg

301 cttcaataactcaatttagcactccaaacaaagtcaatatataaacgcaggcccccccc

361 cccgttgatgtagcttaaccaaagcaaggcactgaaaatgcctagatgagctccaac

421 tccataaacacataggtttggtcccagccttctgttaactcttaataaaacttacacatg

Figura 25: Localização dos “primers”, dos fragmentos do D-loop de *Bos taurus* amplificados (sombreados) e das sequências repetitivas de bases Citosina (sublinhadas).

A construção dos “primers” baseou-se na selecção de zonas do D-loop que apresentavam repetições sucessivas de bases (sublinhadas na figura 25), com o objectivo de aumentar a possibilidade de detecção de polimorfismos. Esta selecção permitiu amplificar dois fragmentos (fragmento 1 e 2), sombreados na imagem, cada um deles com início e fim nos respectivos primers, “forward” e “reverse”.

Não se verificaram homologias entre estes primers e o ADN de *Theileria annulata*.

Para um volume total de 25 µl da solução final de PCR, as condições e protocolo da reacção encontram-se descritos no Anexo VII.

Para avaliação da eficiência da reacção, os produtos de PCR obtidos (5 µl) foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% com Gel Star (Cambrex) e observados num transiluminador. Os casos em que a amplificação do ADN da zona de interesse foi bem sucedida foram seleccionados para purificação e sequenciação dos fragmentos do D-loop (Figura 26).

A purificação dos produtos de PCR, com vista a eliminar o excesso de primers e nucleótidos, foi realizada pelo método enzimático, usando-se 10 µl de produto de PCR e 1 µl de cada enzima, exonuclease (Fermentas) e fosfatase alcalina (Fermentas). A reacção ocorreu num termociclador durante dois períodos de 20 minutos a 37°C e 80°C.

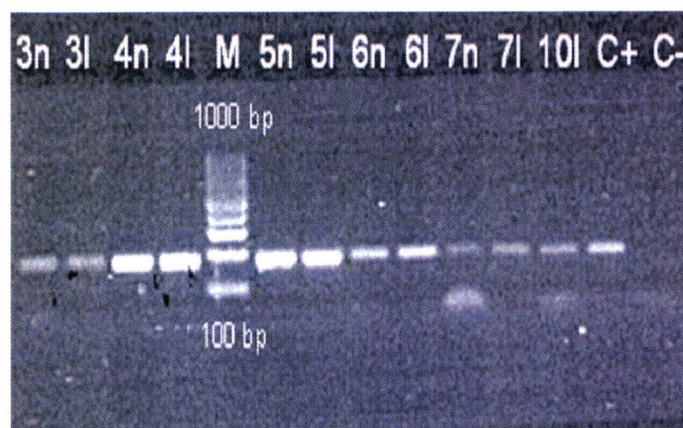


Figura 26: Electroforese em gel de agarose a 2% (fragmento 1): C+ = controlo positivo (sangue de bovino); C- = controlo negativo; n = tecido normal; l = lesão; M = marcador de pesos moleculares; 3, 4, 5, 6, 7 e 10 = produtos de PCR (178pb).

Sequenciação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados, em ambas as direcções, com recurso ao “kit” de sequenciação BigDye[®] Terminator v3.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), de acordo com as condições (volume final da reacção 10 µl) e protocolo descrito no Anexo VII.

A purificação (precipitação) dos produtos de sequenciação obtidos (10 µl) foi feita em colunas Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) e eluídos em 15 µl de formamida desionizada.

A sequenciação do ADNmt obtido foi executada no sequenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) por electroforese capilar. As sequências obtidas foram analisadas no programa informático Sequencing Analysis 5.2.0 (Applied Biosystems, USA. Figuras 27 e 28).

Compararam-se as sequências obtidas com a sequência de referência (“GenBank”, acesso nº NC_006853, 2009), centrando-se esta leitura na análise das 3 regiões repetitivas de bases citosina (C) verificadas nos dois fragmentos amplificados: sequência de 6C, posição 216-221 e sequência de 5C, posição 235-239, do fragmento 1; sequência de 12C, posição 352-363, do fragmento 2. Considerou-se a existência de polimorfismo quando ambas as sequências, do tecido normal e da lesão, no mesmo animal, apresentassem a mesma variação.

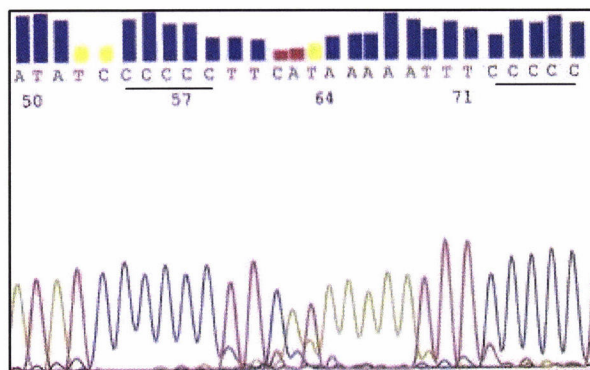


Figura 27: Sequenciação do ADNmt do fragmento 1 de tecido normal do caso nº 5 (as sequências repetitivas de bases C deste fragmento estão sublinhadas).

correspondentes no mesmo animal. No entanto, estas alterações não foram consideradas significativas por aparecerem também, aleatoriamente, em sequências de tecidos normais.

Tabela 6: Variações do ADNmt da região D-loop, fragmento 1, de tecido normal e tecido lesado

ANIMAL	TECIDO	REGIÃO	POSIÇÃO	VARIAÇÃO
3	Normal	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
	Lesão	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
4	Normal	D-loop	216-221	6C/7C
	Lesão	D-loop	216-221	6C/7C
5	Normal	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
	Lesão	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
6	Normal	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
	Lesão	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
7	Normal	D-loop	216-221	7C
	Lesão	D-loop	216-221	7C
9	Normal	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
	Lesão	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
10	Lesão	D-loop	216-221 235-239	6C/7C 5C/6C
11	Normal	D-loop	235-239	5C/6C
	Lesão	D-loop	235-239	5C/6C

Tabela 7: Variações do ADNmt da região D-loop, fragmento 2, de tecido normal e tecido lesado

ANIMAL	TECIDO	REGIÃO	POSIÇÃO	VARIAÇÃO
3	Normal	D-loop	352-363	11C/12C
	Lesão	D-loop	352-363	11C/12C
4	Normal	D-loop	352-363	11C/12C/13C
5	Normal	D-loop	352-363	10C/11C/12C
	Lesão	D-loop	352-363	10C/11C/12C
6	Normal	D-loop	352-363	10C/11C
	Lesão	D-loop	352-363	10C/11C
7	Normal	D-loop	352-363	11C/12C
	Lesão	D-loop	352-363	11C/12C/13C
8	Normal	D-loop	352-363	11C/12C/13C
	Lesão	D-loop	352-363	11C/12C/13C
9	Normal	D-loop	352-363	10C/11C
	Lesão	D-loop	352-363	11C/12C/13C
14	Lesão	D-loop	352-363	11C/12C/13C

Discussão

A extracção de fragmentos de ADN para a utilização em técnicas de biologia molecular, como o PCR, realizada a partir de tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina pode constituir um problema, devido às elevadas taxas de degradação do mesmo (Goelz *et al.*, 1985; Tokuda *et al.*, 1990; Miething *et al.*, 2006). A amplificação eficiente de fragmentos de ADN,

previsivelmente degradados, passa pela selecção de fragmentos relativamente pequenos, preferencialmente que não excedam os 200 pb e de algumas alterações às técnicas de extracção de ADN utilizadas por rotina nos laboratórios (Tokuda *et al.*, 1990; Duddy *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2008).

Um dos desafios do presente trabalho iniciou-se pela extracção de ADNmt a partir de fragmentos de tecidos fixados em formaldeído neutro tamponado a 10% e incluídos em parafina, desconhecendo-se, em alguns casos, o estado de preservação destes tecidos na altura da colheita e o tempo e condições de fixação a que foram submetidos.

As condições a que algumas das amostras foram provavelmente sujeitas, contribuíram para a degradação das moléculas de ADN e para os resultados obtidos neste trabalho, o que está de acordo com as dificuldades encontradas por outros autores (Goelz *et al.*, 1985; Tokuda *et al.*, 1990; Bertagnolli *et al.*, 2009).

Apenas as sequências obtidas para o fragmento 2 dos animais nº 7 e nº 9 apresentaram diferença entre o tecido normal e a lesão. Todos os restantes casos apresentaram o mesmo genótipo tanto nos tecidos normais como nas lesões. Os polimorfismos observados, maioritariamente o enriquecimento de uma base C às sequências repetitivas de C do fragmento 1, não apresentaram perda de heteroplasmia e selecção clonal para uma determinada população celular de genótipo diferente. O fragmento 2 apresentou sequências mais instáveis, com mais variações no número de bases C, no entanto, não se verificou perda de heteroplasmia e também não se verificou selecção clonal para determinado genótipo.

A heterogeneidade das sequências da extremidade 5' da região D-loop do ADNmt de bovinos foi descrita por Hauswith *et al.* (1984), constatando o enriquecimento de bases C nesta região. Os dados apresentados por estes e outros autores (King & Low, 1987b) sugerem uma heterogeneidade da sequência da região D-loop, quer intranimal, quer intracelular, o que está de acordo com os resultados por nós constatados.

A identificação de mutações somáticas não foi considerada. Apesar de importantes para estudos de clonalidade, muitas mutações ocorridas no D-loop mitocondrial são silenciosas e estando presentes numa região não codificante

podem apresentar significado desconhecido (Rand & Kann, 1998; Fliss *et al.*, 2000; Nomoto *et al.*, 2002).

Conclusão

Face à apresentação dos resultados aqui expostos, podemos concluir pela origem policlonal da população celular identificada nas lesões descritas nos animais do nosso estudo, o que também está de acordo com os resultados obtidos e apresentados nos capítulos anteriores. No entanto, mais estudos de clonalidade celular serão necessários para uma conclusão mais precisa sobre a origem destas células, possivelmente, estudando regiões menos polimórficas teremos resultados mais conclusivos acerca da clonalidade destas lesões.

Bibliografia

Alonso A., Albarran C., Martín P., García P., Capilla J., García O., de la Rúa C., Izaguirre N., Pereira F., Pereira L., Amorim A. & Sancho M. (2006). Usefulness of microchip electrophoresis for the analysis of mitochondrial DNA in forensic and ancient DNA studies. *Electrophoresis* 27, 5101-5109.

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R. & Young I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.

Anderson S., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Eperon, I.C., Sanger F. & Young I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156, 683-717.

Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetit J., Barbujani G., Luikart G. & Bertorelle G. (2006). The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8113-8118.

Bertagnolli A.C., Máximo V., van Asch B., Amorim A., Cirnes L., Soares P. & Cassali G.D. (2008). Optimization of methods to assess mitochondrial DNA in archival paraffin-embedded tissues from mammary canine tumors. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 44, 305-308.

Bertagnolli A.C., Soares P., van Asch B., Amorim A., Cirnes L., Máximo V. & Cassali G.D. (2009). An assessment of the clonality of the components of canine mixed mammary tumours by mitochondrial DNA analysis. *Veterinary Journal* 182, 269-274.

Bruford M.W., Bradley D.G. & Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews. Genetics* 4, 900-910.

Butler J.M. & Levin B.C. (1998). Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology* 16, 158-162.

Duddy S.K., Gorospe S. & Bleavins M.R. (1998). Genetic analysis of multiple loci in microsamples of fixed paraffin-embedded tissue. *Toxicological Sciences* 46, 317-323.

Fliiss M.S., Usadel H., Caballero O.L., Wu L., Buta M.R., Eleff S.M., Jen J. & Sidransky D. (2000). Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287, 2017-2019.

Goelz S.E., Hamilton S.R. & Vogelstein B. (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130, 118-126.

Hauswirth W.W., Van de Walle M.J., Laipis P.J. & Olivo P.D. (1984). Heterogeneous mitochondrial DNA D-loop sequences in bovine tissues. *Cell* 37, 1001-1007.

Kasamatsu H., Robberson D.L. & Vinograd J. (1971). A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 2252-2257.

King T.C. & Low R.L. (1987a). Mapping of control elements in the Displacement Loop region of bovine mitochondrial DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 6204-6213.

King T.C. & Low R.L. (1987b). Mitochondrial DNA Displacement Loop structure depends on growth state in bovine cells. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 6214-6220.

Máximo V., Soares P., Lima J., Cameselle-Teijeiro J. & Sobrinho-Simões M. (2002). Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *The American Journal of Pathology* 160, 1857-1865.

Miething F., Hering S., Hanschke B. & Dressler J. (2006). Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54, 371-374.

National Center for Biotechnology Information (2009). U.S. National Library of Medicine. *In* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_006853 (acesso em Setembro 2009).

Nomoto S., Yamashita K., Koshikawa K., Nakao A. & Sidransky D. (2002). Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clinical Cancer Research* 8, 481-487.

Rand D.M. & Kann L.M. (1998). Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetica* 102-103, 393-407.

Santos C., Montiel R., Arruda A., Alvarez L., Aluja M.P. & Lima M. (2008). Mutation patterns of mtDNA: empirical inferences for the coding region. *BMC Evolutionary Biology* 8, 167.

Tokuda Y., Nakamura T., Satonaka K., Maeda S., Doi K., Baba S. & Sugiyama T. (1990). Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *Journal of Clinical Pathology* 43, 748-751.

Conclusão geral

No presente trabalho descreveram-se e caracterizaram-se macroscopicamente e microscopicamente as lesões identificadas em 16 vitelos, infectados com *Theileria annulata*, que desenvolveram um quadro lesional agudo, semelhante a linfoma maligno multicêntrico, cuja característica predominante foi o desenvolvimento de nódulos multifocais na pele e tecido muscular esquelético e linfadenomegália generalizada. Nódulos com características semelhantes foram também observados noutros órgãos e tecidos. Microscopicamente estes nódulos são o resultado da infiltração multisistémica por uma população celular inflamatória mista, cujas células foram identificadas por imunohistoquímica, como sendo maioritariamente linfócitos T e macrófagos e apenas escassos linfócitos B.

As características fenotípicas desta população afastou a possibilidade da origem monoclonal das mesmas e, por esse facto, da presença de processo neoplásico. A ausência de monoclonalidade foi também abordada pelo estudo da sequenciação de dois fragmentos de ADN da região hipervariável D-loop mitocondrial das lesões e de tecidos normais dos vitelos vítimas da doença.

A identificação do agente etiológico, *Theileria annulata*, presente em algumas células que constituíam os nódulos referidos anteriormente, foi confirmada pelo uso de anticorpos monoclonais (1C7 e 1C12), o que permitiu a primeira caracterização fenotípica da(s) estirpe(s) existentes em Portugal, que carece, com toda a certeza, de maior número de amostras e estudos em culturas de células obtidas dos animais infectados.

O conhecimento do polimorfismo fenotípico e genético de estirpes de *Theileria annulata*, com conhecimento dos antigénios de superfície das mesma e relação da expressão destes antigénios com o seu poder imunogénico estará na base da confecção de vacinas, muito importantes em áreas endémicas para teileriose tropical.

Com o desenvolvimento destes trabalhos e análise dos resultados obtidos, conseguimos atingir os objectivos inicialmente propostos e contribuir para o conhecimento das infecções agudas por *Theileria annulata* no sul Portugal:

CONCLUSÃO GERAL

- Caracterização macroscópica e microscópica das lesões identificadas em vitelos infectados com *Theileria annulata*.
- Caracterização fenotípica e ultraestrutural das células envolvidas nas lesões de vitelos infectados com *Theileria annulata*.
- Contribuição para o conhecimento sobre a resposta inflamatória e imunitária de vitelos que morrem em consequência da infecção natural por *Theileria annulata*.
- Abordagem da caracterização fenotípica da(s) estirpe(s) de *Theileria annulata* identificada(s) no sul de Portugal.

Anexos



Anexo I – Colorações de rotina utilizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora

Giemsa para esfregaços

1. As lâminas deverão secar à temperatura ambiente
2. Metanol (álcool metílico) - 5 a 10 minutos
3. Solução de Giemsa (Merck, 1.0924) - 20 a 30 minutos
4. Lavar em água corrente - 1 minuto
5. Secar à temperatura ambiente
6. Montar as lâminas (opcional) em meio sintético de montagem Entellan New (Merck, 1.07961)

Solução de Giemsa

Água destilada - 10 ml

Giemsa - 24 gotas

Giemsa para cortes histológicos

1. Desparafinar e hidratar :
 - a) Xilol - 5 minutos
 - b) Álcool absoluto - 2 minutos
 - c) Álcool 95° - 2 minutos
 - d) Álcool 70° - 2 minutos
 - e) Água destilada - 2 minutos
2. Corar com Giemsa (Merck, 1.09204) - 1 hora

3. Diferenciar durante alguns segundos
4. Álcool a 95° - deve ser controlado ao microscópio
5. Álcool absoluto - 5 minutos
6. Xilol - 2 minutos
7. Montar as lâminas em meio sintético de montagem Entellan New (Merck, 1.07961)

Soluções

Giemsa:

- Giemsa - 20 ml
- Água destilada - 80 ml

Diferenciador:

- Água destilada - 100 ml
- Ácido acético glacial (Merck, 1.00063) - 3 a 4 gotas

Hematoxilina-Eosina

1. Xilol - 5 minutos
2. Álcool absoluto - 2 minutos
3. Álcool 95° - 2 minutos
4. Álcool 70° - 2 minutos
5. Água destilada - 2 minutos
6. Hematoxilina de Harris (Merck, 1.09253) - 10 minutos
7. Água corrente - 5 minutos
8. Diferenciador - 1 a 2 segundos
9. Água corrente - 5 minutos

ANEXOS

10. Álcool 70° - 1 minuto
11. Eosina Floxina - 1 minuto
12. Álcool 95° - 2 minutos
13. Álcool 95° - 2 minutos
14. Álcool 100° - 3 minutos
15. Álcool 100° - 3 minutos
16. Xilol - 2 minutos
17. Montar as lâminas em meio sintético de montagem Entellan New (Merck, 1.07961)

Soluções

Diferenciador (álcool-ácido):

Álcool 70° - 99 ml

Ácido clorídrico (Merck, 1.00317) - 1 ml

Eosina – Floxina:

Eosina Y a 5 % - 100 ml

- Eosina Y (Merck, 1.15935) - 5 g
- Água destilada - 100 ml

Floxina a 1 % - 10 ml:

- Floxina (Merck, 1.15926) -1 g
- Água destilada - 100 ml

Álcool 95° - 780 ml

Ácido acético glacial (Merck, 1.00063) - 4 ml

Anexo II – Culturas celulares e identificação dos parasitas

1 – As células mononucleadas (PBMC) obtidas por centrifugação do sangue periférico (Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences) foram posteriormente lavadas 3 vezes com a solução salina de Hanks.

2 – O “pellet” obtido foi ressuspenso em meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina).

3 – As suspensões de PBMC foram semeadas (5×10^6 células/mL) em frascos de cultura para tecidos e incubadas a 37 °C, em 5% CO₂ e > 80% de humidade.

4 – Após 48 horas, as células em suspensão foram cuidadosamente removidas e adicionado meio de cultura (repetiu-se este procedimento até obtenção de um tapete uniforme de células cobrindo a base do frasco de cultura).

5 – As passagens das culturas realizaram-se 2 a 3 vezes por semana. O ácido desoxirribonucleico (ADN) das células infectadas foi obtido pelo uso de kit comercial (“High Pure Viral Nucleic Acid Kit”, Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

6 – Procedeu-se à amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR) da região hipervariável 4 da subunidade menor do gene 18S ácido ribonucleico ribossómico (ARNr). Utilizou-se um par de “primers” (desenhados a partir do programa informático Primer3 e BLAST) complementares das sequências que flanqueiam esta região (conservada entre as espécies de *Babesia* e *Theileria*).

Condições da reacção de PCR (volume final 50 µL):

Tampão da Taq ADN polimerase - 10X

Cloreto de Magnésio (MgCl₂) - 1 mM

Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) - 0,2 mM

Primers - 0,5 µM cada: “forward” (5' CAATCCTGACACAGGGAGGT 3') e “reverse” (5' TGATCGTCTTCGATCCCCTA 3')

Taq ADN polimerase (Invitrogen) - 2.5 unidades

Protocolo da reacção:

	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	30
Hibridação	60°C	30 segundos	
Alongamento	72°C	1 minuto	
Alongamento final	72°C	7 minutos	1

7 – Os produtos obtidos foram visualizados por electroforese em gel de agarose com brometo de etídio. A sequenciação dos fragmentos amplificados foi determinada (STAB Vida) e analisada com recurso ao programa informático BLAST (NCBI, 2009).

Anexo III – Metodologia utilizada para imunohistoquímica com os anticorpos primários anti-CD79 α cy, anti-CD3 e anti-proteína mielomonocítica L1

1 - Desparafinação e hidratação

- a) Xilol - 15 minutos
- b) Álcool absoluto - 1 minuto
- c) Álcool 95° - 1 minuto
- d) Álcool 70° - 1 minuto
- e) Água destilada - 1 minuto

2 - Inibição da peroxidase endógena em solução aquosa de peróxido de hidrogénio (peróxido de hidrogénio a 30%; Merck, 1.07210.0250) a 3%, em agitação contínua, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

4 - Recuperação antigénica, pelo calor, em micro-ondas (Samsung TDS[®], M1717N): as lâminas foram colocadas num cesto de vidro e mergulhadas numa solução tampão (Anexo IV), que as cobriu na totalidade. Seguidamente, foram irradiadas a 800 watts, até a solução tampão começar a borbulhar (aproximadamente 10 a 12 minutos após o início da irradiação). Neste momento reduziu-se a potência inicial para 700 a 750 watts e continuou-se a irradiação por mais 10 minutos. Após este processo as lâminas foram deixadas arrefecer durante 20 minutos à temperatura ambiente.

5 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

6 - Incubação com o soro primário (Tabela 2).

7 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

8 - Incubação com o reagente “HRP Polymer Conjugate” do kit de detecção SuperPicTure[™] Polymer (Zymed Laboratories, 87-9663), durante 10 minutos à temperatura ambiente, preparado de acordo com as instruções do fabricante.

9 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

10 - Incubação com solução de DAB fornecida no kit de detecção SuperPicture™ Polymer (Zymed Laboratories, 87-9663), durante 10 minutos à temperatura ambiente, preparada de acordo com as instruções do fabricante.

11 - Lavagem em água corrente durante 10 minutos.

12 - Coloração com hematoxilina de Mayer (Anexo IV), durante 1 minuto.

13 - Lavagem em água corrente durante 5 minutos.

14 - Desidratação e diafanização

a) Álcool 70° - 2 minutos

b) Álcool 95° - 2 minutos

c) Álcool absoluto - 2 minutos

d) Xilol - 2 minutos

15 - Montagem das lâminas em meio sintético de montagem Entellan New (Merck, 1.07961).

Anexo IV – Soluções e coloração de contraste utilizadas para imunohistoquímica no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade de Évora

Solução tampão de Tris (TBS)

Solução-mãe de TRIS:

Tris - (TRIZMA BASE - Sigma, 201501) - 60,57 g

Água destilada - 500 ml

Ácido Clorídrico (HCL) 1Molar (Merck, 1.09060) - 380 ml

Acertar o pH a 7.6 com HCl concentrado (Ácido Clorídrico fumante 37%, Merck, 1.00317).

Água destilada - até atingir 1000 ml de solução

PBS (pH 7.2 a 7.4):

Cloreto de sódio (Merck, 1.06404) - 35,2 g

Cloreto de potássio (Merck, 1.04936) - 0,8 g

Hidrogenofosfato de sódio (Merck, 1.06586) - 8 g

Di-hidrogenofosfato de potássio (Merck, 1.04873) - 1,6 g

Água destilada - 4000 ml

Solução tampão final de TBS (extemporânea):

Solução-mãe de TRIS - 100 ml

PBS [Soro fisiológico tamponado - "Phosphate Buffered Saline" (PBS)] - 900 ml

Soluções tampão para recuperação antigénica

Tampão citrato (Solução concentrada 10 vezes de tampão citrato)

Solução A:

Ácido Cítrico (Merck, 1.00244) - 94,5 g

Água destilada - 450 ml

Solução B (extemporânea):

Citrato de sódio (Merck, 1.06448) - 121 g

Água destilada - 410 ml

Solução concentrada:

Solução A - 90 ml

Solução B - 410 ml

Tampão citrato (pH 6):

Solução concentrada - 50 ml

Água destilada - 4950 ml

Se necessário ajustar o pH a 6.0 com uma solução de NaOH 1Molar (M) ou solução HCl 1M (Merck, 1.09060).

EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético)

EDTA (Sigma, ACS Reagent E, 9884) - 1,85 g

Água destilada - 5000 ml

Acertar o pH a 9 com NaOH a 1M.

Solução aquosa de NaOH 1Molar : NaOH (Merck 1.06498) - 40g/l

Hematoxilina de Mayer

Hematoxilina de Mayer (Merck, 1.09249) - 4 ml

Água destilada - 6 ml

Anexo V – Metodologia utilizada para imunohistoquímica com os anticorpos anti-*Theileria annulata* (1C7, 1C12 e R2185)

1 - Desparafinação e hidratação

- a) Xilol - 15 minutos
- b) Álcool absoluto - 1 minuto
- c) Álcool 95° - 1 minuto
- d) Álcool 70° - 1 minuto
- e) Água destilada - 1 minuto

2 - Inibição da peroxidase endógena em solução aquosa de peróxido de hidrogénio (peróxido de hidrogénio a 30%; Merck, 1.07210.0250) a 3%, em agitação contínua, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

4 - Recuperação antigénica (apenas para 1C7 e 1C12), pelo calor, em micro-ondas (Samsung TDS[®], M1717N): as lâminas foram colocadas num cesto de vidro e mergulhadas numa solução de tampão citrato (Anexo IV), que as cobriu na totalidade. Seguidamente, foram irradiadas a 800 watts, até a solução tampão começar a borbulhar (aproximadamente 10 a 12 minutos após o início da irradiação). Neste momento reduziu-se a potência inicial para 700 a 750 watts e continuou-se a irradiação por mais 10 minutos. Após este processo as lâminas foram arrefecidas durante 20 minutos à temperatura ambiente.

5 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

6 - Incubação com o soro primário.

7 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

8 - Incubação com o reagente “HRP Polymer Conjugate” do kit de detecção SuperPicTure[™] Polymer (Zymed Laboratories, 87-9663), durante 10 minutos à temperatura ambiente, preparado de acordo com as instruções do fabricante.

9 - Três lavagens com TBS, 2 minutos cada.

10 - Incubação com solução de DAB fornecida no kit de detecção SuperPicture™ Polymer (Zymed Laboratories, 87-9663), durante 10 minutos à temperatura ambiente, preparada de acordo com as instruções do fabricante.

11 - Lavagem em água corrente durante 10 minutos.

12 - Coloração com hematoxilina de Mayer (Anexo IV), durante 1 minuto.

13 - Lavagem em água corrente durante 5 minutos.

14 - Desidratação e diafanização

a) Álcool 70° - 2 minutos

b) Álcool 95° - 2 minutos

c) Álcool absoluto - 2 minutos

d) Xilol - 2 minutos

15 - Montagem das lâminas em meio sintético de montagem Entellan New (Merck, 1.07961).

Anexo VI – Metodologia utilizada para microscopia electrónica de transmissão

1 - Fixação dos fragmentos colhidos em solução fixadora de paraformaldeído a 2% – glutaraldeído a 2,5%, previamente arrefecida a 4°C. De seguida, os fragmentos foram finamente cortados em fragmentos com cerca de 1 mm³ e renovada a solução fixadora após 1 hora. Os fragmentos foram aí mantidos por mais 2 horas, a 4°C.

2 - Três lavagens com solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4), 10 minutos cada. O material permaneceu durante a noite, a 4°C, na solução tampão de lavagem. Na manhã seguinte, substituiu-se o tampão e lavou-se por mais 10 minutos.

3 - A pós-fixação decorreu durante 2 horas, a 4°C, em solução de trabalho de tetróxido de ósmio.

4 - Três lavagens em solução tampão de acetato de sódio 0,2 M (pH 5), 10 minutos cada.

5 - Coloração em solução aquosa a 2% de acetato de uranilo (EMS, 22400), durante 1 hora a 4°C, seguida de novo ciclo de lavagem em solução tampão de acetato de sódio.

6 - Desidratação dos fragmentos por imersão em concentrações crescentes de etanol: etanol 70% (10 minutos), etanol 95% (2 x 10 minutos) e etanol absoluto (3 x 10 minutos).

7 - Imersão dos fragmentos em epoxipropano (Merck, 1.12492), 2 vezes, 15 minutos cada.

8 - Colocação dos fragmentos numa mistura em partes iguais de epoxipropano e de resina epon-araldite de Mollenhauer (EMS, 13940), 2 vezes, 15 minutos cada.

9 - Inclusão por imersão em resina de epon-araldite, substituída após 30 minutos por resina nova. Os fragmentos foram colocados 30 minutos no excicador sob vácuo em frasco destapado e aqui mantidos durante a noite.

10 - Polimerização da resina em moldes de silicone. Os fragmentos permaneceram nesta resina durante 3 dias em estufa a 60 °C.

11 - Corte dos blocos em ultramicrómetro de facas de vidro, feitas no momento da utilização, para obtenção de cortes semi-finos de 1µm de espessura. Estes cortes foram colhidos para lâminas de uso corrente. A secagem e aderência dos mesmos à lâmina foi feita em placa aquecida.

12 - Coloração dos cortes com solução de azul de toluidina (Merck, 1.15930) em carbonato de sódio decahidratado (Merck, 1.06391) 1:10, em placa aquecida, 40 a 50°C, durante aproximadamente 30 segundos. Observação dos cortes ao microscópio óptico para selecção da região do bloco a submeter à obtenção de cortes ultra-finos.

13 - Realização de cortes ultra-finos (80 a 90 nm de espessura) da área seleccionada, previamente exposta por desbaste do bloco. Os cortes obtidos foram recolhidos para grelhas de cobre de 400 *mesh*.

14 - Contraste dos cortes ultra-finos com solução aquosa de acetato de uranilo a 2% durante 30 minutos, protegidos da luz.

15 – Lavagem com água destilada.

16 - Coloração com solução de citrato de chumbo (solução de Reynolds) durante 5 minutos e secagem à temperatura ambiente.

Solução fixadora tamponada de paraformaldeído a 2% – glutaraldeído a 2,5%:

Paraformaldeído puríssimo (Merck, 8.18715) - 2 g

Solução aquosa comercial de glutaraldeído a 25% (EMS, 16200) - 10 ml

Solução tampão de cacodilato de sódio (0,2M), pH 7.4 - 50 ml

Água bidestilada - perfazer até 100 ml

Se necessário usar NaOH 1M para clarificar a solução e ajustar o pH a 7.4.

Solução tampão de cacodilato de sódio 0,2M, pH 7.4:

Cacodilato de sódio trihidratado (Merck, 8.20670) - 42,8 g

Água bidestilada - 1000 ml

Ajustar pH com HCL 1M (Merck, 1.09060)

Solução de trabalho de tetróxido de ósmio (extemporânea)

Solução mãe de teróxido de ósmio:

Tetróxido de ósmio (Merck, 1.24505) - 1 g

Água bidestilada - 50 ml

A solução de trabalho final foi obtida por solução 1:1 com solução tampão de cacodilato de sódio 0,2M.

Solução tampão de acetato de sódio 0,2M a pH 5,0:

Acetato de sódio (EMS, 21120) - 11,4ml/l

Água destilada

Ajustar o pH com NaOH 1M

Solução de Reynolds (50 ml):

Nitrato de chumbo (Merck, 1.07398) - 1,33 g

Citrato trissódico (Merck, 1.06448) - 1,76 g

Água destilada fervida (durante aproximadamente 20 minutos) - 30 ml

Agitar vigorosamente de 5 em 5 minutos durante 30 minutos

NaOH 1M - 8 ml. Agitar até a solução ficar límpida.

Adicionar a água destilada fervida até perfazer 50 ml.

Anexo VII – Protocolos das reacções de PCR para amplificação dos fragmentos de ADNmt e para sequenciação dos produtos obtidos

Condições da reacção de amplificação dos fragmentos de D-loop mitocondrial:

Tampão da Taq ADN polimerase (Promega) - 5 µl

Cloreto de Magnésio (MgCl₂. Promega) - 1,5 µl

Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs. Bioron) - 1 µl

Primers - 0,5 µl (1,0 mM) cada

Taq ADN polimerase (Promega) - 0,5 µl

A quantidade de ADN adicionada, de cada amostra, foi aquela que permitiu obter 100 ng desta molécula no volume final da reacção. O volume total da reacção foi obtido por adição de água desionizada esterilizada. Usou-se água desionizada esterilizada para controlo negativo da reacção e ADNmt extraído de sangue periférico de bovino para controlo positivo.

Protocolo da reacção de amplificação dos fragmentos de D-loop mitocondrial:

	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	40
Hibridação	60°C Frag.1 ; 56°C Frag.2	30 segundos	
Alongamento	72°C	1 minuto	
Alongamento final	72°C	10 minutos	1

Condições da reacção para sequenciação dos fragmentos de D-loop mitocondrial:

BigDye - 0,6 µl

Tampão de sequenciação - 3,4 µl

Produto PCR - 3 µl

Primers - 0,3 µl

H₂O - 2,7 µl**Protocolo da reacção para sequenciação dos fragmentos de D-loop mitocondrial:**

	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	30 segundos	1
Desnaturação	94°C	10 segundos	35
Hibridação	58°C	10 segundos	
Alongamento	60°C	2 minutos	
Alongamento final	60°C	10 minutos	1

Anexo VIII – Publicações

O presente trabalho foi submetido a duas publicações em actas de Encontros Científicos e aceite para publicação no Journal of Veterinary Science a 7 de Dezembro de 2009 (submissão nº JVS 09-066).

Actas em Encontros Científicos:

- Sandra Branco, João Orvalho, Alexandre Leitão, Isadora Pereira, Manuel Malta, Isabel Mariano, Tânia Carvalho, Rui Baptista & Conceição Peleteiro (2004). "Lymphoma like lesions in calves infected by *Theileria annulata*". Proceedings of 12th Annual Meeting of the Portuguese Society of Animal Pathology jointly with 16th Annual Meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology, 2-4 June 2004. Famalicão. Portugal (**comunicação oral**).

- "Linfoma maligno multicêntrico em vitelos infectados por *Theileria annulata*". Branco S, Orvalho J, Leitão A, Pereira I, Malta M, Mariano I, Carvalho T, Baptista R, Peleteiro, C.
3º Congresso da SPCV, 13-15 Outubro 2005. EZN – Vale de Santarém. Portugal (**comunicação em painel**).

Artigo (JVS 09-066):

Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation

Sandra Branco¹, João Orvalho², Alexandre Leitão³, Isadora Pereira³, Manuel Malta⁴, Isabel Mariano⁵, Tânia Carvalho⁶, Rui Baptista⁷, Brian R. Shiels⁸, Maria C. Peleteiro⁹

1- Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap.94, 7002-554 Évora, Portugal. 2- University of California, Veterinary Medical Center, 10435 Sorrento Valley Road, Suite 101 San Diego, USA. 3- Instituto de Investigação Científica Tropical, CVZ, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal. 4- Vet+ Serviços Veterinários Lda., Largo Machado Santos Lote 16, 7050-125 Montemor-o-Novo, Portugal. 5- Cooperativa Agrícola de Compra e Venda de Montemor-o-Novo, CRL (COPRAPEC), Rua 5 Outubro 76-1º, 7050-355 Montemor-o-Novo, Portugal. 6- Centro de Investigação em Patobiologia Molecular, Instituto Português de Oncologia, Rua Prof. Lima Basto, 1099-023 Lisboa, Portugal. 7- Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Estrada de Benfica 701, 1549-011 Lisboa, Portugal. 8- Division of Infection and Immunity, Institute of Comparative Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Glasgow, Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, Scotland. 9- CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal.

Corresponding author: Sandra Maria da Silva Branco, DVM, Master of Science

Address: Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap.94, 7002-554 Évora, Portugal.

E-mail: smbb@uevora.pt

Phone number: +351266760809/59

Fax number: +351266760894

Running Title: Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal

Abstract

The authors describe 15 cases of acute lethal infection of calves (≤ 4 months of age) by the protozoan parasite *Theileria annulata* in the south of Portugal. Calves developed multifocal to coalescent nodular skin lesions, similar to multicentric malignant lymphoma. Infestation with ticks (genus *Hyalomma*) was intense. *Theileria* was seen in blood and lymph node smears, and *Theileria annulata* infection was confirmed by isolation of schizont-transformed cells and sequencing of hypervariable region 4 of the 18S rRNA gene. At necropsy, hemorrhagic nodules or nodules with a hemorrhagic halo were seen, particularly in the skin, subcutaneous tissue, skeletal and cardiac muscle, pharynx, trachea and intestinal serosa. Histologically nodules were formed by large, round, lymphoblastoid neoplastic-like cells. Immunohistochemistry (IHC) identified these cells as mostly CD3 positive T lymphocytes and MAC387 positive macrophages. A marker for B lymphocytes (CD79 α cy) labelled very few cells. *Theileria annulata* infected cells in these nodules were also identified by IHC, through the use of two monoclonal antibodies (1C7 and 1C12) diagnostic for the parasite. It was concluded that the pathological changes observed in the different organs and tissues were caused by proliferation of schizont-infected macrophages, which subsequently stimulate a severe uncontrolled proliferation of uninfected T lymphocytes.

Key words: *Theileria annulata*, tropical theileriosis, cattle, lymphoid cell proliferation

Introduction

Various cases of multifocal to coalescent nodular skin lesions and lymph node enlargement, similar to multicentric malignant lymphoma, were registered in very young calves in the south of Portugal. All cases were identified within a short time period, starting from the end of 1999 and progressing through to November 2007. Veterinarians working in the area commented that diseased calves displaying similar pathology had been observed in the past, although less frequently, and that no diagnosis had ever been achieved.

As outlined below, the results of our investigation strongly support the conclusion that death of the affected calves was the result of acute tropical theileriosis, a disease caused by *Theileria annulata*, a protozoan parasite that has a biphasic life cycle. The first phase of the life cycle occurs in the arthropod vector, ticks of the genus *Hyalomma*, while the second phase occurs in the definitive mammalian host, domesticated and wild ruminants (23). Tropical theileriosis is highly prevalent in Africa, southern Europe, the Near East and Far East and Central Asia, and has considerable economic impact on livestock production due to the high morbidity and mortality of the disease (5, 6).

Infection of cattle occurs through inoculation of sporozoites during feeding by the infected tick. Sporozoites mostly infect macrophages (8, 9, 15, 24, 32, 39), but can also infect B lymphocytes (14, 24, 32, 39). The parasite continues its development in the cytoplasm of host cells, differentiating via the trophozoite into the multinucleated macroschizont (schizogony), which has the ability to stimulate cell division of the infected leukocyte. The parasite divides in synchrony with the daughter leukocytes resulting in a clonal expansion of cells. The initial phase of expansion

occurs in the lymph node draining the site of tick attachment, but later as the disease progresses, infected leukocytes spread to a range of different organs and tissues, where they stimulate division of uninfected cells while continuing to multiply as parasite infected cells (15, 16, 24, 28, 33).

Following expansion of infected leukocytes, host cell division slows down and merozoites are formed. Merozoites are then released as the leukocyte is destroyed, infect the red blood cells and transform into piroplasms (gametocytes), which are the infective form for the tick. The sexual phase of the life cycle of the *Theileria annulata* proceeds in the digestive system of the infected tick and gives rise to the production of sporozoites in the salivary glands of the tick (23).

Theileria spp. infection can cause acute, subacute or chronic disease pathology (16). In endemic areas, affected indigenous breeds present mainly a subacute condition and are resistant to re-infection upon recovery. Imported breeds or crossbred (imported/native) animals, however, are more susceptible and can suffer high mortality rates (5, 27). *Theileria* spp. infection in Portugal has not been subject to recent study, the only reference published on *Theileria annulata* in Portugal dating to 1945 (20). Tropical theileriosis is generally considered by Portuguese parasitologists to be an endemic tick borne infection of cattle with mild/moderate pathology, primarily due to regular identification of the parasite in blood smears collected from asymptomatic animals. In contrast we provide conclusive evidence that the causative agent of episodes of a fatal disease recently identified in Portugal was *T. annulata* and discuss how parasite infection could generate the pathological changes that characterised these cases.

Materials and Methods

Cases studied, tissue sampling and processing

From December 1999 to November 2007, 15 calves (numbered 1 to 15) younger than four months old, showing signs of an acute disease syndrome leading to death or euthanasia, were identified from the southern region of Portugal (Table 1). All animals were born on the farms where they lived and all of these farms were registered as free of Bovine Leukosis Virus. Distance between farms ranged from 20 to 100 km. Some cases came to the authors' knowledge only after death or euthanasia, which limited sampling for further analysis.

Peripheral blood smears were obtained in seven cases (animals 4, 7, 8, 9, 10, 12 and 14), and lymph node fine needle aspirates were obtained in six cases (animals 7, 8, 9, 10, 12 and 15). All smears were stained using Giemsa and parasitaemia assessed by examining 10 random fields (X1000 magnification). Blood samples for hemogram were collected from animals 4 and 12. The hemogram of calf 4 was performed at the Veterinary Laboratory of Clinical Analysis (LABVET) of Coprapec in Montemor-o-Novo and blood analysis of animal 12 was performed at the Laboratory of Clinical Analysis of the Veterinary Hospital of the University of Évora.

All calves were necropsied and samples of organs and tissues collected for histopathology. The samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin and processed for examination by standard light microscopy techniques. Paraffin sections were cut at 3µm and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Giemsa. During necropsy of the euthanized animal 4, a bone marrow aspiration was performed to provide information on hematopoietic cells. Giemsa stained smears were examined

at the Laboratory of Clinical Analysis of the Faculty of Veterinary Medicine of the Technical University of Lisbon.

Immunohistochemistry

The indirect immunoperoxidase method (streptavidin-biotin-peroxidase) was used for immunolabelling sections of skin and skeletal muscle nodules and lymph nodes using two monoclonal primary antibodies, anti-CD79 α cy (clone HM57, Dako) and anti-human macrophage (clone MAC387, Serotec) and one polyclonal primary antibody anti-CD3-(Dako), for detection of B lymphocytes, macrophages and T lymphocytes, respectively. For immunolabelling *Theileria annulata* infected cells we used two monoclonal antibodies (mAbs), 1C7 and 1C12, previously shown to be specific for the macroschizont stage of the parasite (17, 36, 37). Tissue sections were rehydrated and treated with 3% hydrogen peroxide in water for 20 min to eliminate endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was performed by microwave irradiation (Samsung TDS conventional microwave) in citrate buffer 10 mM pH 6.0 (MAC387, 1C7 and 1C12) or in 1mM EDTA pH 9.0 (anti-CD79 α cy and anti-CD3). The slides were irradiated at maximum power (800W) until the solution was boiling, the power then lowered to 80% of the maximum for a further 10 min followed by rinsing with TBS. Slides were incubated with primary antibodies anti-CD79 α cy, anti-CD3, 1C7 and 1C12 for 1 hour at room temperature or overnight at room temperature for MAC387. Dilutions were 1:100 for MAC387 and anti-CD3, 1:50 for anti-CD79 α cy and neat culture supernatant for mAbs 1C7 and 1C12.

The SuperPicture Polymer (Zymed Laboratories) detection system was used according to the manufacturer's instructions and labelling was visualized with 3,3'-diaminobenzidine (The SuperPicture Polymer - Zymed Laboratories) for 8-10 min.

Finally, the slides were counter-stained with Mayer's haematoxylin and mounted according to standard techniques. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with TBS. Positive controls consisted of bovine tissues known to be reactive for each marker, lymph node for B and T cells, and spleen for macrophages. The level of cellular staining was evaluated in a semiquantitative manner by examination of the entire histological sections.

Cultivation and identification of parasites

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized (20IU/mL) blood (animals n°s 8 and 9) by centrifugation over Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences). The PBMC were then washed three times with Hanks' balanced saline solution and the final pellet resuspended in culture medium (RPMI 1640 supplemented with 20% foetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin). PBMC suspensions (5×10^6 cells/mL) were seeded in plastic tissue culture flasks and incubated at 37 °C, in 5% CO₂ and > 80% humidity. After 48 h, non-adherent cells were gently removed and fresh culture medium added. This procedure was repeated until the loosely adherent cells nearly covered the flask. Subsequently, cell cultures were passaged two to three times a week as described (34). Total DNA extracts from schizont-infected cells were prepared using a commercial kit "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Roche), following the manufacturer's instructions. For PCR amplification of hypervariable region 4 of the small subunit 18S ribosomal RNA gene, a pair of primers complementary to sequences flanking this region that are conserved across *Babesia* and *Theileria* species were designed using the software programs primer3 (31) and BLAST (41). PCR reactions were performed in a 50 µL mixture containing 10X PCR Buffer and

2.5 units Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen), 1 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.5 μM each forward (5' CAATCCTGACACAGGGAGGT 3') and reverse (5' TGATCGTCTTCGATCCCCTA 3') primer. The reaction mixture was incubated in a thermal cycler at 94°C for 3 min and cycled: 30 times 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min, with a final 7 min extension at 72 °C. The product was detected by agarose gel electrophoresis using ethidium bromide, and the nucleotide sequence of the amplified fragment determined (STAB Vida). The BLAST program available from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used for analysis of sequence identity (41).

Results

Clinical Signs

All animals suffering from disease reported in the study died or were euthanized, because there was no possibility of recovery, one week to fifteen days after the onset of clinical symptoms. All animals displayed emaciation, anaemia, unilateral or bilateral exophthalmia, petechiae in conjunctiva, oral and nasal mucosa and, sometimes, also in the pinnae. Subcutaneous nodules that were widespread and had a 0.5 to 3.0 cm diameter were also detected, as well as enlarged superficial lymph nodes particularly the submandibular, the retropharyngeal and sometimes the prescapular. All animals had a high level of infestation by ticks of the genus *Hyalomma*.

Parasitology

Theileria annulata piroplasms (mainly ring forms) were identified in erythrocytes of blood smears (Fig. 1A); the level of parasitaemia for each animal is

listed in Table 2. All lymph nodes smears showed evidence of macroschizonts in mononuclear cells (Fig.1B).

Blood and bone marrow analysis

The results of the hemograms of animals 4 and 12 revealed anaemia (red blood cells $2.52 \times 10^6/\mu\text{L}$ and $2.75 \times 10^6/\mu\text{L}$; Hemoglobin 3.6 g/dL and 3.3 g/dL, respectively). Bone marrow analysis of animal 4 showed marked erythroid hypoplasia (rubriblast and prorubricytes 0% and rubricytes and metarubricytes 0.7%) and the presence of a high number of lymphoid-like cells together with several criteria indicating malignancy: anisocytosis, anisokaryosis and multiple nucleoli. Some of these cells presented *Theileria*-like organisms within their cytoplasm.

Establishment of continuously growing schizont-infected cell lines and identification of the transforming parasite

Schizont-infected lymphoblastoid cell lines were successfully initiated from cases 8 and 9, registered in farms 20 km apart with an interval of 14 months (Table 1), and were used to identify the parasite species responsible for transformation of the bovine cells. PCR amplification of the hypervariable region 4 of the small subunit 18S ribosomal RNA gene resulted in a single band of the predicted size, 500 bp, as observed by agarose gel electrophoresis. Amplified fragments generated from three independent PCR reactions, one from culture 8 and two from culture 9, were directly sequenced in both directions and the sequence of the central 400 bp region, read in both directions for all 3 amplicons, was deposited in GenBank under the accession number GQ465761. Searching for homology in nucleotide databases generated 100% identity with the corresponding 18s rRNA sequence of *Theileria annulata*,

Ankara strain (accession NW_001091929) and 99-100% identity with sequences representing other *T annulata* isolates deposited in GenBank. Comparison with sequences derived from other species of *Theileira* that infect bovines, gave the highest level of identity with *T parva* (97%) followed *T taurotragi* (96%).

Macroscopic Lesions

On necropsy, external examination identified similar changes to those described for live diseased animals observed in the field. Calves 9 and 11 had jaundice. Many white nodules (sometimes haemorrhagic or with a haemorrhagic halo) of 0.2-3 cm in diameter with a compact and uniform cut surface were identified in the skin and subcutaneous tissue of all carcasses (Fig. 2A). Similar nodules were observed in skeletal muscles (particularly in the tongue, intermandibular muscles and cervical muscles), abdominal fat, omentum and intestinal serosa. Some calves exhibited these nodules in the pharynx (Fig. 2B), trachea, myocardium, pituitary gland, thymus and retrobulbar tissue. Widespread enlarged lymph nodes were identified in all cases. These presented an oedematous, haemorrhagic or alternatively a homogeneous, firm and pale yellow cut surface. Other macroscopic changes included hydrohemothorax, congestion and oedema of the lungs, a friable spleen and an enlarged liver.

Histopathological Lesions

The nodules described in the various tissues were found to be formed by round cells, similar to lymphoid neoplastic cells with moderate pleomorphism (Fig. 3A). In the lymph nodes and spleen, moderate infiltration by these cells was accompanied by hypoplasia of the lymphoid tissue. Some lymph nodes also showed

heavy diffuse lymphocytic infiltration with no clear cortico-medullary demarcation. In the skin, the infiltration rarely reached the superficial dermis and did not infiltrate the epidermis, being mostly limited to middle and deep dermis.

The neoplastic-like cells had an unclear cell membrane, a scarce slightly basophilic cytoplasm, a high nucleus/cytoplasm ratio, occasionally indented nuclei, chromatin forming granules near the nuclear membrane and signs of cariorexis (Fig. 3B). The cells also displayed moderate anisocaryosis and had a high mitotic index, with 2 to 3 mitoses per field (X400 magnification). Occasionally, macroschizonts of *Theileria annulata* detected by Giemsa stain were identified in the cytoplasm of these cells.

Immunohistochemistry

In almost all the nodules described above the cell population was formed by CD3 positive T lymphocytes and macrophages labelled by MAC387 (Table 3; Fig. 3C and 3D). Cells labelled by these antibodies displayed strong cytoplasmic staining. Some CD3 positive cells also presented cell membrane staining. Few B lymphocytes positive for CD79 α cy were observed, and were interspersed amongst T lymphocytes and macrophages. Most lymphocytes identified in lymph nodes were CD3 positive T cells (Table 3). The expected labelling profile was obtained in all positive controls and specificity was confirmed by negative staining when the antibodies were replaced by TBS.

When using mAbs 1C7 and 1C12, *Theileria annulata* macroschizonts were detected in 25-50% of the neoplastic-like cells identified in histological lesions and sometimes in more than 50% of these cells (Table 3; Fig. 4A and 4B).

Discussion

The authors describe 15 cases of acute lethal infection by the protozoan parasite, *Theileria annulata* in calves less than four months old, reared in the south of Portugal. The diseased calves developed multifocal to coalescent nodular skin lesions, similar to multicentric malignant lymphoma.

Infection with Bovine Leukosis Virus was disregarded from the beginning because the farms were and remain officially free of the virus. Furthermore, the age of the animals and the clinical presentation were not compatible with this disease syndrome (40). Based on this conclusion we postulated that the animals could have suffered from Bovine Sporadic Leukosis (BSL), a disease of unknown aetiology. However, the frequency of the first cases identified in a limited geographic area, together with the clinical and pathological observations did not completely match a diagnosis of BSL (40). BSL affects animals under six months old, and is characterised by presence of white nodules with different sizes, located mainly in the kidney, thymus, liver and spleen, and by exuberant hypertrophy of most of the internal and surface lymph nodes (40). In addition, lesions in the animals examined in the present study were different from those reported in BSL, as the kidneys, liver or spleen, were rarely affected and the nodular lesions were mainly located in other organs. These findings led us to consider other possible causes, of which infection by *Theileria* parasites appeared most likely, since all the lesions identified were similar to those described by other authors for Tropical theileriosis and East Coast Fever (12, 13, 14, 15, 16, 25). Furthermore, all the diseased animals were heavily infested with *Hyalomma* ticks, the known vector of *Theileria annulata* (23). Further work was carried out to confirm whether these animals were infected with *T. annulata* and to

verify the relationship between infection by this protozoan and the lesions characterised in the diseased animals.

In addition to signs similar to malignant lymphoma, tropical theileriosis is known to cause significant anaemia (16). The results of the hemograms and assessment of parasitaemia confirmed the presence of anaemia observed in the field and are in agreement with reports on tropical theileriosis by other authors (14, 15). Moreover, the bone marrow test of animal 4 confirmed the presence of lymphoid cells with similar characteristics to those described for the different nodular lesions, and also indicated the presence of intracellular *Theileria*-like organisms. This was confirmed by using two monoclonal antibodies diagnostic for the macroschizont of *T. annulata* (17, 31, 36, 37) that clearly detected the parasite in the lesions of the skin, skeletal muscle and lymph node (See Figs. 8 and 9). Nodular lesions, as identified by immunohistochemistry, were mainly formed by T lymphocytes and macrophages, 25 to 50% of which were infected with *Theileria annulata*. The labelling obtained with the monoclonal antibodies to *Theileria annulata* is in agreement with what has already been referred to in other reports (9, 15, 22, 36, 37). The presence of high numbers of T cells in the lymph nodes also showed that such cells were proliferating significantly, but not infiltrating classical target organs such as spleen and liver as observed in cases of lymphoma (9, 40).

Further confirmation of the aetiology of the disease was obtained by derivation of the sequence of the hypervariable region 4 of the parasite small subunit 18S ribosomal RNA gene, derived from cell lines established from two calves that were located on independent farms and sampled 14 months apart. Both sequences showed 100% identity with the sequence determined for the Ankara strain of *T.*

annulata. Indeed, the sequence is 99-100% identical to all the 18s rRNA sequences of *T. annulata* deposited in the databases, including those of isolates from countries that border Portugal (Spain and France) and those from more distant endemic geographical regions (Turkey, Tunisia, India and China). A significant alignment to the sequence derived for *Theileria lestoquardi* of sheep (99% identity) was also obtained, while sequences derived for all other species gave 97% or less identity. Thus, based on the 18S rRNA gene identity, discrimination between *T. lestoquardi* and *T. annulata* may be problematic, particularly when analysing samples from *Hyalomma* tick vectors or sheep coinfecting with both species (38). It should be noted, however, that *T. lestoquardi* is unable to infect cattle (21) and, therefore, cannot be the aetiology of the pathological findings described in this study.

Based on the above results we conclude that the cases of acute disease identified in Portugal were caused by infection of the calves by *Theileria annulata* that generated a high level of morbidity and mortality. Since such cases have never been previously reported in Portugal, it is possible that more virulent strains of the parasite have established in the country, or epidemiological circumstances have altered to allow increased tick/parasite challenge or host susceptibility. Given the potential threat of this disease to livestock production in Portugal, a more detailed epidemiological survey is warranted.

The complexity of the *Theileria annulata* biological cycle has hindered complete understanding of the pathogenesis of tropical theileriosis, including how lesions found in a range of tissues and organs of affected animals are generated. Forsyth and others (15) postulated that the pathological changes observed in different organs and tissues are the result of proliferation of infected macrophages, while other clinical

symptoms result from pro-inflammatory cytokines produced by these cells, mainly TNF- α (26). The results of our study, however, do not indicate that tissue lesions are caused solely by proliferation of the infected cell, as proposed previously (7, 9, 11, 25). Thus, phenotypic characterisation of cells for all the microscopic lesions observed indicated that they contained mature uninfected T lymphoid cells and macrophages. The presence of these cell types in the lesions could be induced by generation of the immune response against *Theileria annulata* infection (7, 9, 11, 18), and the tissue lesions associated with acute tropical theileriosis may result from damage caused by the host immune response to different phases of infection (28, 29). For example, macroschizont-infected host macrophages produce proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and INF- α) that may enhance initial establishment of the infection and cause disease (7, 10, 11, 15, 19, 26), while metastasis of infected cells throughout tissues of the body is thought to involve the expression of metalloproteinases (1, 2). Infected macrophages also have the ability to stimulate an aberrant non-specific proliferation of naive T-cells leading to the production of high levels of INF- γ and IL-2, that can stimulate infected and non-infected macrophages to proliferate, but block an efficient specific immune response (3, 11, 15, 18). Clearly such a disruption of the immune response is likely to result in disease pathology and it is known that acute theileriosis is associated with major dysfunction of the bovine immune system. A more complete understanding of how *T. annulata* manipulates the immune response will require detailed knowledge of the molecular mechanisms *Theileria* parasites utilise to activate and control the gene expression profile of the infected leukocyte (18, 35).

Acknowledgements

The authors wish to thank Luísa Fialho, Maria Rosário Luís, Iolanda Fernandes and Dr Rita Cardoso for technical assistance. This work was supported by Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

References

1. **Adamson RE, Hall FR.** A role for matrix metalloproteinases in the pathology and attenuation of *Theileria annulata* infections. *Parasitol Today* 1997, 13, 390-393.
2. **Adamson R, Logan M, Kinnaird J, Langsley G, Hall R.** Loss of matrix metalloproteinase 9 activity in *Theileria annulata*-attenuated cells is at the transcriptional level and is associated with differentially expressed AP-1 species. *Mol Biochem Parasitol* 2000, 106, 51-61.
3. **Ahmed JS, Schnittger L, Melhorn H.** *Theileria* schizonts induce fundamental alterations in their host cells. *Parasitol Res* 1999, 85, 527-538.
4. **Biermann R, Schnittger L, Beyer D, Ahmed JS.** Initiation of translation and cellular localization of *Theileria annulata* casein kinase II α : implication for its role in host cell transformation. *J Cell Physiol* 2003, 196, 444-453.
5. **Brown CGD.** Control of Tropical Theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* 1990, 32, 23-31.
6. **Brown CGD.** Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. *Trop Anim Health Prod* 1997, 29, 1S-3S.
7. **Brown DJ, Campbell JD, Russell GC, Hopkins J, Glass EJ.** T cell activation by *Theileria annulata*-infected macrophages correlates with cytokine production. *Clin Exp Immunol* 1995, 102, 507-514.
8. **Campbell JDM, Brown DJ, Glass EJ, Hall FR, Spooner RL.** *Theileria annulata* sporozoite targets. *Parasite Immunol* 1994, 16, 501-505.
9. **Campbell JD, Howie SE, Odling KA, Glass EJ.** *Theileria annulata* induces aberrant T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 1995, 99, 203-210.

10. **Campbell JD, Spooner RL.** Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. Parasitol Today 1999, 15, 10-16.
11. **Collins RA, Sopp P, Gelder KI, Morrison WI, Howard CJ.** Bovine gamma/delta TcR+ T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. Scand J Immunol 1996, 44, 444-452.
12. **DeMartini JC, Moulton JE.** Responses of the bovine lymphatic system to infection by *Theileria parva*. I. Histology and ultrastructure of lymph nodes in experimentally-infected calves. J Comp Pathol 1973, 83, 281-298.
13. **Dobbelaere DAE, Heussler V.** Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *Theileria annulata*. Annu Rev Microbiol 1999, 53, 1-42.
14. **D'Oliveira C, Weide M, Habela MA, Jacquet P, Jongejan F.** Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J Clin Microbiol 1995, 33, 2665-2669.
15. **Forsyth LMG, Minns FC, Kirvar E, Adamson RE, Hall FR, McOrist S, Brown CGD, Preston PM.** Tissue damage in cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. J Comp Pathol 1999, 120, 39-57.
16. **Gill BS, Bhattacharyulu Y, Kaur D.** Symptoms and Pathology of experimental bovine tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection). Ann Parasitol Hum Comp 1997, 52, 597-608.

17. **Glascodine J, Tetley L, Brown CGD, Tait A, Shiels BR.** Developmental expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* 1990, 40, 105-112.
18. **Glass EJ.** The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis. *Res Vet Sci* 2001, 70, 71-75.
19. **Graham SP, Brown DJ, Vatansever Z, Waddington D, Taylor LH, Nichani AK, Campbell JDM, Adamson RE, Glass EJ, Spooner RL.** Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. *Vaccine* 2001, 19, 2932-2944.
20. **Leitão JLS.** Teileriose bovina em Portugal. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Central de Patologia Veterinária* 1945, II, 1-8.
21. **Leemans I, Brown D, Hooshmand-Rad P, Kirvar E, Uggl A.** Infectivity and cross-immunity studies of *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in sheep and cattle: I. *In vivo* responses. *Vet Parasitol* 1999, 82, 179-192.
22. **Manuja A, Malhotra DV, Sikka VK, Sangwan AK, Sharma R, Kumar B, Mehta BD, Gulati BR, Nichani AK.** Isolates of *Theileria annulata* collected from different parts of India show phenotypic and genetic diversity. *Vet Parasitol* 2006, 137, 242-252.
23. **Mehlhorn H, Schein E.** The piroplasms: life cycle and sexual stage. *Adv Parasitol* 1984, 23, 37-103.
24. **Moreau M, Thibaud J, Miled LB, Chaussepied M, Baumgartner M, Davis WC, Minoprio P, Langsley G.** *Theileria annulata* in CD5+ macrophages and B1 B cells. *Infect Immun* 1999, 67, 6678-6682.

25. **Nichani AK, Thorp BH, Brown CGD, Campbell JDM, Brown DJ, Ritchie M, Spooner RL.** *In vivo* development of *Theileria annulata*: major changes in efferent lymph following infection with sporozoites or allogeneic schizont-infected mononuclear cells. *Parasitology* 1999, 118, 327-333.
26. **Preston PM, Brown CGD, Entrican G, Richardson W, Boid R.** Synthesis of tumor necrosis factor alpha and interferons by mononuclear cells from *Theileria annulata* infected cattle. *Parasite Immunol* 1993, 15, 525-534.
27. **Preston PM, Brown CG, Bell-Sakyi L, Richardson W, Sanderson A.** Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves : response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Res Vet Sci* 1992, 53, 230-243.
28. **Preston PM, Hall FR, Glass EJ, Campbell JDM, Darghouth MA, Ahmed JS, Shiels BR, Spooner RL, Jongejan F, Brown CGD.** Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol Today* 1999, 15, 268-274.
29. **Preston PM, Jongejan F.** Protective immune mechanisms to ticks and tick-borne diseases of ruminants. *Parasitol Today* 1999, 15, 255-258.
30. **Renneker S, Kullmann B, Gerber S, Dobschanski J, Bakheit MA, Geysen D, Shiels B, Tait A, Ahmed JS, Seitzer U.** Development of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Transbound Emerg Dis* 2008, 55, 249-256.
31. **Rozen S, Skaletsky HJ.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds.) *Bioinformatics Methods*

and Protocols: Methods in Molecular Biology. pp. 365-386, Humana Press, Totowa, NJ, 2000.

32. **Sager H, Bertoni G, Jungi TW.** Differences between B cell and macrophage transformation by the bovine parasite, *Theileria annulata*: a clonal approach. J Immunol 1998, 161, 335-341.
33. **Sager H, Davis C, Dobbelaere DAE, Jungi T.** Macrophage-parasite relationship in theileriosis. Reversible phenotypic and functional dedifferentiation of macrophages infected with *Theileria annulata*. J Leukoc Biol 1997, 61, 459-468.
34. **Sharma G, Sharma RD, Nichani AK.** Successful long-term in vitro cultivation of *Theileria annulata* schizonts in media supplemented with homologous and heterologous sera. Vet Parasitol 1998, 79, 135-141.
35. **Shiels B, Langsley G, Weir W, Pain A, McKellar S, Dobbelaere D.** Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. Int J Parasitol 2006, 36, 9-21.
36. **Shiels BR, McDougall C, Tait A, Brown CGD.** Identification of Infection-associated antigens in *Theileria annulata* transformed cells. Parasite Immunol 1986a, 8, 69-77.
37. **Shiels BR, McDougall C, Tait A, Brown CGD.** Antigenic diversity of *Theileria annulata* macroschizonts. Vet Parasitol 1986b, 21, 1-10.
38. **Spitalska E, Torina A, Cannella V, Caracappa S, Sparagano OA.** Discrimination between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vectors and hosts by RFLP based on the 18S rRNA gene. Parasitol Res 2004, 94, 318-320.

39. **Spooner RL, Innes EA, Glass EJ, Brown CGD.** *Theileria annulata* and *Theileria parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. Immunology 1989, 66, 284-288.
40. **Valli, VEO.** The Hematopoietic System. In: Maxie MG (ed.). Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. pp. 199-20, Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 2007.
41. **Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol 2000, 7, 203-214.

Table 1: Date of death, place of origin, age, gender (f-female m-male) and breed of the calves studied

	DATE	ORIGIN	AGE	GENDER	BREED
(1)	December/1999	Élvas	3 months	F	X Limousine
(2)	April/2000	Vendas Novas	1.6 months	M	X Limousine
(3)	October/2000	Montemor-o-Novo	2 months	F	X Limousine
(4)	April/2001	Vendas Novas*	4 months	M	X Limousine
(5)	June/2001	Vendas Novas	1 month	M	Limousine
(6)	July/2001	Évora	2 months	F	Charolais
(7)	March/2002	Viana do Alentejo	3 months	F	X Charolais
(8)	April/2002	Vendas Novas*	1.6 months	F	X Charolais
(9)	June/2003	Montemor-o-Novo	3 weeks	M	Limousine
(10)	September/2003	Évora	2 months	M	X Charolais
(11)	September/2003	Montemor-o-Novo	2 months	M	Charolais
(12)	September/2005	Évora†	3 weeks	F	Alentejana
(13)	October/2005	Évora†	3 weeks	F	Alentejana
(14)	October/2007	Évora†	2 months	M	Alentejana
(15)	November/2007	Évora†	1 month	F	Alentejana

* Same herd ; † Same herd

Table 2: Parasitaemia of animals 4, 7, 8, 9, 10, 12 and 14

ANIMALS	PIROPLASMS IN BLOOD SMEARS (%)
4	25-50%
7	25-50%
8	10-25%
9	5-10%
10	5-10%
12	10-25%
14	10-25%

Table 3: Immunohistochemistry results for sections of lymph node (LN), skeletal muscle (SM) and skin (SK) nodules with primary antibodies anti- macrophages (MAC387), anti-CD3, anti-CD79acy and anti-*Theileria annulata*, 1C7 and 1C12. nd – not determined

		Calves (Table 1)														
Primary antibodies	Organs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MAC387	LN	+++	+++	++	++++	++	+++	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++
	SM	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++++	+++	+++	++	+++	+	+++	++
	SK	+++	nd	++	+++	+	+	nd	++++	nd	nd	++	+++	nd	+++	++
CD3	LN	++++	++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
	SM	+++	++	++++	+++	++	+++	+++	++++	+++	++	++++	++++	+++	+++	+++
	SK	+++	nd	+++	+++	++	+	nd	++++	nd	nd	+++	+++	nd	+++	+++
CD79acy	LN	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	++	+	+++	+++
	SM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
	SK	+	nd	+	+	+	+	nd	+	nd	nd	+	+	nd	++	++
1C7	LN	+++	+++	++	+++	++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
	SM	+++	+++	++	++++	+	+++	++++	++++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++
	SK	+++	nd	nd	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+++	nd	+++	++
1C12	LN	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++++	++++	+++	++
	SM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++++	++	++++	+++	++++	++++	+++	++
	SK	+++	nd	nd	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+++	nd	+++	++

Figure 1: (A) Blood smear showing three ring forms of *Theileria annulata* piroplasms in red blood cells. (B) Lymph node smear showing a schizont in a mononuclear cell. Giemsa, 1000X.

Figure 2: (A) Widespread hemorrhagic nodules in subcutaneous tissue and abdominal muscles of calf (animal 7). (B) Pale and hemorrhagic nodules inserted in the tongue and the laryngeal and pharyngeal mucosa of calf (animal 4).

Figure 3: Lymphoid neoplastic-like cells (A) in a nodule infiltrating the skeletal muscle (H&E, 100X), (B) with indistinct cell-membrane, high nuclear/cytoplasmic ratio and occasionally indented nuclei (H&E, 400X). (C) Cells positive to CD3 (rabbit anti-CD3, streptavidin-biotin-peroxidase, Mayer's hematoxylin counterstain, 100X; *Inset* 400X). (D) Cells positive to MAC387 (mouse anti-human macrophages, streptavidin-biotin-peroxidase, Mayer's hematoxylin counterstain, 100X; *Inset* 400X).

Figure 4: Staining of *Theileria annulata* infected cells with monoclonal antibodies 1C7 (A) and 1C12 (B). Streptavidin-biotin-peroxidase, Mayer's hematoxylin counterstain, 400X.

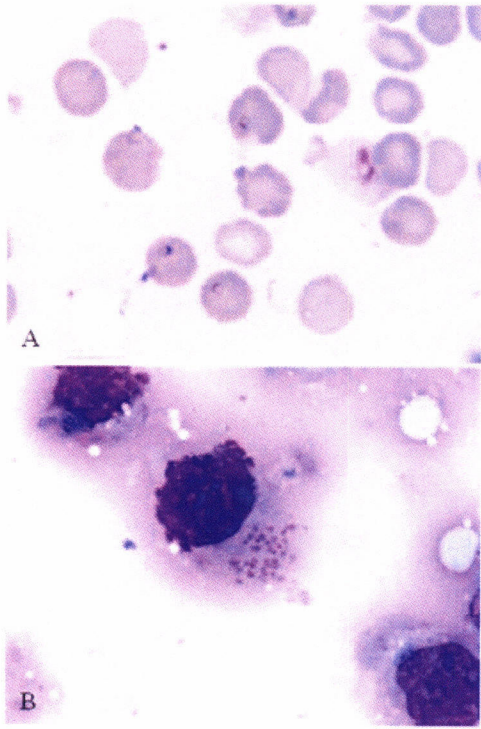


Figure 1



Figure 2

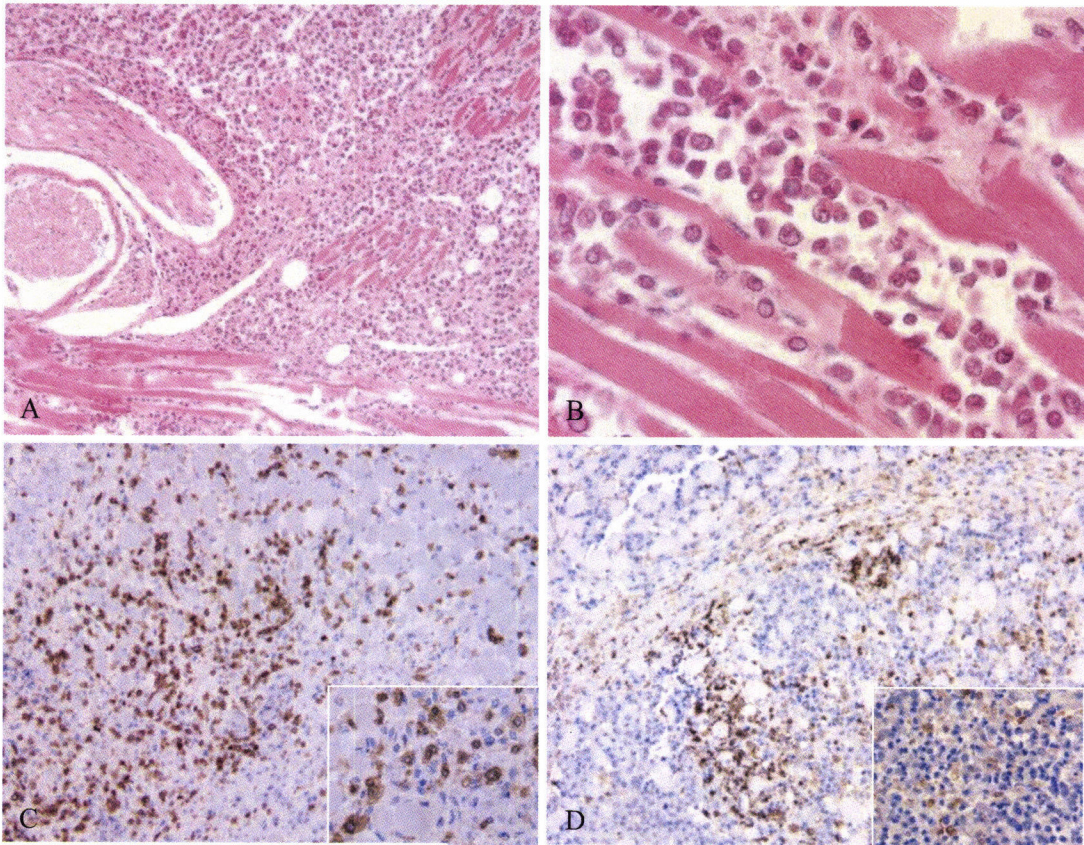


Figure 3

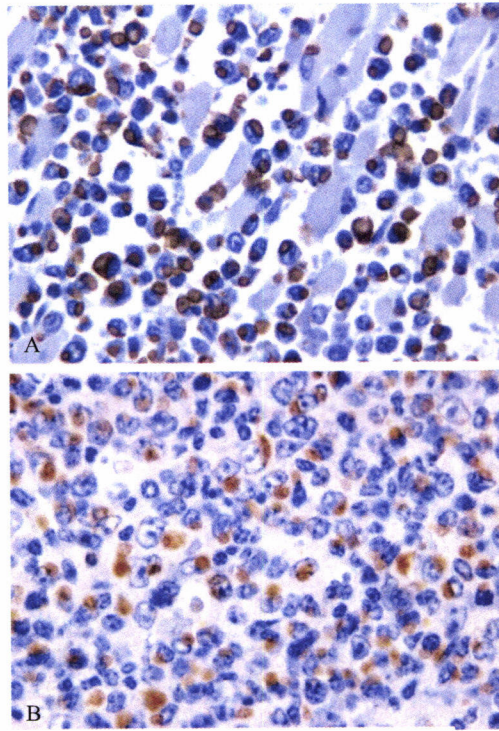


Figure 4

