

# RESPUESTA INMUNITARIA DE OVINOS (*Ovis aries*) FRENTE A DOS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Trypanosoma vivax*

## IMMUNE RESPONSE OF SHEEP (*Ovis aries*) TO TWO VENEZUELAN *Trypanosoma vivax* ISOLATES

Roger Antonio Ramírez-Barrios<sup>1</sup>, Francisco Angulo-Cubillán<sup>1</sup>, Marcelo Gil<sup>1</sup>, Omaira Parra<sup>1</sup>, Lucinda Tavares-Marques<sup>2</sup>, Philippe Holzmüller<sup>3</sup>, Álvaro Martínez-Moreno<sup>4</sup> y Armando Reyna-Bello<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Grupo de Inmunobiología. Caracas. Distrito Capital, Venezuela.

<sup>3</sup>CIRAD UMR 17 Trypanosomes [UMR 177 IRD-CIRAD "Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Trypanosomoses"], TA A-17/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, Francia.

<sup>4</sup>Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba, Córdoba, España. \*Autor para correspondencia: Armando Reyna-Bello. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT. Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. Grupo de Inmunobiología. Caracas. Distrito Capital, Venezuela. Teléfono: +58 212 671 9289. E-mail: areyna@immunobiologia.net.ve

### RESUMEN

La tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma vivax* tiene un gran impacto económico en la industria ganadera de los países tropicales. Debido a la escasa información existente sobre la respuesta inmunitaria inducida por este parásito en ruminantes, se planificó la presente investigación con la finalidad de evaluar y comparar la respuesta inmunitaria de ovinos infectados experimentalmente con dos aislados de *T. vivax*. Ambos aislados fueron obtenidos de diferentes zonas geográficas de Venezuela (TvLIEM176 proveniente del estado Trujillo y TvMT1 del estado Monagas). Tres ovinos fueron inoculados con cada aislado y tres sirvieron como control para un total de nueve animales. Cada tres días (d), durante un periodo de 60 d se tomaron muestras de suero para realizar la prueba de ELISAi (para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma spp.*), y sangre para evaluar la parasitemia y realizar un conteo total y diferencial de leucocitos. Los animales del grupo inoculado con el aislado TvMT1 mostraron mayores niveles de anticuerpos anti-tripanosoma que los animales del grupo TvLIEM176, mientras que la parasitemia se comportó de manera inversa, ya que el aislado TvLIEM176 produjo mayores niveles de parasitemia que TvMT1. Además, el aislado TvLIEM176 originó linfopenia durante los d 12 al 36 postinfección, mientras que el aislado TvMT1 no. Por lo tanto, se demostró que la respuesta inmunitaria humoral de los dos aislados de *T. vivax* en ovinos fue diferente, la cual puede deberse a una inmunosupresión causada por el aislado TvLIEM176 al inducir linfopenia.

**Palabras clave:** Respuesta inmunitaria humoral; anticuerpos; *Trypanosoma vivax*; ovinos.

### ABSTRACT

Bovine trypanosomosis caused by *Trypanosoma vivax*, has a significant negative impact on livestock. Due to the limited information on the immune response against this parasite in ruminants, the present investigation was undertaken with the aim to evaluate and compare the immune response of sheep experimentally infected with two *T. vivax* isolates. The isolates were obtained from different geographic areas of Venezuela (TvLIEM176 from Trujillo State and TvMT1 from Monagas State). Three sheep were inoculated with each isolate and three others were used as controls for a total of nine animals. Every three days (d), during a period of 60 d, blood and serum samples were taken to determine anti-*Trypanosoma spp.* antibodies (by iELISA), parasitemia, white blood cell count and a leukocyte profile. TvMT1-inoculated animals showed higher levels of antibodies than TvLIEM176-infected animals, although parasitaemia behaved inversely. The TvLIEM176 isolate produced higher levels of parasitemia than the TvMT1 isolate. In addition, lymphopenia was observed in TvLIEM176-infected sheep from day 12 to 36 post-infection, while lymphopenia was not shown in TvMT1-infected animals. It was demonstrated that the humoral immune response against both *T. vivax* isolates in sheep was different, which may be related to immunosuppression caused by TvLIEM176 isolate due to production of lymphopenia.

**Key words:** Humoral immune response; antibodies; *Trypanosoma vivax*; sheep.

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis animal causada por *Trypanosoma vivax* es una enfermedad crónica y debilitante del ganado en África y Latinoamérica, la cual puede cursar con fiebre, anemia, pérdida progresiva de peso, desmejoramiento de la condición física, debilidad y problemas reproductivos, conllevando a grandes pérdidas económicas [6, 12, 26]. En Venezuela, *T. vivax* está ampliamente diseminado por todo el territorio nacional, encontrándose una seroprevalencia general de 33,1% [36].

La respuesta inmunitaria del hospedador contra los tripanosomas es considerada muy importante y el patrón de reconocimiento de algunos antígenos parasitarios por el hospedador ha sido relacionado con el control de las ondas parasitéticas [5, 32]. Sin embargo, estos parásitos pueden llegar a producir inmunosupresión en los hospedadores infectados, la cual compromete la habilidad del animal para controlar la enfermedad, y para detener infecciones secundarias [40, 41]. La inmunosupresión es una característica muy bien documentada en la tripanosomosis bovina (*Bos taurus* y *Bos indicus*) [10, 38, 40, 41] y se ha demostrado que resulta en una disminución en la población linfocitaria y en una respuesta deprimida de las funciones de las células T y B. Durante la infección por tripanosomas se ha observado una disminución de la respuesta humoral primaria frente a algunos antígenos, aunado a una disminución de la proliferación de células T y a la secreción de citocinas. A pesar de estas observaciones, no se ha establecido una relación significativa entre la severidad de la enfermedad y la disminución de la respuesta de células B (para antígenos diferentes a los de los tripanosomas) y células T (proliferación y producción de citocinas) en ratones (*Mus musculus*) y bovinos durante las primeras fases de la infección [40, 41].

Algunos tripanosomas liberan un Factor de Tripanosoma Activador de Linfocitos T (TLTF, por sus siglas en inglés) el cual induce que los linfocitos CD8 aumenten la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual ha demostrado ser un factor de crecimiento en algunos de estos parásitos [14, 33]. Además, está involucrado en el aumento de la secreción de prostaglandinas y de óxido nítrico por parte de los macrófagos, los cuales median la supresión de las células T [31, 35, 38], aunque aparentemente esto sucede en las etapas muy tempranas de la infección [1, 22].

En todo caso, la respuesta de anticuerpos a los antígenos del parásito está asociada con la disminución de los mismos [5]. Los hospedadores infectados realizan una respuesta inmunitaria con la consiguiente producción de anticuerpos que eliminan de la sangre a la población de parásitos inmunológicamente dominantes (homotípicos), pero eventualmente reaparecen variables antigénicas y el ciclo continúa [44].

La habilidad del hospedador de controlar la infección depende de varios factores, entre los que se incluyen la virulencia del tripanosoma [17], la composición genética [19], así como también el estado inmunitario del hospedador [34]. Existe evidencia serológica que muestra que aumentos concomitantes de los

títulos de anticuerpos contra el parásito están asociados con un declive en el número de parásitos en sangre [4].

Sin embargo, debido a que la inmunogenicidad puede variar de acuerdo a varios factores, como tamaño (peso molecular), estabilidad estructural, complejidad y que tan extraña sea la molécula para el hospedador [42], la respuesta inmunitaria que se va a desarrollar podría ser diferente en cada caso.

La mayoría de las investigaciones sobre tripanosomas africanos se han enfocado en infecciones de *T. brucei* utilizando modelos murinos para estudiar esta enfermedad en humanos; por otro lado, los estudios sobre tripanosomosis en rumiantes se han centrado principalmente en infecciones de bovinos con *T. congolense*. Además del hecho obvio que los hospedadores bovinos y murinos son diferentes, es importante tomar en cuenta que *T. congolense* y *T. brucei* también son biológicamente distintos. En este mismo orden de ideas, recientemente se develó el transcriptoma completo de *T. vivax* (aislado TvLIEM176), encontrando grandes diferencias de este parásito con otros tripanosomatídeos, sobre todo en cuanto a la composición de la membrana externa del parásito [13]. Al ser los rumiantes en Latinoamérica principalmente afectados por *T. vivax* y debido a la escasa información existente sobre la respuesta inmunitaria contra este parásito en rumiantes, se planificó la presente investigación con la finalidad de evaluar y comparar la respuesta inmunitaria de ovinos (*Ovis aries*) infectados experimentalmente con dos aislados de *T. vivax*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislados de *T. vivax*

Los aislados de *T. vivax* utilizados en este estudio fueron obtenidos de bovinos naturalmente infectados de diferentes áreas geográficas de Venezuela: el aislado TvLIEM176, donado por las Dras. Laura Morón y Glenda Moreno, provino del estado Trujillo (región occidental), y el aislado TvMT1 del estado Monagas (región oriental), tal como fue descrito previamente [11].

### Animales experimentales

Para esta investigación se utilizaron once machos ovinos, adultos, con un peso promedio de aproximadamente 30 kg, clínicamente sanos y negativos para infección por *T. vivax* mediante método serológico (Inmunofluorescencia Indirecta o IFI) y molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR), provenientes del Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Dos de estos animales sirvieron como donadores y los nueve restantes para la evaluación de la respuesta inmunitaria.

A fin de expandir cada uno de los aislados y obtener los parásitos para inocular los animales experimentales, cada donador fue inoculado por vía intravenosa con el contenido de un vial de criopreservado de *T. vivax* (cada animal con un aislado diferente), conteniendo aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  parásitos. Diariamente se hizo un seguimiento de la parasitemia,

determinada según el método del hemocitómetro [43], hasta que ésta alcanzara valores iguales o superiores a  $10^6$  flagelados/mL. En ese momento, se extrajo sangre de los donadores para inocular a los animales experimentales, y posteriormente fueron tratados con diaceturato de diminaceno, vía intramuscular, a una dosis de 3,5 mg/kg de peso vivo.

Previo a la infección experimental, estos nueve animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: tres ovejos fueron inoculados con cada aislado y tres sirvieron como grupo control. Cada animal infectado fue inoculado con  $10^6$  tripanosomas del aislado correspondiente, proveniente de sangre fresca de los donadores. Toda la fase experimental se realizó siguiendo las recomendaciones establecidas en el Código Venezolano de Bioética y Bioseguridad [24], por lo que la vida de los animales nunca estuvo en riesgo. Dos semanas antes (periodo preinfección o PPI) y durante el periodo de infección (60 d), todos los animales fueron mantenidos bajo supervisión veterinaria con la finalidad de salvaguardar su salud y minimizar su sufrimiento, luego de lo cual fueron tratados con diaceturato de diminaceno de manera similar a los donadores.

### Exámenes hematológicos y serológicos

Cada tres d durante el PPI y durante el periodo de infección se obtuvo muestras de sangre y suero de cada animal. Con los sueros, se realizó un ensayo de ELISAI para la determinación de anticuerpos anti *Trypanosoma* spp. de acuerdo a la metodología descrita previamente [28, 29]. Para estimar el punto de corte entre sueros positivos y negativos, se utilizó el protocolo estándar descrito para ello [3], utilizando sueros de ovinos negativos y positivos por IFI como controles negativos y positivos, respectivamente. Los ensayos de ELISAI se hicieron por duplicado para minimizar la variación interensayo. Con la sangre se determinó la parasitemia de acuerdo al método del hemocitómetro [43], además de conteo manual del número total de leucocitos (NTL) y fórmula diferencial mediante frotis sanguíneos coloreados con hemacolor (Merck®, EUA) [18].

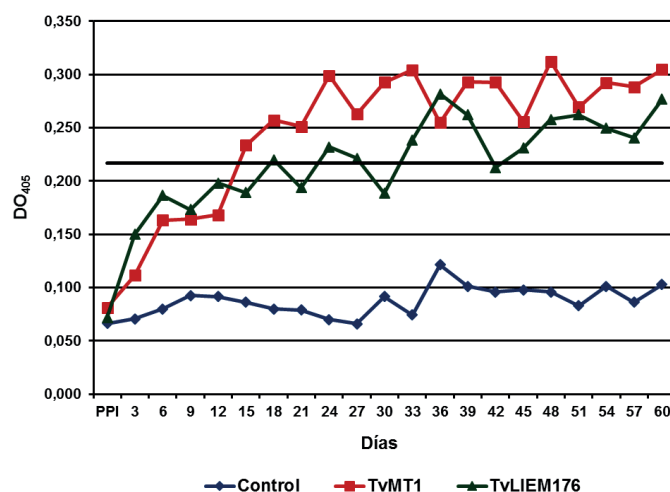
### Análisis de los resultados

El análisis de los resultados fue realizado mediante el Sistema de Análisis Estadístico, versión 9.2, SAS [30]. Los datos de la densidad óptica ( $DO_{(405)}$ ), parasitemia y NTL no difirieron de la distribución normal de acuerdo a las pruebas de Shapiro-Wilk ( $n < 90$ ) y Kolmogorov-Smirnov ( $n > 90$ ; PROC UNIVARIATE NORMAL PLOT). Los datos fueron analizados usando ANOVA de medias repetidas en el tiempo [20, 21]. Para todos los procedimientos, la significancia estadística fue preestablecida a  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

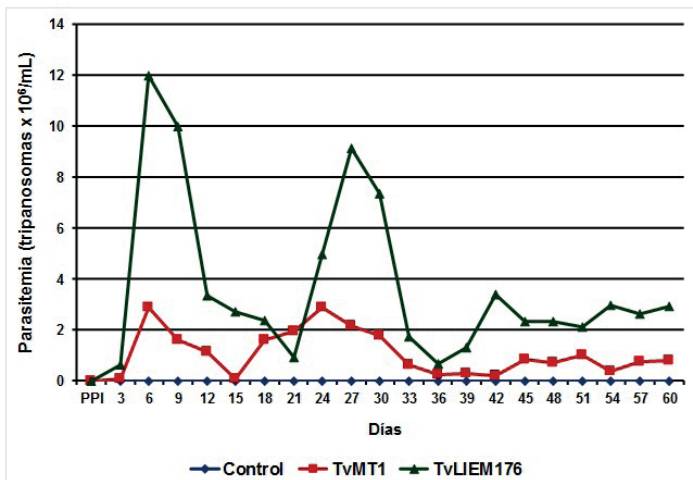
En la realización del ELISAI, se determinó como punto de corte 0,217 para diferenciar los sueros positivos de los negativos. Los resultados de la  $DO_{(405)}$  obtenida para ambos grupos experimentales y el grupo control se muestran en la FIG. 1, donde se observa que en el caso del grupo infectado con el

aislado TvMT1, la  $DO_{(405)}$  aumentó progresivamente hasta el d 24 post infección (PI), sobrepasando el punto de corte en el d 15 PI. Luego de esto, los valores de  $DO_{(405)}$  presentaron variaciones pero nunca estuvieron por debajo del punto de corte. Por otra parte, los animales infectados con el aislado TvLIEM176 se convirtieron en seropositivos a partir del d 18 PI, pero mantuvieron valores de  $DO_{(405)}$  significativamente menores ( $P < 0,001$ ) durante el resto del periodo de infección, comparados con los animales del grupo TvMT1. El grupo control permaneció seronegativo durante todo el periodo experimental.



**FIGURA 1. VARIACIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA ( $DO_{(405)}$ ) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE ELISA EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *T. vivax* (AISLADOS TvMT1 Y TvLIEM176) Y EL GRUPO CONTROL, DURANTE EL PERÍODO PRE Y POST-INFECCIÓN.**

En cuanto a la parasitemia, la FIG. 2 muestra los valores obtenidos durante el período de infección para los grupos inoculados con los aislados TvLIEM176 y TvMT1, observándose que todos los animales infectados desarrollaron parasitemia en el d 3 PI. Los ovejos del grupo TvLIEM176 mostraron un rápido y pronunciado incremento en el número de parásitos llegando a su pico máximo de  $1,2 \times 10^7$  parásitos/mL el d 6 PI. Contrariamente, los animales infectados con TvMT1 presentaron valores de parasitemia significativamente menores ( $P < 0,05$ ), alcanzando su primer pico de  $2,9 \times 10^6$  tripanosomas/mL el d 6 PI. A partir del primer pico, la parasitemia fluctuó en ambos grupos pero mostrando una disminución progresiva. Se observó una considerable variación entre ambos grupos infectados; mientras que la parasitemia en los animales infectados con TvLIEM176 mostró cuatro elevaciones, en los ovejos del grupo TvMT1 solamente se detectaron dos picos inconfundibles (FIG. 2).



**FIGURA 2. VALORES PROMEDIOS DE LA PARASITEMIA (TRIPANOSOMAS x 10<sup>6</sup>/mL) EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *T. vivax* (AISLADOS TvMT1 Y TvLIEM176) Y EL GRUPO CONTROL, DURANTE EL PERÍODO PRE Y POST-INFECCIÓN.**

Los dos aislados de *T. vivax* usados en esta investigación demostraron producir una diferente cinética de la respuesta inmunitaria humoral, al inducir distintos niveles de anticuerpos. Al analizar la relación entre la parasitemia y niveles de anticuerpos (medidos a través de la técnica de ELISAI), se pudo observar que existe una relación inversa entre ambas variables: el aislado con mayores niveles de parasitemia (TvLIEM176) fue el que mostró menor producción de anticuerpos específicos anti-tripanosoma; y por el contrario, el aislado con menos número de parásitos en sangre (TvMT1) fue el que produjo mayor cantidad de anticuerpos. En otras palabras, el aislado TvLIEM176 resultó ser menos inmunogénico que el aislado TvMT1. La inmunobiología de la infección con tripanosomas africanos representa un panorama muy complejo e interesante; en este caso, la respuesta inmunitaria depende de muchos factores y no solamente de la cantidad de antígeno (parasitemia), especialmente cuando se evalúan parásitos que son organismos vivos multiantigénicos. Algunos de estos factores pueden ser la presentación de los antígenos, el tipo de células que entran en el juego para el reconocimiento de estos antígenos y el patrón de liberación de citoquinas, lo cual trae como resultado la respuesta inmunitaria responsable de la eliminación de los parásitos [23]

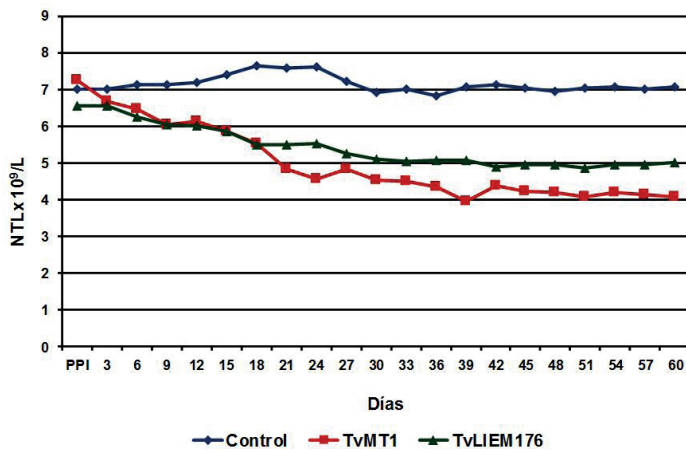
De hecho, los resultados presentados en el presente trabajo coinciden con algunos hallazgos en los niveles de anticuerpos contra diferentes aislados de *T. evansi* [27], donde se ha reportado que no existe una correlación entre los títulos serológicos (medidos a través de IFI) y la dosis de desafío utilizada para infectar ratas (*Rattus norvegicus*) con esta especie. Sin embargo, en estudios sobre infecciones experimentales de ratones con *T. brucei gambiense* [16], los niveles de parasitemia han demostrado ser mucho más afectados por los diferentes patrones de virulencia de los aislados, lo cual podría explicar las

diferencias vistas en el presente estudio. Al igual que *T. evansi*, *T. vivax* es considerado como una especie homogénea [7, 9, 37] considerándose, incluso, que la diversidad genética existente en *T. vivax* es limitada, lo cual es compatible con una reproducción de tipo clonal en el continente americano [9]. A pesar de su homogeneidad, en la presente investigación se observaron diferencias importantes en los patrones de niveles de parasitemia (virulencia) y la respuesta en los niveles de anticuerpos de los dos aislados de *T. vivax* utilizados. Esto pudiera relacionarse con una investigación sobre la morfología comparativa de cinco aislados venezolanos de *T. vivax* (entre ellos, los dos usados en esta investigación), donde se demostró que existía variabilidad y heterogeneidad en el tamaño de los aislados [11]. Por esta razón, no debe descartarse la posibilidad que la variabilidad entre estos aislados afecte los patrones de virulencia y/o patogenicidad y por consiguiente los niveles de anticuerpos producidos por el hospedador.

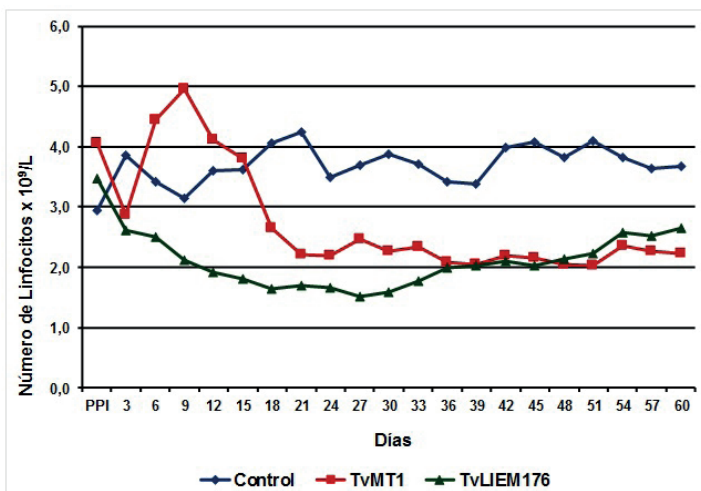
Algunos autores [39] reportan que existe poca evidencia de activación linfocitaria en infecciones experimentales de bovinos con *T. vivax* y *T. congolense*, existiendo una disminución en los niveles de anticuerpos, lo cual podría ser un reflejo del agotamiento de la respuesta inmunitaria policlonal o del estado de inmunosupresión que mantienen los animales infectados. Por su parte, en infecciones de dos cepas diferentes de ratones con *T. brucei rhodesiense*, se ha encontrado que en la cepa de ratones donde se presentaron mayores parasitemias hubo menores títulos de anticuerpos, mientras que en la cepa de ratones donde las parasitemias fueron más bajas, la cantidad de anticuerpos fueron altos durante todo el estudio [8].

En cuanto a los leucocitos, en ambos grupos infectados el NTL disminuyó durante el período de infección (FIG. 3), observándose diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,001$ ) con el grupo control, pero no entre ambos grupos inoculados. El grupo control mostró el NTL dentro de los valores normales de referencia [2] durante todo el período de duración del experimento. No obstante, los animales inoculados con el aislado TvMT1 mostraron una continua disminución en el NTL hasta el d 39 PI, llegando incluso a presentarse leucopenia ( $3,95 \times 10^9$  células/L); sin embargo, en el grupo inoculado con TvLIEM176, el NTL disminuyó desde el d 12 hasta el 51 PI, sin llegarse a presentar leucopenia. En ambos casos, después de registrarse el valor mínimo, hubo una ligera tendencia a la recuperación hasta el final del experimento. El conteo absoluto de linfocitos reveló la presencia de linfopenia (valores por debajo de  $2 \times 10^9$  linfocitos/L) en los animales del grupo TvLIEM176 desde el d 12 al 36 PI; no obstante, en el grupo TvMT1 se demostró un aumento inicial del número de linfocitos (hasta el d 9 PI), luego de lo cual hubo una progresiva reducción hasta el final del período de infección, sin demostrarse linfopenia en ningún momento (FIG. 4).





**FIGURA 3. VALORES PROMEDIOS DEL NÚMERO TOTAL DE LEUCOCITOS (CEL x 10<sup>9</sup>) EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *T. vivax* (AISLADOS TvMT1 Y TvLIEM176) Y EL GRUPO CONTROL, DURANTE EL PERÍODO PRE Y POST-INFECCIÓN.**



**FIGURA 4. VALORES PROMEDIOS DEL NÚMERO TOTAL DE LINFOCITOS (CEL X 10<sup>9</sup>) EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *T. vivax* (AISLADOS TvMT1 Y TvLIEM176) Y EL GRUPO CONTROL, DURANTE EL PERÍODO PRE Y POST-INFECCIÓN.**

Las diferencias descritas en los valores de parasitemia están directamente correlacionadas con los niveles de linfocitos. Aunque en ambos grupos infectados hubo una baja del NTL, no hubo leucopenia significativa en ninguno de los dos grupos. No obstante, se pudo demostrar que el aislado TvLIEM176 produjo linfopenia, hallazgo que no pudo ser detectado en el grupo infectado con el aislado TvMT1. Los bajos niveles de linfocitos pudieran estar relacionados con la inmunosupresión descrita en la tripanosomosis [10, 40, 41]. Es evidente la significancia de un sistema inmunitario funcional en la eliminación de los parásitos de la sangre. El rol de los linfocitos y anticuerpos en la disminución de la parasitemia ha sido establecida con anterioridad en infecciones de ratones con *T. brucei rhodesiense*

[5]. Estos autores reportaron que, a medida que aumentaban los títulos serológicos de anticuerpos contra los tripanosomas, los ratones lograban controlar mejor la parasitemia. Sin embargo, la cinética de aparición de anticuerpos relacionada con el primer pico de parasitemia sugiere que la IgM pudiera ser la responsable de la eliminación de los parásitos. También ha sido reportado que una activación del sistema fagocítico mononuclear por los tripanosomas no tiene un efecto directo en la velocidad de eliminación de los parásitos [41].

Estas diferencias en los niveles de anticuerpos en los animales infectados por ambos aislados, pudieran estar directamente vinculadas con la capacidad de reproducción del parásito (virulencia) y su capacidad de producir inmunosupresión (una expresión de su patogenicidad). Es por ello que el control de la población de los tripanosomas no debe ser analizado solamente desde el punto de vista del hospedador, sino que también las diferencias genómicas y post-genómicas que pudieran existir entre los diferentes aislados deben ser consideradas [11, 25].

Por otra parte, históricamente siempre se ha pensado que el control de las parasitemias es completamente mediado por los anticuerpos anti-VSG (glicoproteínas variables de superficie). Sin embargo, este paradigma ha ido cambiando en vista de nuevos trabajos que demuestran por una parte, que ratones *knockout* (KO) del gen IFN- $\gamma$ , son igualmente susceptibles que ratones inmunodeficientes combinados severos (ratones SCID, por sus siglas en inglés) y por otra parte, estos ratones KO IFN- $\gamma$  presentaron anticuerpos anti-VSG similar a ratones genéticamente intactos [15, 23]. Esto ha permitido postular que la activación de los macrófagos por el IFN- $\gamma$  permite la secreción de factores parasiticidas, tales como las especies reactivas de nitrógeno (RNI por sus siglas en inglés), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que están directamente asociados a la resistencia de ratones a *T. brucei rhodesiense* y este fenómeno es independiente a la cantidad de anticuerpos anti-VSG [23].

Aunque estos estudios [23] no han sido realizados en *T. vivax* se puede inferir que la observación esperada de mayor parasitemia, mayor títulos de anticuerpos, es realmente lo opuesto, debido a que quizás el aislado que logre modular mejor la respuesta inmunológica del hospedador a su favor (en la presente investigación fue TvLIEM176), inhibiendo la producción de los factores tripanolíticos como RNI, TNF- $\alpha$  y ROS, podrá colonizar mejor la sangre del ovino infectado, lo que se pudiera traducir en mayor virulencia.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

En este estudio se demostró que los dos aislados de *T. vivax* utilizados producen diferentes respuesta inmunitaria humoral en ovinos, medida a través de la determinación de los niveles de anticuerpos. El aislado TvLIEM176 produjo una menor producción de anticuerpos a pesar de inducir parasitemias más altas en las infecciones experimentales en ovinos, produciendo además un evidente grado de inmunosupresión. El aislado TvMT1

demonstró producir mayores niveles de anticuerpos y menores parasitemias. Estas diferencias deben ser analizadas a través de análisis genéticos y proteómicos, además de estudios que evalúen la virulencia y patogenicidad de diferentes aislados de *T. vivax*.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (CC-0497-12). Los autores expresan su agradecimiento al Núcleo Universitario Rafael Rangel de la Universidad de los Andes (NURR-ULA) por la donación del aislado TVLIEM176 de *T. vivax* utilizado en este estudio.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BESCHIN, A.; BRYNS, L.; MAGEZ, S.; RADWANSKA, M.; DE BAETSELIER, P. *Trypanosoma brucei* infection elicits nitric oxide-dependent and nitric oxide independent suppressive mechanisms. **J. Leukoc. Biol.** 63: 429-439. 1998.
- [2] BYERS, S.R.; KRAMER, J.W. Normal hematology of sheep and goats. In: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6ta Ed. Wiley-Blackwell Publishing. Iowa, USA. Pp 836-842. 2010
- [3] CROWTHER, J.R. Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. In: Crowther, J. R. (Ed.). **The ELISA guidebook**. 1era Ed. Humana Press. New Jersey, USA: 301-345. 2001.
- [4] DE GEE, A.L.; SHAH, S.D.; DOYLE, J.J. *Trypanosoma vivax*: sequence of antigenic variants in mice and goats. **Exp. Parasitol.** 48: 352-358. 1979.
- [5] DEMPSEY, W.L.; MANSFIELD, J.M. Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. V. Role of antibody and the mononuclear phagocyte system in variant-specific immunity. **J. Immunol.** 130: 405-411. 1983.
- [6] DESQUESNES, M. Pathogenicity, clinical signs and characterisation of livestock trypanosomes in Latin America. **Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America**. OIE. World Organisation for Animal Health, Paris: 23-42. 2004.
- [7] DUFFY, C.W.; MORRISON, L.J.; BLACK, A.; PINCHBECK, G.L.; CHRISTLEY, R.M.; SCHOENEFELD, A.; TAIT, A.; TURNER, C.M.; MACLEOD, A. *Trypanosoma vivax* displays a clonal population structure. **Int. J. Parasitol.** 39(13): 1475-1483. 2009.
- [8] FINERTY, J.F.; GASBARRE, L.; KENDRICK, L.P. Kinetics of immunoglobulin and specific antibody responses of CBA mice infected with *Trypanosoma rhodesiense*. **Parasite. Immunol.** 6(1): 13-22. 1984.
- [9] GARCIA, H.A.; RODRIGUES, A.C.; RODRIGUES, C.M. F.; BENGALY, Z.; MINERVINO, A.H.H.; RIET-CORREA, F.; MACHADO, R.Z.; PAIVA, F.; BATISTA, J.S.; NEVES, L.; HAMILTON, P.B.; TEIXEIRA, M.M. G. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasit. Vectors.** 7: 210. 2014.
- [10] GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. Parasitol.** 28: 229-317. 1989.
- [11] GÓMEZ-PIÑERES, E.; BOADA-SUCRE, A.; BRETANA, A.; CONTRERAS-BRETANA, M.; GARCÍA, F.; REYNABELLO, A. Morfometría comparativa de cinco aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. **Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.** 55(1): 25-33. 2014.
- [12] GONZATTI, M.I.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ASO, P.M.; REYNABELLO, A. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: Magez, S.; Radwanska, M. (Eds.). **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Springer, New York. Pp 261-285. 2014.
- [13] GREIF, G.; PONCE DE LEON, M.; LAMOLLE, G.; RODRIGUEZ, M.; PIÑEYRO, D.; TAVARES-MARQUES, L.M.; REYNABELLO, A.; ROBELLO, C.; ALVAREZ-VALIN, F. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. **BMC Genomics.** 14: 149. doi: 10.1186/1471-2164-14-149. 2013.
- [14] HAMADIEN, M.; LYCKE, N.; BAKHIET, M. Induction of the trypanosome lymphocyte-triggering factor (TLTF) and neutralizing antibodies to the TLTF in experimental african trypanosomiasis. **Immunol.** 96(4): 606-611. 1999.
- [15] HERTZ, C.J.; FILUTOWICZ, H.; MANSFIELD, J.M. Resistance to the African trypanosomes is IFN gamma dependent. **J. Immunol.** 161(12): 6775-6783. 1998.
- [16] HOLZMULLER, P.; BIRON, D.G.; COURTOIS, P.; KOFFI, M.; BRAS-GONÇALVES, R.; DAULOUÈDE, S.; SOLANO, P.; CUNY, G.; VINCENDEAU, P.; JAMONNEAU, V. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. **Microbes Infect.** 10(1): 79-86. 2008.
- [17] INVERSO, J.A.; MANSFIELD, J.M. Genetics of resistance to the African trypanosomes. II. Differences in virulence associated with VSSA expression among clones of *Trypanosoma rhodesiense*. **J. Immunol.** 130(1): 412-417. 1983.
- [18] JAIN, N.C. Hematologic Techniques. In: Jain, N.C. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. Lea & Febiger. 4th Ed. Philadelphia. Pp 20-86. 1986.
- [19] LEVINE, R.F.; MANSFIELD, J.M. Genetics of resistance to African trypanosomes: role of the H-2 locus in determining resistance to infection with *Trypanosoma rhodesiense*. **Infect. Immun.** 34: 513-518. 1981.
- [20] LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. **J. Anim. Sci.** 76: 1216-1231. 1998.

- [21] LITTELL, R.; PENDERGAST, J.; NATARANJAN, R. Tutorial in Bioestatics. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. **Statist. Med.** 19: 1793-1819. 2000.
- [22] MABBOTT, N.A.; COULSON, P.S.; SMYTHIES, L.E.; WILSON, R.A.; STERNBERG, J. African trypanosome infections in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor gene: nitric oxide-dependent and independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. **Immunol.** 94: 476-480. 1998.
- [23] MANSFIELD, J.M.; PAULNOCK, D.M.; HEDBERG, G.M. Bridging Innate and Adaptive Immunity in African Trypanosomiasis. In: Magez, S.; Radwanska, M. (Eds.), **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Springer, New York. Pp 89-114. 2014.
- [24] MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA – FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (MCT-FONACIT). **Código de bioética y bioseguridad**. Caracas, Venezuela. 35 pp. 2002.
- [25] MORRISON, L.J.; MCLELLAN, S.; SWEENEY, L.; CHAN, C.N.; MACLEOD, A.; TAIT, A.; TURNER, C.M. Role for parasite genetic diversity in differential host responses to *Trypanosoma brucei* infection. **Infect. Immun.** 78(3): 1096-1108. 2010.
- [26] OSÓRIO, A. L.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R.; COSTA, S. C. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 103(1): 1-13. 2008.
- [27] QUEIROZ, A.O.; LEGEY, A.P.; XAVIER, S.C.; JANSEM, A.M. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96(7): 965-972. 2001
- [28] RAMÍREZ, J.; IBARRA, V.; CHACÓN, Y.; ELEIZALDE, M.C.; TAVARES, L.; REYNA, A.; LÓPEZ, Y.; MENDOZA, M. Evaluación de la tripanosomosis causada por *Trypanosoma vivax* en bovinos de Laguneta de la Montaña, Estado Miranda. **Rev. Observ. del Conocim.** 2(2): 17-27. 2014
- [29] REYNA-BELLO, A.; GARCÍA, F.A.; RIVERA, M.; SANSÓ, B.; ASO, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. **Vet. Parasitol.** 80: 149-157. 1998.
- [30] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. INSTITUTE (S.A.S.) **System SAS for Windows. Version 9.2**. NT. Cary, NC, USA. 16 pp. 2008.
- [31] SCHLEIFER, K.W.; MANSFIELD, J.M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. **J. Immunol.** 151: 5492-5503. 1993.
- [32] SHAPIRO, S.Z.; MURRAY, M. African trypanosome antigens recognized during the course of infection in N'Dama and Zebu cattle. **Infect. Immun.** 35: 410-416. 1982.
- [33] SHI, M.; PAN, W.; TABEL, H. Experimental African trypanosomiasis: IFN-gamma mediates early mortality. **Eur. J. Immunol.** 33(1): 108-118. 2003.
- [34] SMITH, C.J.; LEVINE, R.F.; MANSFIELD, J.M. Cloning of African trypanosomes in mice immunosuppressed by cyclophosphamide treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 31(6): 1098-1102. 1982.
- [35] STERNBERG, J.; MCGUIGAN, F. Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection. **Eur. J. Immunol.** 22: 2741-2744. 1992.
- [36] SUÁREZ, C.; GARCÍA, F.; ROMÁN, D.; CORONADO, A.; PERRONE, T.; REYNA, A.; PARRA, N. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. **Zoot. Trop.** 27(4): 363-372. 2009.
- [37] TAIT, A.; MORRISON, L.J.; DUFFY, C.W.; COOPER, A.; TURNER, C. M.; MACLEOD, A. Trypanosome genetics: populations, phenotypes and diversity. **Vet. Parasitol.** 181(1): 61-68. 2011.
- [38] TABEL, H.; WEI, G.; BULL, H.J. Immunosuppression: Cause for Failures of Vaccines against African Trypanosomiasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 7(3): e2090. 2013.
- [39] TABEL, H.; LOSOS, G.J.; MAXIE, M.G.; MINDER, C.E. Experimental bovine trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *T. congolense*). III. Serum levels of immunoglobulins, heterophile antibodies, and antibodies to *T. vivax*. **Tropenmed. Parasitol.** 32(3): 149-153. 1981.
- [40] TAYLOR, K.A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? **Int. J. Parasitol.** 28(2): 219-240. 1998.
- [41] TAYLOR, K. A.; MERTENS, B. Immune response of cattle infected with African trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(2): 239-244. 1999.
- [42] TIZARD, I. R. Antigens: Triggers of Adaptive Immunity. In: Tizard, I.R. (Ed.). **Veterinary Immunology**. 9th Ed. Elsevier Saunders, USA: 84-90. 2013.
- [43] VALERA, Z.; PARRA, O.; ALVARADO, M.; BARBOZA, G.; ESCALONA, F.; RAMÍREZ, R. Efecto de la infección experimental con *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos en ovinos. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XV (5): 412-420. 2005.
- [44] WELLHAUSEN, S.R.; MANSFIELD, J.M. Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. III. Loss of lymph node cell responsiveness. **J. Immunol.** 124(3): 1183-1186. 1980.