

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA *IN VIVO* E
IN VITRO EM RATOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Wolkmer

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA *IN VIVO* E
IN VITRO EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
COM *Trypanosoma evansi***

por

Patrícia Wolkmer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA *IN VIVO* E *IN VITRO* EM
RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma
evansi***

elaborada por
Patrícia Wolkmer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Sílvia Gonzalez Monteiro, Dr^a. (UFSM)

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 02 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa aqui a minha gratidão, especialmente:

A Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pelos anos dedicados a orientação, amizade e carinho, pelo aprendizado e apoio em todos os momentos necessários;

A Dr^a. Sílvia Gonzalez Monteiro pela constante co-orientação, pela disponibilização da cepa, do laboratório e biotério para a realização do experimento;

A todos do Laboratório de Análises Clínicas pela ajuda, pela paciência, pela convivência e amizade. Principalmente àqueles que participaram diretamente nesse trabalho: à Carolina Kist Traesel, pelos anos de amizade, convívio e a pela ajuda incondicional nos momentos necessários; à Candice Schmidt, Carina Franciscato, Cássia Bagolin da Silva, Francine Chimelo Paim, Juliana Felipetto Cargnelutti, Marciélen Pagnoncelli e Mauren Emanuelli pela ajuda imensurável prestada, pelo carinho e amizade;

Ao Diretor do Hospital Veterinário Carlos Breno Viana Paim pelo auxílio em todos os momentos solicitados;

A todos do Laboratório de Parasitologia Veterinária, em especial ao Aleksandro Schaefer da Silva pela ajuda prestada e a oportunidade de aprender e trabalhar com esse protozoário;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela formação acadêmica e científica;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

Ao Rogério Ferreira, pelas análises estatísticas;

Ao Prof. Rudi Weiblen pela localização de artigos importantes para a realização deste trabalho;

A todos do Hospital Veterinário Universitário, seus professores e funcionários, e à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização de mais uma grande etapa na minha formação;

As diversas pessoas (alunos e professores) que auxiliaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada;

E principalmente, a todos da minha amada e maravilhosa família pela compreensão, ajuda, apoio e carinho. Em especial ao meu filho pela compreensão dos momentos de ausência e pelos momentos de alegria. Ao Lucas, amor da minha vida pela ajuda, paciência e incentivo. As minhas duas mães, Lucia e Vera, pelo amor e ajuda incondicional.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA *IN VIVO* E *IN VITRO* EM RATOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Trypanosoma evansi*

AUTORA: PATRÍCIA WOLKMER

ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Santa Maria, 02 março de 2009

O presente estudo teve como objetivo avaliar a peroxidação lipídica e a susceptibilidade de eritrócitos a peroxidação *in vitro* como indicadores de danos oxidativos em eritrócitos. Ainda, avaliar a sua participação no desenvolvimento da anemia na fase aguda da infecção por *Trypanosoma evansi* em ratos. Cinquenta ratos Wistar, machos, foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos, sendo: três grupos infectados com tripanossomas - T₂, T₄ e T₆ (n = 10 animais por grupo) e quatro controles não infectados - C₀, C₂, C₄ e C₆ (n = 5 animais por grupo). Os animais foram infectados intraperitonealmente com sangue contendo 10⁶ tripanossomas. O número que compõe o nome do grupo indica o dia em que foi realizada a coleta sanguínea e subsequente eutanásia, assim, o sangue foi coletado por punção cardíaca antes da infecção (dia 0; Grupo C₀) e no 2° (C₂ e T₂), 4° (C₄ e T₄) e 6° (C₆ e T₆) dias após a infecção (dpi). Foram realizadas contagens de eritrócitos, concentração hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), nível de malondialdeído plasmático (MDA) e peroxidação de eritrócitos *in vitro*. Os valores médios dos índices hematológicos reduziram gradativamente nos animais infectados em comparação com o grupo controle. A média de MDA plasmático aumentou significativamente (P < 0,001) no 6° dpi nos animais infectados comparado com o grupo controle e, foi negativamente correlacionada com o Ht (P < 0,001, R² = 0,372). Os valores da peroxidação dos eritrócitos *in vitro* foram maiores no grupo T₄ e T₆ que nos grupos controles (P < 0,01). Ainda, houve correlação positiva com peroxidação eritrocitária *in vitro* e MDA (P < 0,001, R² = 0,414). Os resultados obtidos indicaram que a infecção por *T. evansi* em ratos está associada com o estresse oxidativo, indicada pelo aumento da peroxidação lipídica, e a danos oxidativos na membrana dos eritrócitos, como demonstrado pelo peroxidação *in vitro*. Diante disso, danos oxidativos nos eritrócitos podem ser uma possível causa do desenvolvimento de anemia na infecção aguda por *T. evansi* em ratos.

Palavras-chave: *T. evansi*; anemia; peroxidação lipídica; TBARS; ratos

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

STUDY OF LIPID PEROXIDATION *IN VIVO* AND *IN VITRO* IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: PATRÍCIA WOLKMER
ADVISER: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, March 2nd, 2007

The present study aimed to assess the lipid peroxidation and the susceptibility of erythrocytes *in vitro* peroxidation as indicators of oxidative damage in erythrocytes and its role to the pathogenesis of anemia during the early acute phase of *Trypanosoma evansi* infection in rats. Fifty male Wistar rats were randomly allotted into seven groups: three trypanosome-infected groups (T₂, T₄ and T₆; n = 10 animals per group) and four uninfected controls (C₀, C₂, C₄ and C₆; n = 5 animals per group). Animals from trypanosome-infected groups were intraperitoneally injected with 10⁶ trypanosomes. Blood sample was collected by cardiac puncture before infection (day 0; Group C₀) or on the 2nd (C₂ and T₂), 4th (C₄ and T₄) and 6th (C₆ and T₆) day pos-infection (dpi). The number that follows the group name is referring to the day of the cardiac blood collection. The samples were analyzed for red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) concentration, packed cell volume (PCV), plasma malondialdehyde (MDA) and *in vitro* peroxidation of erythrocytes. The mean values of the hematological indices gradually decreased in infected compared with the control rats. MDA was significantly increased (P < 0.001) on 6th dpi in infected versus controls and was negatively correlated with PCV (P < 0.001; R² = 0.372). The erythrocytes *in vitro* peroxidation values were higher in group T₄ and T₆ than control rats (P < 0.01). There was positively correlation with erythrocytes peroxidation (P < 0.001; R² = 0.414) and MDA. The results of this study indicate that *T. evansi* infection in rats is associated with oxidative stress, indicated by lipid peroxidation, and oxidative damage in erythrocytes membrane, as demonstrated by *in vitro* peroxidation. This may be one of the causes of anemia in acute trypanosomosis.

Keywords: *T. evansi*; anemia; lipid peroxidation; TBARS; rats

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - <i>Trypanosoma evansi</i> . Esquema representativo da microscopia eletrônica do protozoário (VICKERMAN, 1977).	14
Figura 2 - Transmissão e multiplicação na corrente circulatória de tripanossomas (Modificado de GARDINER et al., 1988).	16
FIGURA 3 - Esquema representativo da geração de radicais livres	18
FIGURA 4 - Geração de radicais livres na membrana eritrocitária (GLADWIN et al., 2004).	20

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Parasitemia of peripheral blood: (A) Mean parasitemia during <i>Trypanosoma evansi</i> infection in Wistar rats. The groups were killed on 2 nd (T ₂), 4 th (T ₄) and 6 th (T ₆) day post-infection. (B) Peripheral blood of a rat in 6 th day post-infection with <i>T. evansi</i> . Magnification: 1000x	38
FIGURA 2 - Hematological parameters: (A) red blood cell count; (B) hemoglobin concentration; (C) packed cell volume in <i>T. evansi</i> -infected rats compared whit uninfected controls. * Mean differs significantly (P < 0.001) between groups evaluated in same day post – infection.	39
FIGURA 3 - Red blood cell indices: (A) mean corpuscular volume; (B) mean corpuscular hemoglobin concentration in groups of <i>T. evansi</i> -infected rats compared whit groups uninfected controls. * Mean differs significantly (P < 0.05) between groups evaluated in same day post – infection.	40
FIGURA 4 - Means values of lipid peroxidation of <i>T. evansi</i> -infected rats compared whit uninfected controls (A) TBARS of the plasma and (B) <i>in vitro</i> erythrocyte peroxidation. * Mean differs significantly (P < 0.001) between groups evaluated in same day post – infection.	41

FIGURA 5 - Linear regression analysis of individual infected rats TBARS (plasma malondialdehyde) normalized data and (A) packed cell volume (PVC) and (B) *in vitro* erythrocyte peroxidation.42

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 – REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Trypanosoma evansi</i>	13
2.2 Peroxidação Lipídica (Estresse Oxidativo).....	17

CAPÍTULO 2

3 - ARTIGO CIENTÍFICO	22
1. Introduction	25
2. Materials and methods.....	26
2.1 Experimental animals.....	26
2.2 Trypanosome infection.....	27
2.3 Estimation of parasitemia.....	27
2.4 Blood sampling	27
2.5 Hematological evaluation	28
3. Results	29
4. Discussion	30
5. Acknowledgements.....	33
6. References	34
4 – REFERÊNCIAS.....	43

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um protozoário da secção Salivaria, sendo o primeiro tripanossoma patogênico identificado, em 1880 por Griffith Evans, que encontrou organismos móveis no sangue de cavalos e camelos doentes. Este parasita é o agente etiológico da doença conhecida como “Mal das cadeiras” ou “Surra” em eqüinos. Teve sua origem no continente africano e foi introduzido nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus (HOARE, 1972). É o tripanossoma patogênico de maior distribuição mundial, sendo encontrado no norte e centro do continente africano, sudoeste da Ásia, partes da Europa, América Central e do Sul (LOSOS, 1980).

O *T. evansi* é patogênico para a maioria dos animais domésticos. De maneira geral, os animais mais severamente afetados são os camelos, eqüinos, cães e elefantes asiáticos e os menos suscetíveis são ovinos e caprinos. Entretanto, o grau de patogenicidade desse protozoário apresenta grande variação de acordo com a região e o hospedeiro envolvido. Esta enfermidade é de ocorrência multifatorial, sendo manifestada por elevação na temperatura corporal, a qual está diretamente associada com a parasitemia e o progressivo desenvolvimento de anemia, perda da condição física e fraqueza, podendo ainda ser observadas alterações neurológicas (NGERANWA et al., 1993). Em relato da primeira infecção por *T. evansi* em humanos foi descrito anemia, sinais de déficit sensorial, desorientação, agitação e agressão (JOSHI et al., 2005). A anemia é um achado consistente das infecções por *T. evansi* (SILVA et al., 1995a; CONRADO et al., 2005; HILALI et al., 2006; FRANCISCATO et al., 2007). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem ainda não completamente elucidada das anemias nas tripanossomíases, entre eles podemos destacar a supressão da atividade eritropoiética por depressão da medula óssea; a hemodiluição; a hemólise resultante de fatores imunológicos, ação direta dos parasitas ou produtos por eles liberados (JATKAR; PUROHIT, 1971; ASSOKU, 1975, AUDU et al., 1999). Recentemente, a anemia foi atribuída à enzima sialidase dos tripanossomas que causa danos à membrana dos eritrócitos, tornando esses glóbulos vermelhos mais propensos a fagocitose no sistema reticuloendotelial (SHEHU et al., 2006).

Os radicais livres são quaisquer espécies químicas capazes de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons não pareados, ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Em geral, são instáveis e reagem com diversos compostos e estruturas celulares (ABDALLA, 1993). Por sua vez, os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de reações destas espécies reativas de oxigênio com diversos alvos celulares. A peroxidação lipídica ocorre nas células e tecidos devido a uma produção aumentada de radicais livres e/ou uma falha nos sistemas antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A peroxidação dos fosfolípidos causa um aumento da rigidez e deformidade das membranas das hemácias, que por sua vez aumenta a suscetibilidade destes à hemólise (ONGAJOTH et al., 1996). Os eritrócitos são especialmente susceptíveis ao dano oxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos polissaturados em sua membrana e à alta concentração de oxigênio e hemoglobina, cujo poder do oxigênio é conhecido na geração de radicais livres (AGUIRRE et al., 1998). A ocorrência desses fatores pode contribuir para o desenvolvimento da anemia nos animais infectados por *Trypanosoma* sp.. A peroxidação lipídica na membrana do eritrócito tem sido identificada como um dos fatores importantes na patogênese da anemia em ratos com tripanossomíase aguda por *T. brucei* (IGBOKWE et al., 1994). Além disso, Omer et al. (2007) demonstraram que a infecção por *T. evansi* pode causar estresse oxidativo, contudo não foi correlacionado o aumento da peroxidação lipídica com a doença.

Considerando todas estas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a peroxidação lipídica no plasma e a suscetibilidade dos eritrócitos a peroxidação *in vitro* como indicadores de dano oxidativo do eritrócito e o seu papel no desenvolvimento da anemia durante o início da fase aguda da infecção por *T. evansi* em ratos.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma evansi*

As tripanossomíases são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* sp., que pertencem ao filo Euglenozoa, da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina. A característica principal destes protozoários é a presença de um cinetoplasto localizado na base do flagelo, que contém o DNA mitocondrial (BRUCE, 1911). A subordem Trypanosomatina contém uma única família, Trypanosomatidae, que por sua vez, contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*). Os tripanossomas patogênicos de importância na pecuária estão classificados na seção Salivaria, dos quais apenas o *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* foram encontrados na América do Sul (SILVA et al., 2002).

O *T. evansi*, pertence ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Trypanozoon*. É um protozoário classificado como monomórfico e representado por finos tripomastigotas. As formas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas e o corpo é alongado e achatado. Um flagelo livre está sempre presente. Há uma membrana ondulante bem desenvolvida e a extremidade posterior pode ser arredondada ou afilada (Figura1). Seu tamanho varia de 15-33 µm, com média de 24 µm (HOARE, 1972; SILVA et al., 1995a). O cinetoplasto, quando presente, é pequeno (0,6 µm), tem uma forma de bastonete e geralmente ocupa a porção subterminal ou marginal do corpo. A ausência de cinetoplasto é verificada em grande porcentagem das cepas sul-americanas, sendo que, nas amostras brasileiras de *T. evansi*, o DNA cinetoplástico é totalmente ausente, tanto nos isolados de animais domésticos quanto nos animais selvagens (VENTURA et al., 2000). Nesses casos, o núcleo é localizado mais próximo da extremidade posterior (HOARE, 1972).

A primeira associação da infecção por *T. evansi* e o desenvolvimento de doença foi feita na Índia por Griffith Evans em 1881, que correlacionou a presença destes tripanossomas no sangue de equinos e camelos com a doença observada há séculos. Evans acreditou que a fonte primária da infecção para os animais fosse águas poluídas. Em 1885, foi relatado o mesmo agente no sangue de mulas. No

passado, *T. evansi* foi também denominado *T. equinum*, *T. hippicum* e *T. venezuelense*. No Brasil, a doença causada por *T. evansi* foi inicialmente observada na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, aonde foram relatadas epizootias graves entre os eqüinos da região. Da Ilha de Marajó a doença se espalhou pela América do Sul, estendendo-se pelo Brasil, Guiana-Francesa, Bolívia, Venezuela e Colômbia (HOARE, 1972).

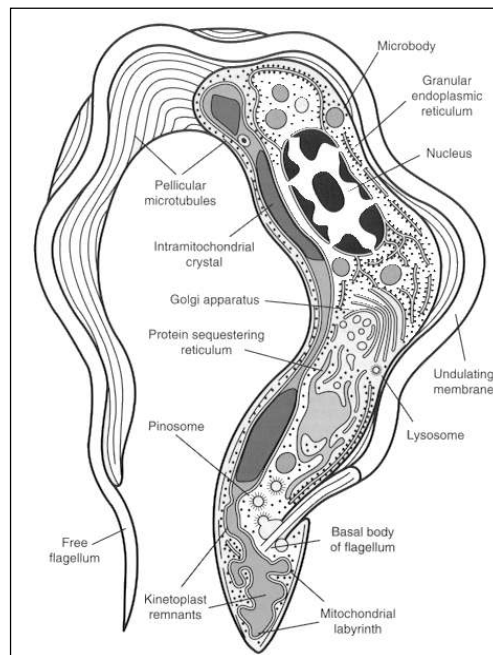


Figura 1 - *Trypanosoma evansi*. Esquema representativo da microscopia eletrônica do protozoário (VICKERMAN, 1977).

O *T. evansi* é o tripanossoma patogênico de maior distribuição mundial encontrado na África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e do Sul. Ele causa uma doença de ampla distribuição geográfica que afeta um grande número de animais domésticos e selvagens. Foi relatado parasitando cavalos, camelos, burros, bovinos, gatos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, quatis, antas, tatus, marsupiais, zebuínos, veados e pequenos roedores silvestres (LEVINE, 1973; SILVA et al., 2002; ATARHOUCHE et al. 2003; HERRERA et al., 2004; FRANCISCATO et al., 2007) e em 2005 foi relatado o primeiro caso de

infecção humana em um fazendeiro, na Índia (JOSHI et al., 2005). No Brasil, esta espécie é encontrada parasitando animais, principalmente no Pantanal Sul Mato-Grossense, onde sua incidência assume um caráter endêmico e acomete principalmente os cavalos. Isso ocorre devido à grande concentração de animais em áreas de terra seca, presença de reservatórios silvestres (principalmente capivaras e quatis) e abundância de vetores (FRANKE et al. 1994; SILVA et al., 1995b; HERRERA et al., 2004). No entanto, surtos ou casos isolados desta tripanossomíase têm sido relatados em diversas regiões brasileiras (FRANKE et al. 1994; SILVA et al. 1995b; BRANDÃO et al., 2002; COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007; ZANETTE et al., 2008).

Este protozoário é transmitido mecanicamente por insetos hematófagos pela inoculação dos tripanossomas através da saliva dos vetores e a sua divisão ocorre por fissão binária (Figura 2; HOARE, 1972). Aparentemente, não ocorre o desenvolvimento cíclico no vetor, onde os tripanossomas permanecem na probóscide. A transmissão mecânica dos hemoflagelados depende diretamente da sobrevivência deles no aparelho bucal dos insetos vetores, sendo a infectividade maior nos primeiros minutos após a alimentação (LOSOS, 1980). Os vetores usuais pertencem aos gêneros *Tabanus* sp., porém insetos dos gêneros *Stomoxys* sp, *Haematopota* sp. e *Lyperosia* sp. podem transmitir o parasita (SILVA 2002). Segundo Silva et al. (1995b) o principal vetor do *T. evansi* no Pantanal Mato-Grossense é o *Tabanus importunus*. Na América Central e do Sul o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é considerado um vetor importante, uma vez que, os tripomastigotas multiplicam-se na corrente circulatória destes animais, os quais podem permanecer infectados por até um mês, atuando como vetor e também hospedeiro do parasita (HOARE, 1972). Ainda, existe a possibilidade de transmissão oral em carnívoros que se alimentam da carcaça de animais infectados (WIESENHUNTER, 1975; RAMIREZ et al., 1979). Experimentalmente foi demonstrado que após a ingestão de sangue e de tecidos infectados os animais tornaram-se agentes transmissores (RAINA et al., 1985; BAZOLLI et al., 2002; SILVA et al., 2007).

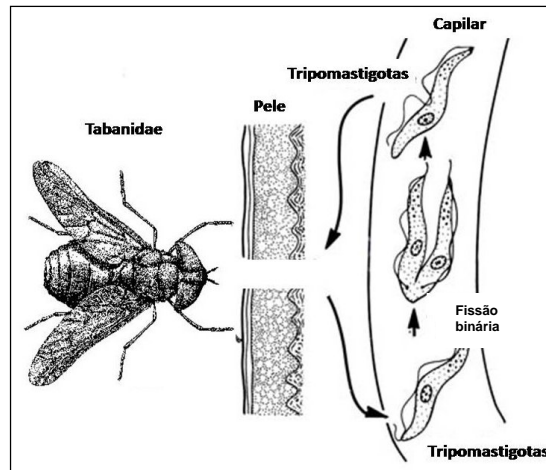


Figura 2 - Transmissão e multiplicação de tripanossomas na corrente circulatória (Modificado de GARDINER et al., 1988).

A maioria dos animais domésticos é susceptível à infecção pelo *T. evansi*, porém o grau de patogenicidade desse protozoário apresenta grande variação de acordo com a região, a virulência da cepa, a suscetibilidade do hospedeiro e as condições epizoóticas (HOARE, 1972). Queiroz et al. (2000; 2001) concluíram que a despeito da homogeneidade das cepas isoladas, existe diferença no padrão de virulência dos isolados. Os tripanossomas multiplicam-se no local da picada, invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando hipertermia e induzindo uma resposta inflamatória (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004). Normalmente, a parasitemia apresenta caráter intermitente, sendo que o seu aumento é acompanhado por respostas febris, seguidas por períodos aparasitêmicos e de normotermia. Os picos de parasitemia ocorrem devido a variações antigênicas na superfície do parasita. Conforme anticorpos são produzidos, há eliminação do clone corrente, mas sucessivos novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta imunológica do hospedeiro (LUCAS et al., 1992).

A fase aguda da infecção por *T. evansi* caracteriza-se pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas. Os animais afetados agudamente podem morrer dentro de semanas ou poucos meses, no entanto, infecções crônicas podem durar anos (BRUN et al., 1998). Durante a fase crônica, ocorre o agravamento dos sinais

clínicos e conseqüentemente identificam-se outros sinais como caquexia, edema, incoordenação motora e paralisia dos membros posteriores (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006). Sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, principalmente em eqüinos, bovinos, veados e búfalos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al. 1997; TUNTASUVAN; LUCKINS 1998; TUNTASUVAN et al. 2003; RODRIGUES et al., 2006).

Uma das principais características desta doença é o desenvolvimento da anemia em animais (JATKAR; PUROHIT, 1971; AQUINO et al., 2002; HERRERA et al., 2002; WOLKMER et al, 2007), mas sua patogênese permanece incerta. Estudos têm sugerido que anemia não ocorre devido à depressão da medula óssea, mas pela destruição dos eritrócitos (JATKAR; PUROHIT, 1971). Assoku (1975) considerou que os mecanismos imuno-mediados eram responsáveis pela anemia na infecção por *T. evansi*, sendo associados ao desenvolvimento de complexos antígeno-anticorpo (AUDU et al., 1999). Recentemente, a anemia foi atribuída à neuraminidase, a qual tornaria esses glóbulos vermelhos mais propensos à fagocitose no sistema reticuloendotelial (SHEHU et al., 2006). Assim, os principais mecanismos que causam anemia são: liberação de hemolisinas e enzimas pelos tripanossomas, que irão induzir lesões diretamente às membranas dos eritrócitos; aumento da fragilidade dos eritrócitos devido ao aumento da temperatura; lesões induzidas pelos antígenos dos tripanossomas que se aderem à superfície dos eritrócitos; adesão dos complexos antígeno-anticorpo às membranas eritrocitárias e dos componentes do complemento aos eritrócitos, que irão promover eritrofagocitose. Este mecanismo leva a retirada dos eritrócitos danificados da corrente sanguínea pelas células do sistema fagocítico mononuclear no baço, medula óssea, pulmões e linfonodos. A hemossiderose extensa e a captura de ferro no citoplasma dos macrófagos podem contribuir para a eritropoiese deficiente (RUE et al., 2000; CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004).

2.2. Peroxidação Lipídica (Estresse Oxidativo)

O oxigênio (O₂) é necessário para inúmeras formas de vida. Sua redução à água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Entretanto, a redução do oxigênio gera subprodutos altamente reativos,

os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídios e ao DNA. Estes subprodutos são as espécies reativas de oxigênio (ERO). Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Figura 3; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As ERO são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, onde estão envolvidas em reações de transferência de elétrons. Na respiração, a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria, durante a passagem pela cadeia respiratória, possibilitando a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa. No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio sofrem redução incompleta, produzindo o radical superóxido ($O_2 \bullet^-$). A partir deste, uma série de reações ocorrem, gerando compostos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\bullet$), o mais reativo e danoso dos radicais formados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

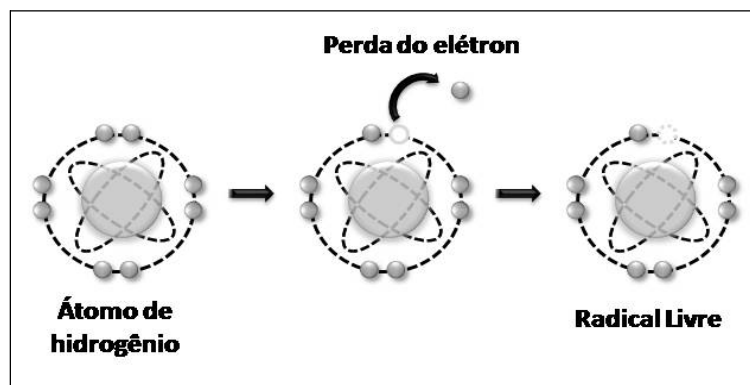


Figura 3 - Esquema representativo da geração de radicais livres

Os ERO são espécies eletrofílicas extremamente reativas que podem reagir com os componentes celulares. São gerados por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como o DNA, os lipídeos e as proteínas. Uma fonte importante desses elétrons são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

As defesas antioxidantes existem para proteger o organismo contra a ação dos radicais livres. Antioxidantes intracelulares incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), bem como a ferritina

(SIES, 1997). Entre as extracelulares encontram-se as transferrinas, as ceruloplasminas, as hemopexinas, as haptoglobinas e as albuminas. O alfa-tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) estão localizados tanto intra como extracelularmente, constituindo-se em agentes antioxidantes importantes para o organismo (KIM et al., 1996). A ausência ou falha na defesa antioxidante permite uma ação mais intensa da peroxidação lipídica, podendo acelerar suas reações prejudiciais à célula (RAO et al., 2000).

As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma porção polar e duas hidrofóbicas. Geralmente, as “caudas” hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, e também no grau de insaturação (ALBERTS et al., 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Quando ocorre um desequilíbrio metabólico, as ERO atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado de peroxidação lipídica. Este mecanismo resulta em modificações nos lipídeos de membrana e esta perde suas características arquitetônicas, tornando-se mais firme e menos flexível. Com isso, criam-se “fendas iônicas” que alteram a permeabilidade da membrana e favorece o fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrólítico leva a ruptura e lise com necrose (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado de mensuração é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; ESTERBAUER, 1993).

A membrana dos eritrócitos é rica em ácidos graxos poliinsaturados, um alvo primário para reações envolvendo os radicais livres, e pode permitir que os eritrócitos sejam vulneráveis a danos oxidativos (MAY et al., 1998; Figura 4). A presença de hemoglobina e ferro, um poderoso catalisador de metal de transição, nos eritrócitos os torna altamente suscetíveis a danos peroxidativos (CLEMENS; WALLER, 1987). A suscetibilidade da hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) em se auto-oxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado. A molécula da hemoglobina, em especial a região não polar que contém o grupo heme, necessita que o ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) para que o mesmo exerça o transporte reversível do oxigênio. Qualquer modificação neste complexo químico que protege o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos íons ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do

grupo heme e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (NAOUM, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Ainda, Weiss & Klausner (1988) demonstraram que os radicais livres também podem modificar a estrutura antigênica da membrana eritrocitária. Essa alteração permite a ligação de imunoglobulinas na membrana eritrocitária, resultando na destruição desta célula.

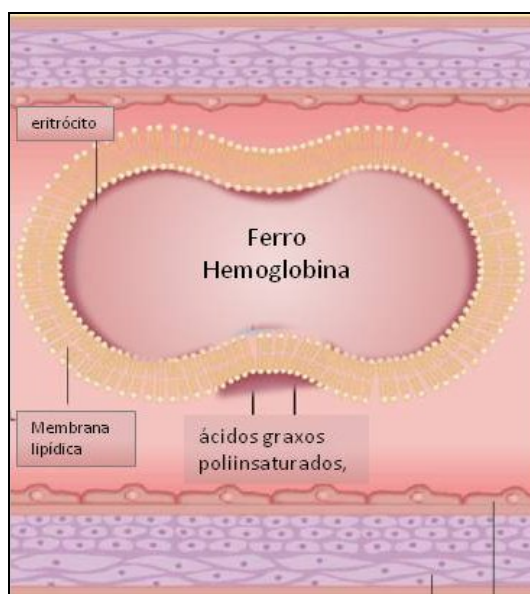


Figura 4 – Membrana do eritrócito.

A peroxidação lipídica é um mecanismo geral pelos quais radicais livres podem induzir danos teciduais, e estão implicados em várias condições patológicas (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Eritrócitos, devido a sua propensão em gerar radicais livres, são células extremamente susceptíveis a danos oxidativos (SATO et al., 1998). Têm-se evidenciado que o dano gerado pelos radicais livres é um componente importante da patogênese da anemia em ratos com infecções parasitárias como tripanossomíase aguda por *T. brucei* (IGBOKWE et al., 1994), cães infectados com *Babesia gibsoni* (CHAUDHURI et al., 2008) e bovinos infectados com *Babesia bigemina* (SALEH, 2009). Além disso, foi relatado que a infecção por *T. evansi* em ratos pode causar aumento na atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase devido à infecção parasitária e produção pelos eritrócitos de ERO e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que aceleram a peroxidação lipídica levando ao estresse oxidativo. Contudo, não foi correlacionado o aumento da peroxidação

lipídica nos animais infectados com a *T. evansi* com as manifestações clínicas da doença (OMER et al., 2007).

CAPÍTULO 2

3 – ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista que será submetido:

Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*

Autores: Patrícia Wolkmer, Aleksandro Schaefer da Silva, Carolina Kist Traesel, Francine Chimelo Paim, Marciélen Pagnoncelli, Juliana Felipetto Cargnelutti, Sílvia Gonzalez Monteiro, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

De acordo com normas para publicação em: Veterinary Parasitology

**Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with
*Trypanosoma evansi***

Patrícia Wolkmer, Aleksandro Schaefer da Silva, Carolina Kist Traesel, Francine Chimelo Paim, Marciélen Pagnoncelli, Juliana Felipetto Cargnelutti, Sílvia Gonzalez Monteiro, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Correspondence to: Patricia Wolkmer

Address: Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, Department of Small Animal Clinical Sciences, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Phone number: +55-55-3220-8814

E-mail address: patiwol@hotmail.com

Abstract

The present study aimed to assess the plasma lipid peroxidation and the susceptibility of erythrocytes *in vitro* peroxidation as indicators of oxidative damage in erythrocytes and its role to the pathogenesis of anemia during the early acute phase of *Trypanosoma evansi* infection in rats. Fifty male Wistar rats were randomly allotted into seven groups: three trypanosome-infected groups (T₂, T₄ and T₆; n = 10 animals per group) and four uninfected controls (C₀, C₂, C₄ and C₆; n = 5 animals per group). Animals from trypanosome-infected groups were intraperitoneally injected with 10⁶ trypanosomes. Blood sample was collected by cardiac puncture before infection (day 0; Group C₀) or on the 2nd (C₂ and T₂), 4th (C₄ and T₄) and 6th (C₆ and T₆) day post-infection (dpi). The number that follows the group name is referring to the day of the cardiac blood collection. The samples were analyzed for red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) concentration, packed cell volume (PCV), plasma malondialdehyde (MDA) and *in vitro* peroxidation of erythrocytes. The mean values of the hematological indices gradually decreased in infected compared with the control rats. MDA was significantly increased ($P < 0.001$) on 6th dpi in infected versus controls and was negatively correlated with PCV ($P < 0.001$; $R^2 = 0.372$). The erythrocytes *in vitro* peroxidation values were higher in group T₄ and T₆ than control rats ($P < 0.01$). There was positively correlation with erythrocytes peroxidation ($P < 0.001$; $R^2 = 0,414$) and MDA. The results of this study indicate that *T. evansi* infection in rats is associated with oxidative stress, indicated by lipid peroxidation, and oxidative damage in erythrocytes membrane, as demonstrated by *in vitro* peroxidation. This may be one of the causes of anemia in acute trypanosomosis.

Keywords: *T. evansi*; anemia; peroxidation; TBARS; rats

1. Introduction

Trypanosoma evansi is a protozoan in the genus *Trypanosoma* that is able to parasitize a significant variety of animals and recently was reported in human (Josh et al., 2005). This protozoan is the agent of trypanosomosis, a disease with wide distribution in Africa, Asia, and Latin America (Lun & Dessler, 1995). One of main characteristics of this disease is the development of anemia in animals (Jatkar & Purohit., 1971; Aquino et al., 1999; Herrera et al., 2002) however, its pathogenesis still remains uncertain. Previously studies have suggested that the anemia was not due to the bone marrow depression, but by destruction of red blood cell (Jatkar & Purohit, 1971). Assoku (1975) considered an immunologically-mediated mechanism responsible for the anemia in *T. evansi* infection and that was associated with the development of antigen-antibody complexes (Audu et al., 1999). Recently the anemia was attributed to the neuraminidase rendering such red blood cells more prone to phagocytosis in the reticuloendothelial system (Shehu et al., 2006).

The phospholipid peroxidation is evaluated by assessment of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) that is probably the most commonly applied method for the measurement of lipid peroxidation (Esterbauer, 1993). The increase in phospholipid peroxidation causes tissue damages and is implicated in several pathological conditions (Halliwell & Chirico, 1993). The red cells are particularly susceptible to oxidative damage due to high concentrations of polyunsaturated fatty acids in membrane, and the high concentrations of oxygen and hemoglobin (Aguirre et al., 1998). The occurrence of these factors can contribute to hemolysis and consequently anemia in animals (Harvey, 1997). The lipid peroxidation in the erythrocytes membrane has been identified as one of the important factors in the

pathogenesis of anemia in parasitic infections as seen in rats with acute trypanosomosis by *T. brucei* (Igbokwe et al., 1994), dogs infected with *Babesia gibsoni* (Chaudhuri et al., 2008), and cattle infected with *Babesia bigemina* (Saleh, 2009), but it is not a mechanism of damage in erythrocytes in the early phase of infection by *T. vivax* in cattle (Igbokwe et al., 1996). Additionally, it was reported that infection with *T. evansi* in rats caused oxidative stress and induced antioxidant enzymes (Omer et al., 2007), but it was not showed the correlation of increase of oxidative stress with the disease.

The objective of the current study was to assess the plasma lipid peroxidation and the susceptibility of erythrocytes *in vitro* peroxidation induced by hydrogen peroxide as indicators of oxidative damage on erythrocytes and its role to the pathogenesis of anemia during the early acute phase of *Trypanosoma evansi* infection in rats.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Fifty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*; 300 - 350g) were housed in a room at a temperature (23°C) and relative humidity controlled (70%). The rats were fed with commercial rat pellets and allowed continuous access to water. The rats were randomly allotted into seven groups. Three trypanosome-infected groups (T₂, T₄ and T₆; n = 10 animals per group) and four uninfected controls (C₀, C₂, C₄ and C₆; n = 5 animals per group). The number that follows the group name is referring to the day of the cardiac blood collection (day 0 = treatment).

This study was approved by the Committee of Ethics and Animal Welfare of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR / UFSM), n°. 23081.0050752/2007-12 in accordance with existing legislation and Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

2.2. Trypanosome infection

Animals of trypanosome-infected groups were intraperitoneally injected with 0.2 ml of rat blood containing approximately 10^6 trypanosomes. The *T. evansi* was originally isolated from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005). This blood stabilate induces an acute infection in rats with a survival period of 4-6 days post-infection (dpi), if not treated.

2.3. Estimation of parasitemia

The presence and degree of parasitemia were determined daily for each animal by blood film examination. A drop of blood was collected from the tail and placed on a slide, and a thin blood smear was prepared manually. The blood films were Romanovsky stained and were examined under the microscope, counting 10 fields at 1000x magnification.

2.4. Blood sampling

Three rats from group T₄ and five rats from group T₆ died during the experimental period. The remaining animals were anesthetized with diethyl ether and a blood sample was collected by cardiac puncture before infection (day 0; Group C₀) or on 2nd (C₂ and T₂), 4th (C₄ and T₄) and 6th (C₆ and T₆) dpi. Blood samples were

collected in two tubes containing anticoagulant, ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin. After the blood collection the animals were decapitated.

2.5. Hematological evaluation

The packed cell volume (PCV) was measured using the standard microhematocrit method (Centimicro mod. 1-15-Sigma, Germany) according to Schalm et al. (1975). The red blood cell count (RBC) and hemoglobin (Hb) concentration were determined by an automated blood cell counter (CC-550-Celm, São Paulo, Brazil). Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated using a standard formula (Schalm et al., 1975). Was prepared blood smear for microscopic examination of blood.

2.6. Lipid peroxidation

Plasma was obtained from the heparinized blood by centrifugation at 2000g at room temperature. Plasma lipid peroxidation was determined by TBARS levels, measured through the absorbance of red product at 535nm according to the method described by Yoshioka et al. (1979) and was expressed in nmoles of malondialdehyde (MDA) per liters.

2.7. *In vitro* erythrocytes peroxidation

The *in vitro* peroxidation of erythrocytes was measured according to the method described by Igbokwe et al. (1994). Washed erythrocytes were incubated in physiological saline containing 1.5% hydrogen peroxide (V/V) and, subsequently, the

by-products of lipid peroxidation were measured spectrophotometrically as TBARS and expressed in absorbance units.

2.8. Statistical analysis

The treatment effect on each dependent variable was analyzed by variance analysis using Mixed Models. When a treatment effect was found on dependent variable the difference between groups was assessed by contrast procedure. The effect of TBARS on PCV and erythrocyte peroxidation was analyzed by linear regression of normalized variables. PCV percentage data were submitted to arcsine transformation. TBARS and erythrocyte peroxidation were normalized by rank and square root transformation, respectively. The analyses were performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ($P < 0.05$). The values are represented as mean \pm standard error mean.

3. Results

3.1. Parasitemia and clinical course of infection

Parasites were observed 1 day post-infection (dpi) in the peripheral blood of all infected animals with a progressively increase in the parasitemia (Fig.1.A). Clinical signs of apathy and weakness were showed 3–4 dpi. Some of the rats also had neurologic signs such ataxia, tremors and terminal coma. Three animals from group T₄ and five animals from group T₆ died during the experimental period. Control groups showed no *T. evansi* and remained clinically healthy during the experimental period.

3.2. Hematological findings

Mean values of the hematological indices were significantly decreased ($P < 0.001$) in infected compared with the control rats. The reduction of RBC, Hb and PCV values are showed in Fig. 2. The analysis of red blood cell indices indicated marked anemia in the infected rats, mainly in group T₆. In the 6th dpi the mean MCV values were higher in infected than the control rats ($P < 0.05$), while the mean MCHC did not show any significant variation (Fig. 3). Was observed a slight degree of anisocytosis and polychromasia on blood smears examination in the animals from group T₆.

3.3. Lipid peroxidation

The plasma TBARS concentration, indicated by MDA concentration, was 1.9 higher in T₆ infected than uninfected (Fig. 4.A; $P < 0.001$). TBARS plasma concentration was negatively correlated ($P < 0.001$) with PCV ($R^2 = 0.372$) as showed in Fig. 5.A.

3.4. Erythrocytes *in vitro* peroxidation values

The mean absorbance units of TBARS produced when the erythrocytes were challenged with hydrogen peroxide is showed in Fig. 4.B. The erythrocyte peroxidation mean was significantly higher in T₄ and T₆ than in control rats ($P < 0.01$). There was a positive correlation ($P < 0.001$) between erythrocytes peroxidation ($R^2 = 0.414$) and TBARS in infected animal (Fig. 5.B).

4. Discussion

Trypanosoma evansi caused an acute infection in the rats. The protozoa are Salivarian trypanosomes that are usually more virulent and pathogenic than

Stercorarian trypanosomes (Menezes et al., 2004). The early detection of parasitemia in rats (24h) was shorter than previously reported in experimental infected rats (Assoku, 1975; Queiroz et al., 2000; Al-Mohammed, 2006; Omer et al., 2007), probably due to high strain pathogenicity. The typical undulating course of parasitemia caused by *T. evansi* was not observed due to short survival period of infected animals. According to Queiroz et al. (2000) *Rattus norvegicus* are a suitable model to study the parasitemic waves of the *T. evansi* infection. Also, there were significant differences in the virulence of isolates according with the original hosts. The disease was characterized by high levels of parasitemia (Fig. 1.B) along the clinical signals of apathy, weakness, ataxia and severe anemia. These are similar to those generally described in acute *T. evansi* infections (Assoku, 1975; Wolkmer et al., 2007).

There were a significant decrease in RBCs, Hb and PCV, while MCV increased and no change in MCHC. The analysis of red blood cells indices indicated marked anemia in the infected rats, first normocytic normocromic and in the group T₆ macrocytic normocromic. Also, it was observed in the blood films anisocytosis, and mild polychromasia in the animals from group T₆, that are suggesting bone marrow regeneration. This is in agreement with previously study from our laboratory with rats infected with *T. evansi* that observed identical results, besides an increase on reticulocyte counting and decrease in myeloid:erythroid ratio (Wolkmer et al., 2007), as well as Assoku (1975) that observed bone marrow hyperplasia and extra-medullar erythropoiesis. The hematological indices decreased at the same time at the parasitemia increased. Usually, the anemia is concurrent with the highest levels of parasitemia (Shehu et al., 2006), and according to Ogbadoyi et al. (1999) the trypanosomes are responsible for the development of anemia, however this

mechanism is not completely elucidated. Trypanosomal sialidase enzyme is one of the main causes of the red cell injury resulting in cell destruction (Shehu et al., 2006).

This study also identified a gradual increase in plasma MDA concentration (Fig. 4.A). The production of oxidative stress and changes in antioxidant enzymes in rats infected by *T. evansi* have been demonstrated with increase in Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH) and glutathione peroxidase (Omer et al., 2007). The increase in the activity of G6P-DH was explained by the finding that during parasitic infection, erythrocytes produce reactive oxygen species (ROS) that enhance lipid peroxidation and activate host cell hexose monophosphate shunt. Also, the oxidative burst products from neutrophils, and activate macrophages produced during trypanosome infections have been showed capacity to initiate a self-propagating reaction of oxidative damage to the polyunsaturated fatty acids components of erythrocytes plasma membrane, leading to cell destruction (Grosskinsky et al., 1983; Murray, 1986; Taiwol et al., 2003). However, the results of this study showed a negative correlation between the increase of TBARS and the PCV values (Fig 5.A) suggesting the increase in lipid peroxidation may be one factor involved in the development of anemia. The lipid peroxidation cause an increase in stiffness and deformity of the red blood cells membrane, which partially increase the susceptibility of hemolysis (Janero, 1990; Harvey, 1997). In conclusion, lipid peroxidation can be, in part, an important factor implicated in the reduction of hematological indices.

When the erythrocytes from the control and infected rats were challenged *in vitro* with hydrogen peroxide, the by-products would be thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; Duthie et al., 1989). The increase production of TBARS by the erythrocytes in the infected rats (Fig. 4.B) is indicating a limited ability of the animals

to prevent the lipid peroxidation in the erythrocytes membrane. The erythrocytes membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, the primary target for reactions involving reactive oxygen species, and may expose the erythrocytes to oxidative damage (May et al., 1998). This was demonstrated by significant positive correlation between erythrocytes peroxidation and TBARS (Fig. 5.B). Infections by *T. Brucei* in mice (Igborkwe et al., 1994), sheep (Taiwol et al., 2003), and *Babesia bigemina* in cattle (Saleh, 2009) have a reduced ability to prevent the lipid peroxidation in the erythrocytes membrane mediated by ROS. In agreement with that, hemolytic response is associated with an intracellular oxidative stress (Cohen & Hochstein, 1964). Also, these oxidative changes in the erythrocytes can accelerate the destruction of these cells in the spleen (Morita et al., 1996).

Our findings indicate that *T. evansi* infection in rats is associated with oxidative stress demonstrated by lipid peroxidation. These oxidative changes reduce the capacity of erythrocytes in infected rats to prevent oxidative damage in erythrocytes membrane *in vivo*, as demonstrated *in vitro*. This may be one of the causes of anemia in acute trypanosomosis.

5. Acknowledgements

This work was supported by Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We are grateful to Rogério Ferreira for statistical analysis and Tatiana Emanuelli for help in the peroxidation techniques.

6. References

- Aguirre, F., Martin, I., Grinspon, D., Ruiz, M., Hager, A., De, T., Paoli, J., Ihlo, J., Farach, H.A., Poole, C. P., 1998. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity and glycemic control in elderly NIDDM patients. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 580–585.
- Al-Mohammed, H.I., 2006. Parasitological and immunological response of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in rats. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 36, 363-371.
- Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Marques, L.C., Castro, M.B., Malheiros, E.B., 1999. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 255–260.
- Assoku, R.K.G., 1975. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. *Int. J. Parasitol.* 5, 137-145.
- Audu, P.A., Esievo, K.A., Mohamed, G., Ajanusi, O.J., 1999. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. *Vet. Parasitol.* 86, 185–190
- Chaudhuri, S., Varshney, J.P., Patra, R.C., 2008. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Res. Vet. Sci.* 85, 120-124.
- Cohen, G., Hochstein, P., 1964. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. *Biochemistry* 3, 895–900.
- Colpo, C.B., Monteiro, S.G., Stainki, D.R., Colpo, E.T.B., Henriques, G.B., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. *Cienc. Rural.* 35, 717-719.

Duthie, G.G., Arthur, J.R., Brewer, P., Kikuchi, Y., Nicol, F., 1989. Increased peroxidation of erythrocytes of stress-susceptible pigs. An improved diagnostic test for porcine stress syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 50, 84-87.

Esterbauer, H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin. Nutr.* 57, 779-785.

Grosskinsky, C.M., Ezekowitz, R.A.B., Berton, G., Gordon, S., Askonsas, B.A., 1983. Macrophage activation in murine African trypanosomiasis. *Infect. Immun.* 39, 1080-1086.

Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 Suppl., 715S–725S.

Harvey, J.W., 1997. The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, fifth ed. Academic Press, London, pp. 157–203.

Herrera, H.M., Alessi, A.C., Marques, L.C., Santana, A.E., Aquino, L.P.C.T., Menezes, R.F., Moraes, M.A.V., Machado, R.Z. 2002. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, in blood biochemical and histopathological changes. *Acta Trop.* 81, 203–210

Igbokwe, I.O., Esievo, K.A., Saror, D.I., Obagaiye, O.K., 1994. Increased susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation in acute *Trypanosoma brucei* infection of mice. *Vet. Parasitol.* 55, 279–286.

Igbokwe, I.O., Umar, I.A., Oimage, J.J., Ibrahim, N.D., Kadima, K.B., Obagaiye, O.K., Saror, D.I., Esievo, K.A., 1996. Effect of acute *Trypanosoma vivax* infection on cattle erythrocyte glutathione and susceptibility to *in vitro* peroxidation. *Vet. Parasitol.* 63, 215–224.

Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 515–540.

Jatkar, P.R., Purohit, M.S., 1971. Pathogenesis of anaemia in *T. evansi* infection. I. Haematology. *Indian Vet. J.* 48, 239–244.

Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., Jannin, J., Truc, P., 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 491–549.

Lun, Z.R., Desser, S.S., 1995. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitol. Today* 11, 131–133.

May, J.M., Qu, Z.C., Mendiratta, S., 1998. Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 281–289.

Menezes, V.T., Queiroz, A.O., Gomes, M.A., Marques, M.A., Jansen, A.M., 2004. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss–Webster mice: distinct aspects of pathogenesis, *Parasitol. Res.* 94, 193–200.

Morita, T., Saeki, H., Imai, S., Ishii, T., 1996. Erythrocyte oxidation inartificial *Babesia gibsoni* infection. *Vet. Parasitol.* 63, 1–7.

Murray, H.W., 1986. Cellular resistance to protozoan infection. *Ann. Rev. Med.* 37, 61–69.

Ogbadoyi, E.O., Ukoha, A.I., Kyewalabe, E.K., 1999. Anemia in experimental African trypanosomiasis. *J. Protozoo. Res.* 9, 55–63.

- Omer, O.H., Mousa, H.M., Al-Wabel, N., 2007. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 145, 142-145
- Queiroz, A.O., Cabello, P.H., Jansen, A.M., 2000. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso–Brazil. *Vet. Parasitol.* 92, 107–118.
- Saleh, M.A., 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. *Res. Vet. Sci.* 86, 43-48
- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975. *Veterinary Hematology*, 3rd ed. 807 pp.
- Shehu, S.A., Ibrahim, N.D.G., Esievo, K.A.N., Mohammed, G., 2006. Neuraminidase (Sialidase) Activity and its Role in Development of Anaemia in *Trypanosoma evansi* Infection. *J. Applied Sci.* 6, 2779-2783
- Taiwo, V.O., Olaniyi M.O., Ogunsanmi, A.O., 2003. Comparative plasma biochemical changes and susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation during experimental *Trypanosome congolense* and *T brucei* infections in sheep. *J. Isreal Vet. Med. Ass.* 58, 435-443.
- Wolkmer, P., Silval, A.S., Cargnelutti, J.F., Costal, M.M., Traesel, C.K.T., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G.M., 2007. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. *Cienc. Rural.* 37, 1682-1687.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M., 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against actived-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135, 372–376.

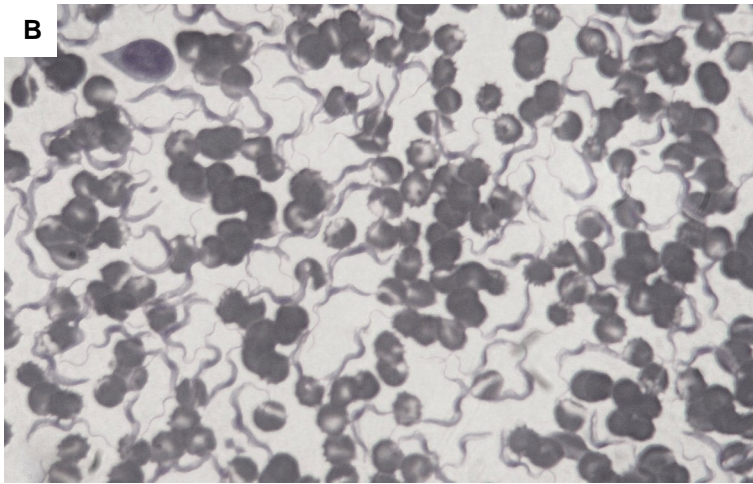
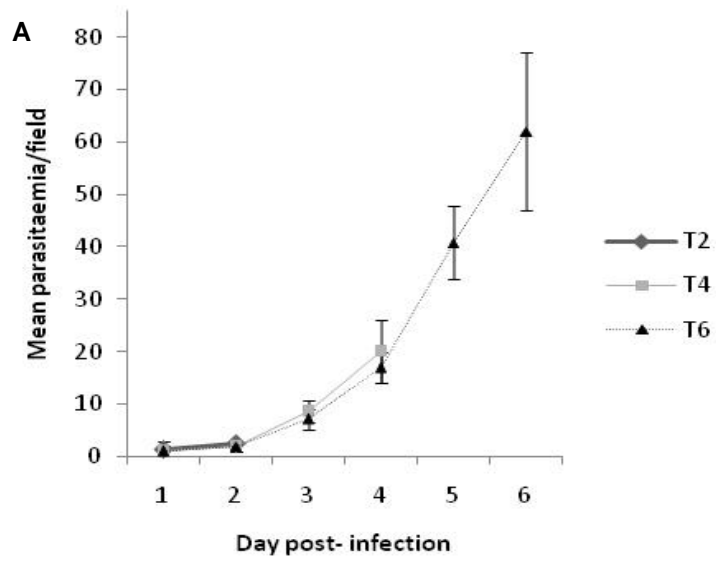


Fig. 1. Parasitemia of peripheral blood: (A) Mean parasitemia during *Trypanosoma evansi* infection in Wistar rats. The groups were killed on 2nd (T₂), 4th (T₄) and 6th (T₆) day post-infection. (B) Peripheral blood of a rat in 6th day post-infection with *T. evansi*. Magnification: 1000x

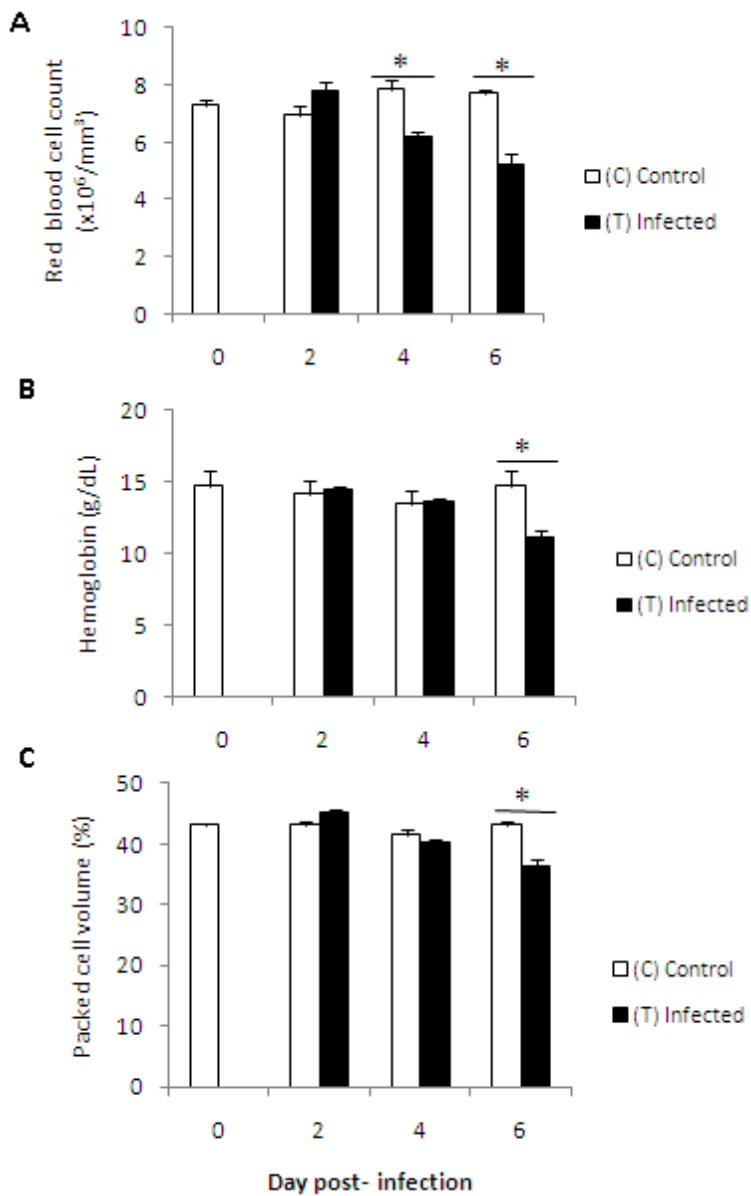


Fig. 2. Hematological parameters: (A) red blood cell count; (B) hemoglobin concentration; (C) packed cell volume in *T. evansi*-infected rats compared with uninfected controls. * Mean differs significantly ($P < 0.001$) between groups evaluated in same day post – infection.

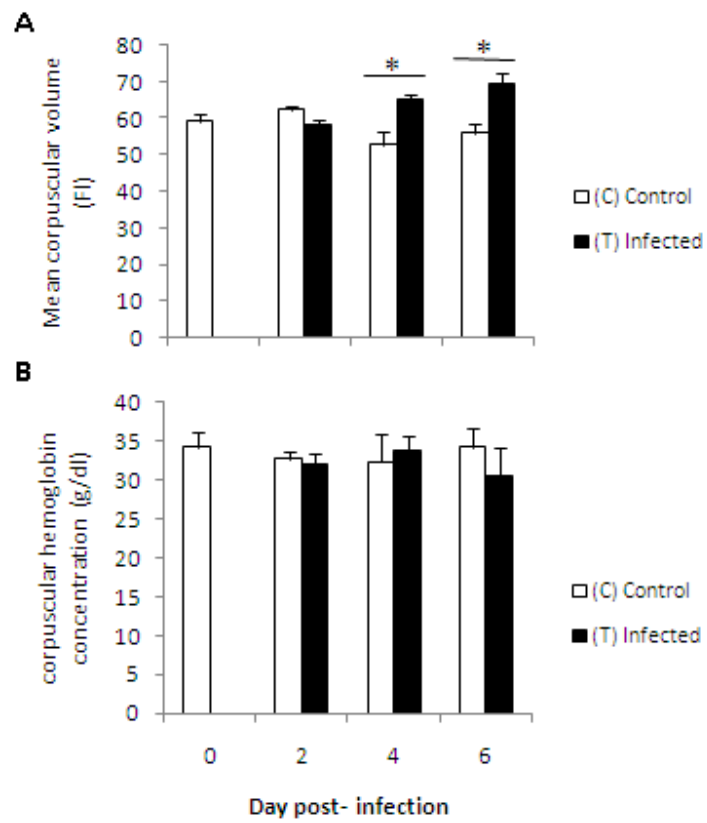


Fig. 3. Red blood cell indices: (A) mean corpuscular volume; (B) mean corpuscular hemoglobin concentration in groups of *T. evansi*-infected rats compared with groups uninfected controls. * Mean differs significantly ($P < 0.05$) between groups evaluated in same day post – infection.

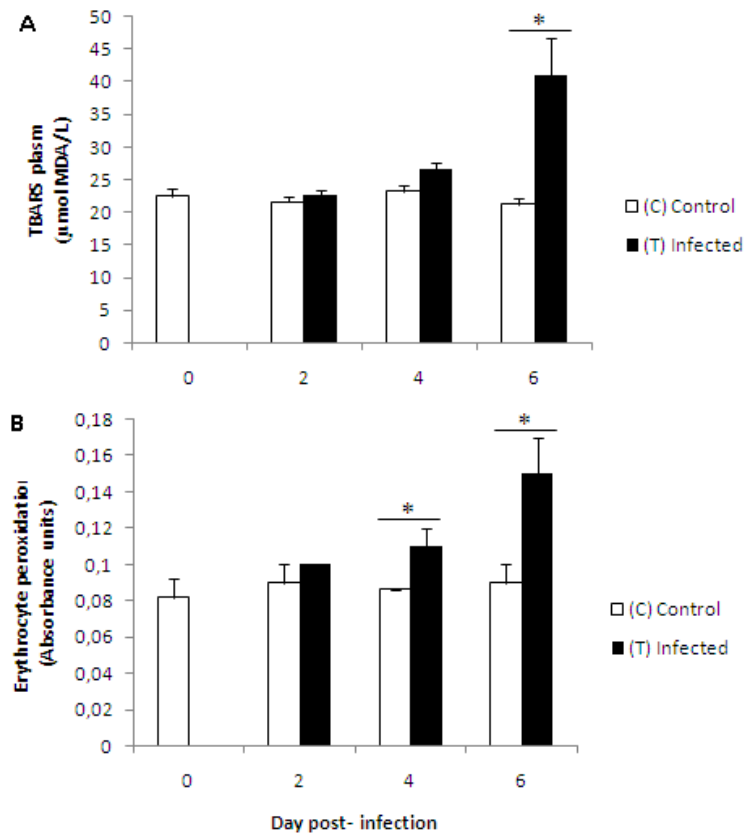


Fig. 4. Means values of lipid peroxidation of *T. evansi*-infected rats compared with uninfected controls (A) TBARS of the plasma and (B) *in vitro* erythrocyte peroxidation. * Mean differs significantly ($P < 0.001$) between groups evaluated in same day post-infection.

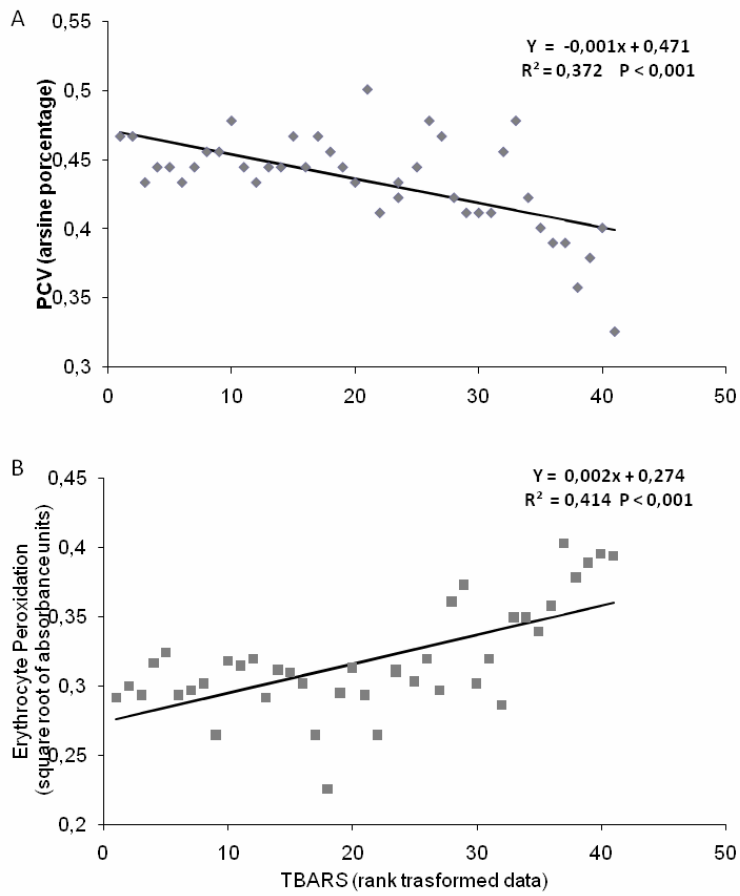


Fig. 5. Linear regression analysis of individual infected rats TBARS (plasma malondialdehyde) normalized data and (A) packed cell volume (PVC) and (B) *in vitro* erythrocyte peroxidation.

4 – REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**, v.26, p.141-164, 1993.
- AGUIRRE, F. et al. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity and glycemc control in elderly NIDDM patients. **Free Radical Biology and Medicine**, v.24, p.580-585, 1998.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 3^a ed, New York & London: Garland Publishing, 1994, 1294 p.
- AL-MOHAMMED, H. I. Parasitological and immunological response of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in rats. **Journal of the Egyptian Society of parasitology**, v.36, p.363-371, 2006.
- AQUINO, L. P. C. T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.255–260, 1999.
- AQUINO, L. P. C. T. et al. Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.1, p.8-18, 2002.
- ASSOKU, R. K. Immunological studies of the mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. **International Journal for Parasitology**, v.5, n.2, p.137-145, 1975.
- ATARHOUCHE T. et al. Camel trypanosomosis in Marocco 1: results of a first epidemiological survey. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.4, p.277–286, 2003.
- AUDU, P. A. et al. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. **Veterinary Parasitology**, v.86, p.185-190, 1999.
- BAZOLLI, R. S. et al. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **Ars Veterinária**, v.18, n.2, p.148-152, 2002.
- BRANDÃO, J. P. et al. Natural infection by *Trypanosoma evansi* em dog - Case report. **Clínica Veterinária**, n.36, p.23-26, 2002.
- BRUCE, D. The Morphology of *Trypanosoma evansi* (Steel). **Proceedings of the Royal Society of London**, v.84, n.570, p.181-187, 1911.
- Brun R.; Hecker H.; Lun Z. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v.79, p.95-107, 1998.
- CHAUDHURI, S.; VARSHNEY, J. P.; PATRA, R. C. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally

infected with *Babesia gibsoni*. **Research in Veterinary Science**, v.85, p.120-124, 2008.

CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.251–268, 1987.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, v.3, p.895–900, 1964.

COLPO, C. B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.717-719, 2005.

CONNOR, R. J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v.1. cap.12, p.251-296.

CONRADO, A. C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.928-931, 2005.

DUTHIE, G. G. et al. Increased peroxidation of erythrocytes of stress-susceptible pigs. An improved diagnostic test for porcine stress syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.84-87, 1989.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.779-785, 1993.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FRANCISCATO, C. et al. Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.288-291, 2007.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigation on naturally occurring *T. evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v.58, p.159-69, 1994.

GARDINER, C. H.; FAYER R.; DUBEY J. P. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues**. Washington: Agriculture Handbook, 1988, p. 3.

GROSSKINSKY, C.M., et al. Macrophage activation in murine African trypanosomiasis. **Infection and Immunity**. v.39, p.1080-1086, 1983.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715–725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.ed. New York: Clarendon Press, 2007, p.880.

HARVEY, J. W. The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, fifth ed. Academic Press, London, p.157–203, 1997.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.263-275, 2004.

HERRERA, H. M. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta Tropica**, v.81, n.3, p.203-210, 2002.

HILALI, M. et al. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.237-243, 2006.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. 749p.

IGBOKWE, I. O. et al. Increased susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation in acute *Trypanosoma brucei* infection of mice. **Veterinary Parasitology**, v.55, n.4, p.279-286, 1994.

IGBOKWE, I.O. et al. Effect of acute *Trypanosoma vivax* infection on cattle erythrocyte glutathione and susceptibility to *in vitro* peroxidation. **Veterinary Parasitology**, v.63, n.3-4, p.215-224, 1996.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**. v.9, p.515-540, 1990.

JATKAR, P. R.; PUROHIT M. S. Pathogenesis of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. I. Haematology. **Indian Veterinary Journal**, v.48, n.3, p.239-244, 1971.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997, 368 p.

JOSHI, P. P. et al. Human Trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The First Case Report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.3, p.491-495, 2005.

KIM, J. D. et al. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, p.83-88, 1996.

LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973, 406 p.

LOSOS, G. J. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. **Veterinary Research Communications**, v.4, p.165-81, 1980.

LUCAS, S. **Pathology of tropical infections**. In: MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. Oxford textbook of pathology. New York: Oxford University Press, 1992, v.2b, cap.29, p.2187-2265

LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v.11, p.131–133, 1995.

MAY, J. M.; QU, Z. C.; MENDIRATTA, S. Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.349, p.281–289, 1998.

MENEZES, V. T. et al. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss–Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. **Parasitology Research**, v.94, p.193–200, 2004.

MORITA, T. et al. Erythrocyte oxidation in artificial *Babesia gibsoni* infection. **Veterinary Parasitology**, v.63, p.1–7, 1996.

MURRAY, H.W.: Cellular resistance to protozoan infection. **Annual Review of Medicine**, v.37, p.61–69, 1986.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.18, p.75–81, 1996.

NGERANWA, J. J. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* in small east African goats. **Research Veterinary Science**, v.54, n.3, p.283–289, 1993.

OGBADOYI, E.O., UKOHA, A.I, KYEWALABE, E.K. Anemia in experimental African trypanosomiasis. **Journal of Protozoal Research**. v.9, p.55–63, 1999.

ONGAJOOTH, L., et al. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidant enzymes in chronic renal disease patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v.79, n.12, p.791–800, 1996.

OMER, O. H. et al. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.1–2, p.142–145, 2007.

QUEIROZ, A. O. et al. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso – Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.107–118, 2000.

QUEIROZ, A. O. et al. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distincts isolates of *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.965–972, 2001.

RAINA, et al. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.67–69, 1985.

RAMIREZ, L. E.; WELLS, E. A.; BETANCOURT, A. La tripanosomiasis in los animales domesticos em Colombia. Colombia: **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, 1979.

RAO, G. M. et al. Lipid peroxidation in brain tumours. **Clinica Chimica Acta**, v.302, p.205–211, 2000.

RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.239-249, 2006.

RUE, M. L. et al. Leucocyte and reticulocytes counts in acute infection of dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 42, p. 163-166, 2000.

SALEH, M. A. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. **Research in veterinary science**, v.86, p.43-48, 2009.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical induced hemolysis of human erythrocytes: II. Hemolysis by lipid soluble radical initiator. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.21, p.250–256, 1998.

Schalm, O.W., Jain, N.C., Carrol, E.J. 3rd ed. **Veterinary Hematology**, 1975, 807 p.

SHEHU, S. A. et al. Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. **Journal of Applied Sciences**, v.6, n.13, p.2779-2783, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SILVA, A. S. et al. Oral infection by *Trypanosoma evansi* in rats and mice. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p., 2007.

SILVA, R. A. M. S. et al. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, v.25, p.223-238, 1995a.

SILVA, R. A. M. S.; BARROS, A. T. M.; HERRERA, H. M. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. **Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v.4, p.315-319, 1995b.

SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax***: **Biologia, Diagnóstico e controle**, Corumbá : Embrapa Pantanal 2002. 141p.

TAIWO, V. O.; OLANIYI M. O.; OGUNSANMI A. O. Comparative plasma biochemical changes and susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation during experimental *Trypanosome congolense* and *T. brucei* infections in sheep. **Israel Journal of Veterinary Medicine Association**, v.58, p.435-443, 2003.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3^a ed, London: Taylor & Francis, 2000, 394p.

TUNTASUVAN D. & LUCKINS A.G. 1998. Status of Surra in Thailand. **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology**. v.21, p.1-8.

TUNTASUVAN D., et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v.110, p.227-233, 2003.

TUNTASUVAN D., SARATAPHAN N. & NISHIKAWA H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.357-363, 1997.

VENTURA, R. M. et al. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. **Journal of Parasitology**, v.86, p.1289-1298, 2000.

VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, v.273, p.613-617, 1978.

WEISS, D. J.; KLAUSNER, J. S. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. **Veterinary Parasitology**, v.25, n.6, p.450-455, 1988.

WIESENHUTTER, E. *Trypanosoma evansi* infections of dogs in Malaysia and considerations of their epidemiology. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.6, p.445, 1975.

WOLKMER, P. et al. Resposta eritropoética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1682-1687, 2007.

YOSHIOKA, T. et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.135, p.372-376, 1979.

ZANETTE, et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em eqüinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1468-1471, 2008