

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

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR
*Trypanosoma evansi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francine Chimelo Paim

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR
*Trypanosoma evansi***

Francine Chimelo Paim

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

2011

**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

**CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi***

elaborada por
Francine Chimelo Paim

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Félix Hilário Diaz González, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por todos os ensinamentos ao longo dos anos e principalmente, pelo carinho e amizade;

A Dr^a. Cinthia Melazzo Mazantti e a Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro pela co-orientação e auxílio neste trabalho;

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, principalmente aos meus colegas: Cássia Bagolin da Silva, Márcio Machado Costa e Patrícia Wolkmer pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, pela amizade e pelo carinho;

A todos do Laboratório de Parasitologia Veterinária, principalmente ao Aleksandro Schaefer da Silva pelo auxílio neste trabalho;

A Dr^a. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte pela disposição e ajuda durante o experimento;

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

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

E principalmente, a todos da minha família pelo apoio. Aos meus pais, pelo incentivo, carinho e amor incondicional. E ao meu namorado Felipe, pela paciência, ajuda e amor.

RESUMO

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

CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi*

AUTORA: FRANCINE CHIMELO PAIM
ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, 28 fevereiro de 2011

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias interferon-gama (INF- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) em ratos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi* e estabelecer uma correlação com os parâmetros hematológicos. Setenta e seis ratos (Wistar) machos foram divididos em dois grupos experimentais. O Grupo C (controle) foi composto por vinte e oito ratos não inoculados distribuídos em quatro subgrupos com sete animais cada (C3, C5, C10 e C20), que receberam 0,2 mL de solução fisiológica pela via intraperitoneal. O grupo T (infectados) formado por quarenta e oito ratos inoculados intraperitonealmente com sangue criopreservado, contendo 1×10^6 tripomastigotas de *T. evansi* por animal. Destes, oito morreram entre o 5º e 7º dia pós-infecção. Os animais restantes foram divididos em quatro subgrupos de dez animais cada (T3, T5, T10 e T20) de acordo com o grau de parasitemia. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, nos dias 3 (C3, T3), 5 (C5, T5), 10 (C10, T10) e 20 (C20, T20) pós-infecção (pi) para a realização do hemograma e determinação dos níveis séricos de INF- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 pela técnica de ELISA tipo sanduíche. Imediatamente após as coletas os animais eram submetidos à eutanásia. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias aumentaram significativamente ($P < 0,01$) nos animais infectados em relação ao grupo controle. A infecção por *T. evansi* em ratos provocou um aumento nos níveis séricos de INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 e esse aumento foi observado durante toda a infecção experimental. Além disso, o aumento nos níveis de citocinas foi diretamente correlacionado com a parasitemia e o desenvolvimento da anemia. Estes resultados sugerem um sinergismo entre essas citocinas contribuindo para o desenvolvimento da anemia e regulação da resposta imune contra o parasito.

Palavras-chave: INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, ratos, tripanossomoses.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

PRO- INFLAMMATORY CYTOKINES IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: FRANCINE CHIMELO PAIM
ADVISER: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, March 28th, 2011

The aim of this study was to measure the levels of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) in serum of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi* and to correlate with the hematological parameters. Seventy-six rats (Wistar) were divided into two groups. Group C (control) composed of twenty-eight non-inoculated rats distributed in four subgroups with seven animals each (C3, C5, C10 and C20), which received 0.2 mL saline by intraperitoneally. The group T (infected) formed of forty-eight rats was inoculated intraperitoneally with cryopreserved blood containing 1×10^6 trypomastigotes per animal. These, eight animals died between 5th -7th days post-infection. The remaining animals were divided into four subgroups with ten animals (T3, T5, T10 and T20) according to parasitemia degree. The blood samples were collected by cardiac puncture at the day 3 (C3, T3), 5 (C5, T5), 10 (C10, T10) and 20 (C20, T20) post infection (pi) to perform the complete blood count and determination of IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6 levels using an ELISA quantitative sandwich. Immediately after collection the animals were euthanized. The levels of all measured cytokines increased significantly ($P < 0.01$) in infected animals compared to the controls. *T. evansi* infection in rats caused an increase in serum IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6 and this increase was observed during the whole experimental infection. In addition, the increase in the cytokine levels was concomitant and directly correlated with parasitemia and anemia development at the parasitemia peak. These results suggest a synergism between these cytokines contributing to the development of anemia and the regulation of the immune response against the parasite.

Keywords: INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, rats, trypanosomosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados, em microscopia de luz, coloração panótico rápido e aumento de 1000x..... 14
- Figura 2 – Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi*. 15
- Figura 3 – Esquema da produção das citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas..... 18

CAPÍTULO II

- Fig. 1 – Parasitemia of peripheral blood. Mean parasitemia of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection.40
- Fig. 2 – Red blood cells parameters of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) packed cell volume, (B) red blood cell count and (C) hemoglobin concentration.41
- Fig. 3 – White blood cells parameters of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) Number of total leukocytes; (B) Number of total neutrophils; (C) Number of total lymphocytes.42
- Fig. 4 – Serum levels of proinflammatory cytokines of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) Interferon-gamma, (B) Tumor necrosis factor alpha, (C) Interleukin 1, (D) Interleukin 6.43

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO II

Table 1 Hierarchical multiple linear regression (steps 1 and 2) and stepwise (step 3) to reduce the packed cell volume (dependent variable) in rats experimentally infected with <i>T. evansi</i>	44
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1 - INTRODUÇÃO	11
2 - REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Trypanosoma evansi</i>	13
2.2 Citocinas pró-inflamatórias	17
CAPÍTULO II	21
3 - ARTIGO CIENTÍFICO	21
1. Introduction	24
2. Material and Methods.....	25
2.1. Experimental animals	25
2.2. Group and trypanosome infection	25
2.3. Estimation of parasitemia	26
2.4. Blood sampling.....	26
2.5. Hematological evaluation	27
2.5. Cytokines.....	27
2.6. Statistical analysis	27
3. Results	28
3.1. Parasitemia and clinical course of infection.....	28
3.2. Hematological findings	28
3.3. Cytokines.....	28
3.4. Multiple linear regression (MLR) analysis.....	29
4. Discussion	29
References	34
4 – CONCLUSÃO	45
5 - REFERÊNCIAS	46

CAPÍTULO I

1 - INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um protozoário hemoflagelado de ampla distribuição mundial, relatado na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul. Diferentes espécies de animais podem se infectar por este parasito, como: camelos, cavalos, burros, zebuínos, bovinos, caprinos, suínos, cães, elefantes, capivaras, quatis, antas, veados, coelhos e o homem (SILVA et al., 2002; JOSHI et al., 2005; SILVA et al., 2007). Humanos são considerados refratários à infecção por *T. evansi* (KUBIAK & MOLFI, 1954), entretanto Joshi et al. (2005) relataram o primeiro caso de infecção pelo parasito em um fazendeiro na Índia.

Os principais sinais clínicos manifestados nesta enfermidade são: febre, anemia, perda de peso, letargia, edema de membros pélvicos e alterações hemostáticas. A doença em equinos é conhecida popularmente como “Mal das cadeiras” ou “Surra” devido às alterações locomotoras e neurológicas desenvolvidas nos animais infectados como incoordenação motora e paralisia de membros pélvicos (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

A transmissão do *T. evansi* ocorre por meio de vetores, principalmente insetos hematófagos (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp.) (SILVA et al., 2002). Ao atingir o sistema linfático, o protozoário estimula a produção de células B e T gerando uma resposta imune contra o parasito dependente do componente de superfície do parasito (glicoproteína variante de superfície – VSG) (SILVA et al., 2002; TAYLOR & AUTHIÉ, 2004). Assim, nas tripanossomoses o sistema imune realiza a ativação de diferentes células e mediadores inflamatórios buscando o controle da infecção, entre estes mediadores estão as citocinas.

As citocinas são glicoproteínas que promovem a indução e/ou regulação da resposta imune. Os antígenos do parasito ativam a produção de interferon-gama (IFN- γ), feita principalmente pelas células *natural killer* (NK) e por linfócitos T. O IFN- γ por sua vez, tem como principal função a ativação dos macrófagos para a síntese das citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), que desempenham papéis-chave no processo de replicação do parasito, bem como na resposta imune do hospedeiro (PAULNOCK & COLLIER, 2001; GAO & PEREIRA, 2002;

MAGEZ et al., 2007). Ainda, as citocinas também estão associadas à atividade supressora da eritropoiese (CAÇANDO & CHIATTONE, 2002) e podem atuar na anemia associada à inflamação (NOYES et al., 2009).

Ao contrário de outras tripanossomoses, informações sobre os mecanismos imunológicos que desempenham papel na infecção por *T. evansi* são limitadas. Não há dados referentes aos níveis séricos de citocinas inflamatórias INF- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 em animais infectados. O objetivo deste estudo foi fornecer informações sobre os níveis séricos dessas citocinas em ratos experimentalmente infectados por *T. evansi* e estabelecer uma correlação com os parâmetros hematológicos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma evansi*

As principais espécies patogênicas de *Trypanosoma* em animais domésticos são *T. evansi*, *T. equiperdum* e *T. brucei*, sendo a primeira mais amplamente distribuída geograficamente, ocorrendo na África, Ásia, Europa, América Central e do Sul (SILVA et al., 2002). O *T. evansi* foi o primeiro tripanossoma patogênico descoberto em 1880 por Griffith Evans, que encontrou organismos móveis no sangue de cavalos e camelos doentes (MAUDLIN et al., 2004). Em equinos a doença é conhecida no Brasil como “Mal das Cadeiras” devido à paralisia de membros pélvicos e incoordenação motora desenvolvida pelos animais infectados (HERRERA et al., 2004).

A região do Pantanal sul-mato-grossense é considerada área endêmica de tripanossomose, afetando principalmente equinos. 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). O relato de animais infectados por *T. evansi* no Rio Grande do Sul é recente, em cães (COLPO et al., 2005, FRANCISCATO et al., 2007) e equinos (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; MORAES et al., 2007), o surgimento de casos no sul da América do Sul sugere que maiores estudos sobre o agente e a doença, bem como diagnóstico devem ser aprofundados em áreas não endêmicas desta enfermidade.

O *T. evansi* é um protozoário hemoflagelado da seção Salivaria que pertence ao filo Euglenozoa, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Trypanozoon* (VICKERMAN, 1978). Este parasito é geralmente monomórfico, tendo um pequeno cinetoplasto subterminal. Entretanto, existem formas acinetoplásticas em que o DNA cinetoplástico circular é ausente. Estes exemplares são encontrados em cepas silvestres como resultados de mutação ou após tratamento com tripanocidas (aceturato de diminazeno). Formas acinetoplásticas também são reportadas após longo tempo em cultura *in vitro* e criopreservação (ZWEYGARTH et al., 1990). As cepas brasileiras são comprovadamente acinetoplásticas (VENTURA et al., 2000). 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 (Figura 1). Seu tamanho varia de 15 a 33 μm , com média de 24 μm (HOARE, 1972).

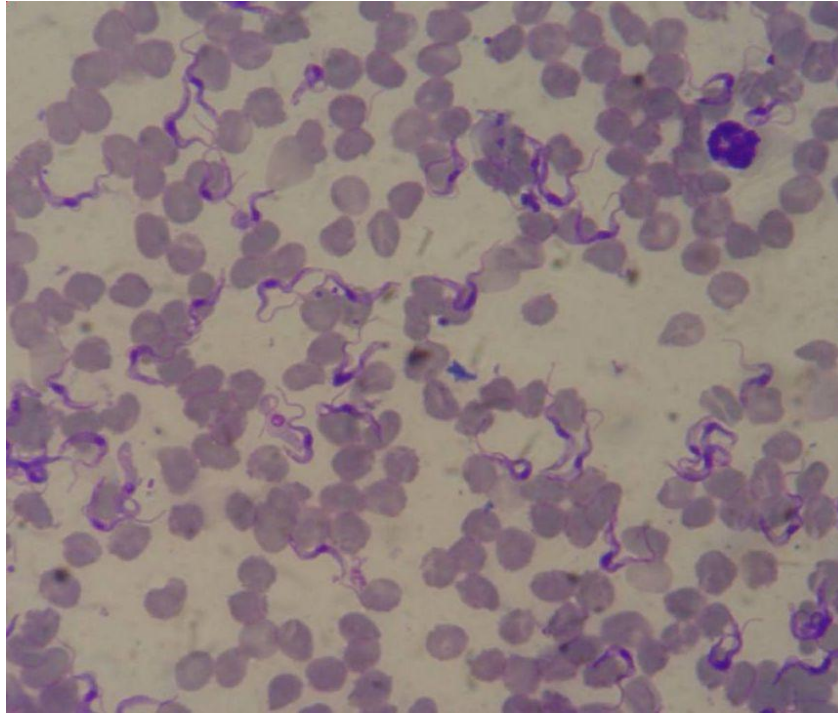


Figura 1 – Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados, em microscopia de luz, coloração panótico rápido e aumento de 1000x.

O *T. evansi* 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). A transmissão ocorre principalmente através de vetores tabanídeos (*Tabanus* sp., *Crysops* sp. e *Hematopota* sp.). Insetos dos gêneros *Stomoxys* sp., *Haematopota* sp. e *Lyperosia* sp. também podem transmitir a doença (SILVA et al. 2002). Além disso, a transmissão pode ocorrer iatrogenicamente por agulhas contaminadas com sangue infectado. Na América do Sul, o *T. evansi* também pode ser transmitido por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), onde os parasitas podem se multiplicar e sobreviver por um longo período. Dessa maneira, morcegos hematófagos atuam tanto como vetores quanto como reservatórios (HOARE, 1972; URQUHART et al., 1996). 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).

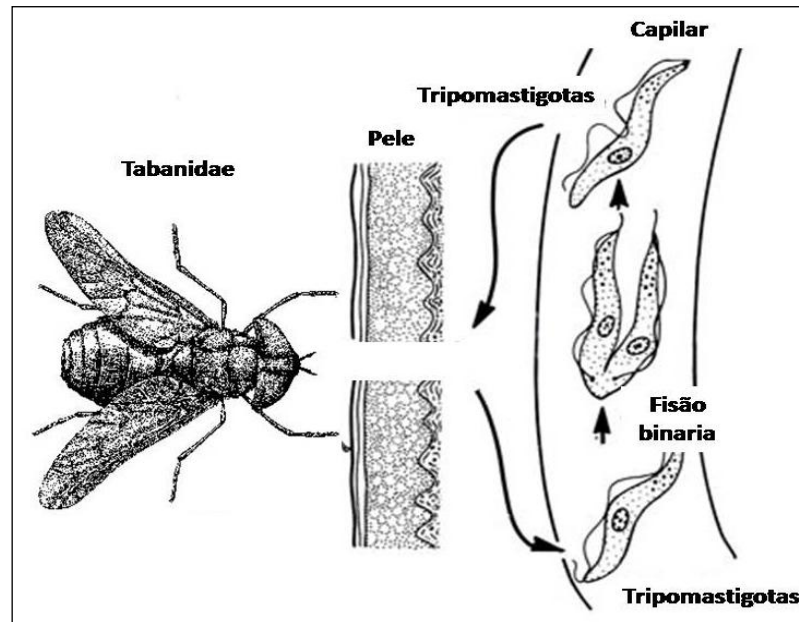


Figura 2 – Transmissão e multiplicação (fissão binária) do *T. evansi* (Modificado de GARDINER et al., 1988).

O *T. evansi* é um protozoário flagelado encontrado no sangue e fluidos tissulares de diversas espécies de mamíferos 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; HERRERA et al., 2002; ATARHOUCHE et al. 2003; FRANCISCATO et al., 2007) e em 2005 foi relatado o primeiro caso de infecção humana em um fazendeiro, na Índia (JOSHI et al., 2005). Além disso, diferentes espécies de animais de laboratório, como coelhos, ratos e camundongos são suscetíveis à infecção por *T. evansi*, sendo frequentemente utilizados como modelo experimental.

A infecção por *T. evansi* pode se manifestar de forma aguda, subaguda ou crônica. A infecção aguda se caracteriza por febre, edema de membros pélvicos, anemia e alterações hemostáticas. Na fase crônica ocorre perda da condição física do animal e agravamento dos sinais clínicos. Distúrbios neurológicos podem ser observados na fase terminal da doença (SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). O diagnóstico da tripanossomose é realizado

com base nos dados epidemiológicos, clínicos, hematológicos, parasitológicos, patológicos, sorológicos e molecular. A presença do parasito em esfregaço sanguíneo é o achado mais importante para confirmar a doença (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

A patogenicidade dos tripanossomas no hospedeiro varia de acordo com a espécie animal e cepa do tripanossoma, fatores inespecíficos afetando o animal como outras infecções e estresse, e condições epizootológicas locais (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, na pele, invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando febre recorrente e induzindo uma resposta inflamatória (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). A parasitemia aumenta e é acompanhada por respostas febris, que são seguidas por períodos aparasitêmicos e afebris. Os picos de parasitemia ocorrem devido a variações antigênicas na superfície do parasita. Conforme os anticorpos são produzidos, há eliminação do clone corrente, mas sucessivos novos padrões de antígenos de superfície são gerados para evadir a resposta do hospedeiro (LUCAS, 1992).

A anemia é o achado laboratorial mais frequentemente encontrado nos animais acometidos pela tripanossomose. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem, ainda não completamente elucidada, das anemias na enfermidade causada pelo protozoário (AQUINO, 2007). Um dos principais mecanismos envolvidos na produção de anemia é a hemólise extravascular, que é resultado da destruição eritrocitária mediada por anticorpos (GAUNT, 2000). Os anticorpos produzidos são principalmente a imunoglobulina M (IgM) e a imunoglobulina G (IgG), que se ligam em epítomos dos agentes infecciosos, em complexo membrana do eritrócito ligado a proteínas microbianas ou em epítomos da membrana do eritrócito que são expostas depois da infecção ou lise da célula (GAUNT, 2000). Assim, tanto os eritrócitos infectados, quanto os não infectados podem estar ligados a anticorpos, complexos imunes ou complemento, sendo fagocitados por macrófagos presentes no baço, medula óssea, fígado e pulmões (GAUNT, 2000).

Outro mecanismo importante na produção de anemia é atribuído à atividade dos tripanossomas circulantes, através da produção de neuraminidase, que resulta na clivagem do ácido siálico da superfície do eritrócito, tornando as hemácias mais propensas à fagocitose pelo sistema reticulo endotelial (SHEHU et al., 2006). A produção de radicais livres também está estreitamente envolvida na patogênese do *T. evansi*. Em estudo realizado por Wolkmer et al. (2009), em que ratos foram experimentalmente infectados pelo flagelado, concluiu-se que

os danos oxidativos causados na membrana das hemácias podem ser uma das causas de anemia na fase aguda da doença.

2.2 Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são glicoproteínas que regulam a duração e a intensidade da resposta imune (ABBAS & LICHTMAN, 2009). Possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, sendo produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a estímulos desencadeados por agentes infecciosos como vírus, parasitos, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas, sendo responsáveis pela liberação dos mediadores do processo inflamatório (COTRAN, 2000).

As citocinas apresentam as seguintes propriedades: são moléculas pleiotrópicas (podem atuar em diferentes tipos celulares), possuem efeitos redundantes (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações) e podem influir na ação de outras citocinas de forma sinérgica ou antagônica. São liberadas principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, mas também podem ser secretadas por células adiposas, células epiteliais, células endoteliais e células da glia. Os monócitos circulantes no sangue e os macrófagos presentes nos tecidos promovem a ativação dos linfócitos T e a secreção de citocinas. São os macrófagos ativados os principais responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como: IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (TIZARD, 2002; ABBAS & LICHTMAN, 2009).

A estimulação das células inflamatórias, em resposta ao reconhecimento de antígenos específicos pelos linfócitos T promove o crescimento, a diferenciação e a ativação de leucócitos que estão envolvidos na resistência ao microrganismo e na lesão tecidual no hospedeiro. Quando estão no local da infecção, os neutrófilos e macrófagos reconhecem os patógenos por meio de vários receptores, ingerem-nos para destruição intracelular, secretam citocinas e respondem de outras maneiras para eliminar os patógenos e reparar os tecidos infectados. Os linfócitos T ativados proliferam e passam também a secretar as citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e IFN- γ , que causam ainda uma maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (Figura 3) (ABBAS & LICHTMAN, 2009).

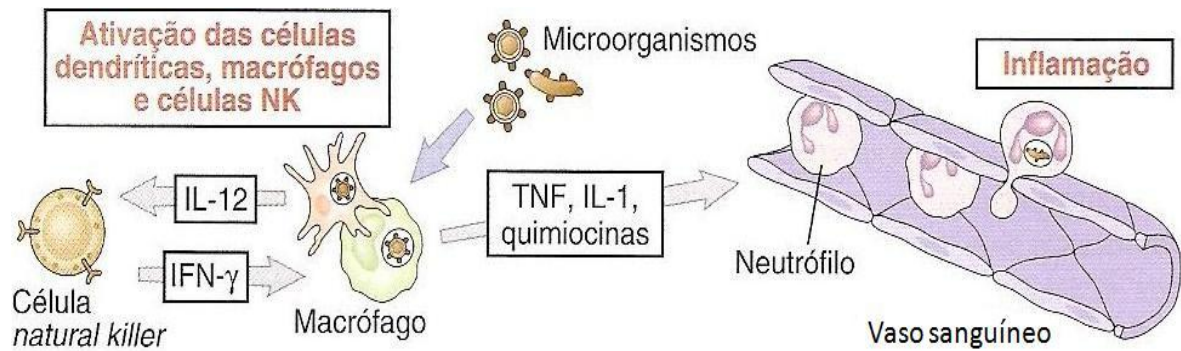


Figura 3 – Esquema da produção das citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas (Adaptado de ABBAS & LICHTMAN, 2009).

As citocinas podem atuar como mediadoras intercelulares de muitos processos biológicos, como inflamação, fibrose, reparação, angiogênese, regulação da hematopoiese, controle da proliferação e diferenciação celular e ativação da resposta imune celular e humoral (TIZARD, 2002; FELDMANN, 2008). Ainda, são atribuídas a inibição da hematopoiese e associadas à anemia de doença crônica. Um aumento nos níveis de citocinas pode ocasionar supressão da hematopoiese e a degradação de hemácias, levando a redução do hematócrito (JAIN, 1993; TANIGUCHI et al., 1997). Baral et al. (2007) observaram uma correlação entre a anemia e aumento dos níveis séricos TNF- α em ratos experimentalmente infectados com *T. evansi*.

As células *natural killer* (NK) são uma classe de linfócitos que reconhecem células infectadas e respondem destruindo essas células. O IFN- γ é apontado como sendo a primeira citocina envolvida na resposta inflamatória. As células NK ativadas sintetizam e secretam IFN- γ , que tem como principal função a ativação de macrófagos em resposta a antígenos do parasito. É a interleucina 12 (IL-12) que induz a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e células NK (ABBAS & LICHTMAN, 2009). O IFN- γ é a principal citocina da resposta Th1, capaz de ativar macrófagos e inibir a replicação intracelular do parasito e a sua produção se dá logo após a adesão e invasão do parasito na célula hospedeira (MABBOTT et al., 1998; PAULNOCK & COLLIER, 2001).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que induz o processo inflamatório através da síntese de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, proteínas de fase aguda e geração de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6 (TIZARD, 2002). O controle da parasitemia é atribuído ao aumento dos níveis séricos de

TNF- α nas tripanossomoses (DAULOUEDE et al., 2001; NAESSENS et al., 2004; BARAL et al., 2007). Ainda, essa citocina está relacionada à perda de peso nos animais infectados por *T. brucei*, isso se deve ao TNF- α causar supressão da lipase lipoprotéica produzida pelos adipócitos levando à perda de peso progressiva (MAGEZ et al., 1999).

A associação entre o IFN- γ e o TNF- α induz a ativação da enzima induzível sintetase de óxido nítrico (iNOS) que catalisa a reação de produção de óxido nítrico (NO) na infecção pelo *T. cruzi*. O NO é efector essencial no desenvolvimento da resposta Th1 contra *T. cruzi*, controlando a replicação através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e substâncias co-estimuladoras (SILVA et al., 1995a; MALVEZI et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pelo aumento na síntese e secreção de proteínas de fase aguda (ECKERSALL, 2001). A ação dessas citocinas acontece de forma sinérgica, através da mobilização de aminoácidos periféricos, pela ação proteolítica do TNF- α nos músculos, o que aumenta a disponibilidade de moléculas no fígado para a produção das proteínas de fase aguda. Assim, a IL-1 modula a síntese de proteínas no hepatócito, inibindo a produção de proteínas de fase aguda negativas (albumina e transferrina), estimulando a produção de proteínas de fase aguda positivas (proteína C-reativa, amilóide sérica A, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e alfa-1 glicoproteína ácida). Por fim, a IL-6 é responsável pela liberação dessas proteínas para a circulação sanguínea (MURATA et al., 2004; PALTRINIERI, 2007).

A principal atividade da IL-1 é ser reguladora do processo inflamatório. Essa citocina induz a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, estimula os linfócitos na resposta imune e age no hipotálamo causando febre, letargia e perda de peso (TIZARD, 2002). A IL-1 é uma citocina mediadora da patogênese na tripanossomose (VINCENDEAU & BOUTEILLE, 2006). Altos níveis de IL-1 foram observados na infecção aguda em ratos experimentalmente infectados por *T. brucei* (SILEGHEM et al., 1989). Em ratos infectados por *T. cruzi* a IL-1 estimula a resposta imune mediada por linfócitos (REED et al., 1989).

Na resposta de fase aguda, a IL-6 é a principal citocina indutora da síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Muitas funções biológicas da IL-6 são também desempenhadas por IL-1 e TNF- α . Em sinergismo a IL-1 e a IL-6 promovem a ativação e proliferação de linfócitos T. Essa citocina induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e a liberação de IgM, IgG e imunoglobulina A (IgA) e, estimula a proliferação de células germinativas hematopoéticas (HEINRICH et al., 1990; TIZARD et al., 2002) Nas tripanossomoses ocorre aumento dos níveis séricos de IL-6 nos animais infectados. Em ratos

infectados pelo *T. cruzi* foi observado que a deficiência de IL-6 aumenta a suscetibilidade à infecção, com aumento da parasitemia e mortalidade dos animais infectados (GAO & PEREIRA, 2002). Ainda, na infecção por *T. brucei* ocorre aumento dos níveis séricos de IL-6, estando correlacionados ao processo inflamatório induzido pelo parasito (STERNBERG et al., 2005).

CAPÍTULO II

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:

Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*

Autores: Francine Chimelo Paim, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Márcio Machado Costa, Aleksandro Schafer da Silva, Patrícia Wolkmer, Cássia Bagnolin Silva, Carlos Breno Viana Paim, Raqueli Teresinha França, Cinthia Melazzo Andrade Mazzanti, Silvia Gonzalez Monteiro, Alexandre Krause, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

De acordo com normas para publicação em: Experimental Parasitology

Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*

Francine C. Paim^a, Marta M. M. F. Duarte^b, Márcio M. Costa^a, Aleksandro S. da Silva^c, Patrícia Wolkmer^a, Cássia B. Silva^a, Carlos Breno V. Paim^a, Raqueli T. França^a, Cinthia M. A. Mazzanti^a, Silvia G. Monteiro^c, Alexandre Krause^d, Sonia Terezinha A. Lopes^a

^aLaboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bLutheran University of Brazil - ULBRA, BR 287, Km 252, Clover Maneco Pedroso, Boca do Monte, Cx. Postal 21834, 97020-001 Santa Maria, RS, Brazil

^cDepartment of Microbiology and Parasitology - LAPAVET, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartment of Small Animal Clinical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence to: Francine C. Paim

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:franchimelo@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to measure the levels of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) in serum of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi* and to correlate with the hematological parameters. Forty-eight Wistar rats were initially intraperitoneally inoculated with cryopreserved blood containing 10^6 trypomastigotes per animal. Twenty-eight animals were used as negative controls and received 0.2 mL of saline by the same route. The experimental groups were formed according to the time after infection and parasitemia degree, as follows: four control groups (C3, C5, C10 and C20) with seven non-inoculated animals each and four test groups (T3, T5, T10 and T20) with ten animals inoculated with *T. evansi*. The blood samples were collected by cardiac puncture at the day 3 (C3, T3), 5 (C5, T5), 10 (C10, T10) and 20 (C20, T20) post infection to perform the complete blood count and determination of IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6 levels using an ELISA quantitative sandwich. The levels of all measured cytokines increased significantly ($P < 0.01$) in all infected animals compared to the controls. *T. evansi* infection in rats caused an increase in serum IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6 and this increase was observed during the whole experimental infection. In addition, the increase in the cytokine levels was concomitant and directly correlated with parasitemia and anemia development at the parasitemia peak, but not to the recovery of anemia. These results suggest a synergism between these cytokines contributing to the development of anemia and the regulation of the immune response against the parasite. Since anemia has also been associated to cytokine expression in other trypanosome models, we suggest a variable pathogenic mechanism which is host and parasite dependent.

Keywords: IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, trypanosomosis

1. INTRODUCTION

Trypanosoma evansi is a pathogenic hemoflagellate protozoa belonging to the Salivaria section, with presents a global distribution and affects several animal species. The disease progression, clinical, hematological and pathological aspects in the host can vary according to the strain virulence, the host susceptibility and the epizootic conditions. The transmission occurs mainly by hematophagous insects (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. and *Hematopota* sp.) (Hoare, 1972).

After reaching the lymphatic system, the *T. evansi* leads to a B and T cell response depending on the type of the parasite cell surface molecule (variant surface glycoprotein - VSG) (Taylor and Authié, 2004). Most of the immunoglobulins produced in response to the infection belong to the IgM and IgG classes. These antibodies bind to specific epitopes on the parasite causing its death (Baral et al., 2007). Costa et al. (2010) reported an increase in the total serum protein levels in cats infected by *T. evansi* corresponding to the alpha-2-globulin, beta-globulin and gamma-globulin fractions. This is reported to be related with the host response in the inflammatory processes. The immune system is involved in the control of the infection and activates different cellular mechanisms where the cytokines play an important role.

Cytokines are low molecular proteins which act as intercellular mediators involved in many biological processes such as inflammation, fibrosis, repair, angiogenesis, cell growth/proliferation and immune response (Tizard, 2002; Feldmann, 2008). In trypanosome infections the lymphocytes produce interferon-gamma (IFN- γ) in response to parasite antigens. IFN- γ activates the macrophages increasing their ability to destroy phagocytosed organisms. Activated macrophages induce pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF- α playing important roles in the replication process of the parasite as well as in the host immune response (Paulnock and Coller, 2001; Gao and Pereira, 2002; Magez et al., 2007). Cytokines,

in addition to the over cited roles, are referred to have suppressor activity on erythropoiesis (Cançando and Chiattoone, 2002) and probably are central players in the anemia associated with inflammation (Noyes et al., 2009).

Unlike other trypanosomosis, information about the immunological mechanisms playing a role in *T. evansi* infection is limited. There is no data referring the serum levels of the inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 in infected animals. The aim of this work was to provide information about the serum levels of these cytokines in *T. evansi* infection and to establish a correlation with hematological parameters.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental animals

Seventy-six Wistar rats (*Rattus norvegicus*; 230 - 270g) were housed in a temperature (23°C) and relative humidity (70%) controlled room. The rats were fed with commercial rat pellets and received water *ad libitum*.

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR / UFSM), N°. 23081.014568/2009-05 in accordance with existing legislation and the Ethical Principles published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA).

2.2. Group and trypanosome infection

Rats were divided into two groups as follows: Group T formed by forty-eight Wistar rats were inoculated with strain the *T. evansi* and the group C was composed of twenty-eight animals, which were used as negative controls. For this experiment, it was utilized a strain of *T. evansi* obtained from a naturally infected dog (Colpo et al., 2005), maintained in liquid nitrogen according to the methodology described by Silva et el. (2003). The animals of Group

T were inoculated intraperitoneally (IP) with cryopreserved blood containing 1×10^6 trypomastigotes per animal. The infected blood has been cryopreserved for 10 days. On day zero the blood was thawed to inoculate the animals in group T. At this time the quantification of viable parasites was done in Neubauer chamber (Wolkmer et al., 2007). The control animals received 0.2 mL saline (0.9% NaCl) IP.

Four groups were defined as control (C3, C5, C10 and C20), each group composed by seven non-inoculated animals and the test groups (T3, T5, T10 and T20) were formed by ten animals infected with the parasite. The test groups were formed according to the time of infection and the parasitemia degree (number of parasites/High Power Field, HPF under the microscope) as follows: T3 (day 3 post-infection (pi); 20-30 trypanosomes/HPF), T5 (day 5 pi; 30-70 trypanosomes/HPF), T10 e T20 (day 10 and 20 pi; 0-5 trypanosomes/HPF).

2.3. *Estimation of parasitemia*

The presence and degree of parasitemia were estimated for each animal daily by blood film examination. A drop of blood was collected from the tail vein and placed on a slide, and a thin blood smear was manually prepared. The blood films were Romanovsky stained and then examined under a microscope, the parasites were counted in 10 fields at 1000x magnification (Da Silva et al., 2006).

2.4. *Blood sampling*

The blood samples were collected in the day 3 (C3, T3), 5 (C5, T5), 10 (C10, T10) and 20 (C20, T20) post-infection (pi). For the blood collection, 5 mL were obtained by heart puncture after anesthesia with isofluorane in a gas chamber. After the blood sampling, the rats were sacrificed by exsanguination under anesthesia. For the complete blood count (CBC), 1 mL of blood from each rat was placed into tubes containing 10% ethylene diamine tetracetic

acid (EDTA). The remaining 4 mL were transferred into tubes without anticoagulants and centrifuged to obtain serum. The serum was used to measure pro-inflammatory cytokines determination IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6.

2.5. Hematological evaluation

Complete blood count and hemoglobin (Hb) determination were performed using an automated cell counter (Vet Auto Hematology Analyzer[®], model BC 2800). The packed cell volume (PCV) was obtained by centrifugation using a microcentrifuge (Sigma) at 14.000 rpm for 5 minutes. For morphological evaluation of the blood and differential count of white blood cell (WBC), the blood smears were first stained using a Diff-Quick commercial kit and subsequently visualized under the microscope. Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated according to Feldman et al. (2000).

2.5. Cytokines

Pro-inflammatory cytokines quantification were assessed by ELISA using commercial kits for rat IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (eBIOSCIENCE[®], San Diego, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 minutes, the sample was added and incubated (37°C temperature, for 30 minutes). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added to each well and a period of incubation followed. The presence and concentration of the cytokines was determined by the intensity of color measured by spectrometry by a micro ELISA reader.

2.6. Statistical analysis

The result analysis was performed using the analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using the Tukey's test. In order to verify the effects of the cytokines levels on the PCV the multiple linear regression (MLR) using the hierarchical method for TNF- α e IL-1 was chosen. The MLR stepwise method was used for IL-6 e IFN- γ . *P* values lower than 5% were considered statistically different.

3. RESULTS

3.1. Parasitemia and clinical course of infection

T. evansi could be detected in the blood of all infected rats from 24 to 72 hours after inoculation. Parasitemia levels increased progressively in almost all animals until the day 5 post-infection (pi). Eight infected rats died from day 5-7 pi and presented very high parasitemia. After day 6 pi, the remaining rats showed a reduction in parasitemia which oscillated from 0 to 5 parasites/HPF. The parasitemia evolution is showed in Fig. 1.

Animals presenting high parasitemia (T5) showed weight loss and prostration. Control animals remained clinically healthy during the experimental period.

3.2. Hematological findings

A reduction in the PCV (Fig. 2A), red blood cell (RBC) count (Fig. 2B) and hemoglobin (Hb) (Fig. 2C) was observed in all infected animals compared to the control group. Anemia was very strong at day 5 pi, and was correlated with the parasitemia peak, after the RBC increased although the animals still remained anemic. MCV, MCHC remained in the normal range, characterizing a non-responsive anemia. Infected animals developed leukocytosis with neutrophilia (Fig. 3A and B) and lymphocytosis (Fig. 3C). Monocyte and eosinophil numbers did not vary statistically.

3.3. Cytokines

Cytokine levels increased gradually ($P < 0.01$) in infected animals compared to the control group (Fig. 4). A progressive increase in the serum levels of IFN- γ (Fig. 4A), TNF- α (Fig. 4B), IL-1 (Fig. 4C) e IL-6 (Fig. 4D) was observed during the experimental period.

3.4. Multiple linear regression (MLR) analysis

MLR was chosen in order to verify the contribution of each cytokine (independent variable) to the reduction in the PCV (dependent variable) in the *T. evansi* experimentally infected animals. Using the hierarchical mode, TNF- α and IL-1 were chosen for comparison due to their relevance in suppressing erythropoiesis (Jain, 1993; Waner and Harrus, 2000). IL-6 and IFN- γ were added to the analysis by the stepwise method in order to allow the software (SPSS, version 15.0) to choose the best parameter for the mathematical model. The results of this analysis are represented in table 1. According to the analysis, IL-6 was excluded from the third step and the remaining parameters were IL-1, TNF- α and IFN- γ ($P < 0.01$).

4. DISCUSSION

We observed a variation among the animals regarding the response to the parasitemia degree. This could be due to the variation in the virulence of the strain. In order to achieve homogeneity among the groups and to prolong the survival time of the animals, the experimental groups were constituted according to time of infection and the parasitemia degree. At the beginning of infection, the animals were classified into two main groups: with increasing or with a wave-pattern parasitemia (Fig. 1). Our previous results could demonstrate high pathogenicity of *T. evansi* in rats, with a high mortality rate at day 5-6 pi (Wolkmer et al., 2007; Da Silva et al., 2009). Similar results were obtained in this work, where the mortality reached 10% ($n = 8$) in days 5-7 pi. This mortality was associated to high parasitemia. After day 5 pi, the remaining animals showed a reduction in the parasitemia, but this characterized

by a multi-wave parasitemia development, which is a standard feature observed in infected animals (Assoku, 1975; Noyes et al., 2009). The prolonged course of disease observed in this experiment could be related to the cryopreservation of the strain, causing a delay in the multiplication of the parasite due to environmental or host changes (Da Silva et al., 2009).

Clinical signs of disease in animals were weight loss and prostration, observed especially in animals presenting high parasitemia (T5). These clinical signs are reported in the literature and are linked to death in a period of weeks or months in non-treated animals (Conrado et al., 2005; Franciscato et al., 2007). Neurological signs described by Wolkmer et al. (2009) were not observed in our study.

The analysis of red blood cell indices indicated marked normocytic normochromic anemia in the infected rats (Fig. 2). The anemia was more intense ($P < 0.01$) in the T5 group and was correlated with the parasitemia peak. This feature was observed in *T. evansi* infection in different animal species (Silva et al., 1995; Wolkmer et al., 2007; Da Silva et al., 2008).

The pathogenesis of anemia associated with trypanosome infection still remains unclear. Despite parasitemia degree, anemia associated with inflammation is investigated as an additional cause for the anemia. In an experimental model of trypanosomosis, Noyes et al. (2009) did not observed a correlation between parasitemia levels and anemia in different mouse strains infected with *T. congolense*. The authors analyzed the gene expression profile of the infected mice and observed a correlation between the expression of genes involved in erythropoiesis and haemolysis and the genes related to inflammation, IL-6 and IFN- γ . The increase in the cytokine levels was concomitant and directly correlated with parasitemia and anemia development at the parasitemia peak, but not to the recovery of anemia (Fig. 4). These cytokines are reported to inhibit hematopoiesis and to be associated with the chronic disease-related anemia. An increase in the levels of these cytokines would lead to hematopoiesis suppression and to erythrocyte degradation leading to a reduction in the PCV (Jain, 1993;

Taniguchi et al., 1997). Waner and Harrus (2000) reported an inhibition of hypoxia-induced erythropoietin secretion in the presence of high levels of TNF- α , together with IL-1 α and β .

The infection by *T. brucei rhodesiense* increased in blood parameters in human TNF- α deficient (Naessens et al., 2005). Baral et al. (2007) reported an association between anemia and TNF- α in rats infected with *T. evansi*. However, in a mouse model of *T. congolense* infection, the hematological parameters remained in the normal range (Naessens et al., 2004). In this study, the reduction of 24% in the PVC was attributed to the increase of IFN- γ , TNF- α e IL-1 indicating that in addition to the cytokines associated anemia, others mechanisms could be related to the anemia observed in the disease caused by *T. evansi*. Previous studies have suggested that the anemia is a result of the red blood cell destruction (Jatkar and Purohit, 1971) by an immunologically-mediated mechanism (Assoku 1975), associated with the development of antigen-antibody complexes (Audu et al., 1999). The anemia was also attributed to the trypanosomal enzyme neuraminidase and to the lipidic peroxidation that would injure the erythrocyte membrane rendering it to be more prone to phagocytosis in the reticuloendothelial system (Shehu et al.; 2006; Wolkmer et al., 2009).

The leukocytosis observed at the beginning of infection in groups T3 and T5 (Fig. 3A) with neutrophilia and lymphocytosis. The neutrophilia in trypanosomosis could be related to the inflammatory response and the lymphocytosis has been implicated in trypanosomosis as a result of antigenic stimulation on the animal immune system caused by the ever changing VSG on the infecting trypanosomes (Vincendeau and Bouteille, 2006). However, a typical leukogram pattern in animals infected by *T. evansi* could not be established, since reports of leukopenia (Da Silva et al., 2008), normal WBC counts (Franciscato et al., 2007) or leukocytosis (Rodrigues et al., 2005) can be found in the literature.

The major parasite surface compound is the variant VSG is probably associated with immune response evasion, cytokine dysfunction and to the production of autoantibodies

(Vincendeau and Bouteille, 2006). The IFN- γ is pointed to be the first inflammatory cytokine, having the major role in activating the macrophages following antigen stimulation by the parasite. Activated macrophages are responsible for the induction of TNF- α , IL-1 and IL-6 in trypanosomosis (Mabbott et al., 1998; Paulnock and Collier, 2001).

In this study, we observed a progressive increase in the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6 following the evolution of infection (Fig. 4). This increase could be related to the inflammatory response and the parasitemia control occurring in the infected animals, as described by different authors (Sileghem et al., 1989; Silva et al., 1995; Gao and Pereira, 2002). Titus et al. (1991) reported that the first host response to protozoa infection is the secretion of several cytokines, including TNF- α , IL-1 e IL-6. The combined action of these cytokines leads to leukocytosis, fever and acute phase proteins production. These initial response provide important contribution to the course of infection by regulation of the immune response to the parasite.

The serum levels of INF- γ could be related to the parasitemia control by activation of macrophages leading to the clearance of the parasite from the blood stream. This mechanism was described for trypanosomosis by different authors (Silva et al.; 1995; Hertz et al., 1998; Magez et al., 2006; D`Ávila et al., 2009). Holscher et al. (1998) demonstrated in a mouse model of *T. cruzi* infection an inhibition of *in vivo* and *in vitro* replication inhibition of the parasite caused by the nitric oxide (NO) release by activated macrophages induced by INF- γ . Additionally, in another mouse model, high levels of INF- γ were associated to resistance and lower parasitemia in animals infected by *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Hertz et al., 1998).

The TNF- α is a pleiotropic cytokine which plays an important role in T cell-mediated inflammatory response in trypanosomosis (Magez et al., 2007). It has tripanolytic activity whereas the control of the parasitemia is attributed to an increase of TNF- α levels in *T. brucei*

infection (Daulouede et al., 2001). Increased susceptibility to infection by *T. congolense* was reported in TNF- α deficient (Naessens et al., 2004). Based on these findings it is reasonable to believe that TNF- α acts in parasitemia control, once increased levels of TNF- α were followed by reduction of parasites in the blood stream.

A similar study on *T. evansi* infection in a mouse model, the TNF- α was associated to anemia development and to increased levels of IgM in parasitemia control (Baral et al., 2007). In addition, TNF- α is associated with weight loss in infected animals, as occurs in animals infected by *T. brucei* (Magez et al., 1999). This would be due to the suppression of the lipoprotein lipase produced by the adipocytes leading to the progressive weight loss.

IL-1 is a potent mediator cytokine in the pathogenesis of trypanosomiasis. In *T. cruzi* infection, IL-1 increases were associated to the development of cardiomyopathy in the chronic phase of infection (Robles et al., 2009). High levels of IL-1 were detected during the acute phase of the disease in rats experimentally infected by *T. brucei* (Sileghem et al., 1989). IL-1 induces the production of acute phase proteins in the liver (Eckersall et al., 2001) and stimulates the lymphocyte-mediated immune response (Reed et al., 1989). This could explain the lymphocytosis observed in our study.

Sternberg et al. (2005) observed neurological alterations infectious caused by *T. brucei* that were correlated to IL-6. In mice infected by *T. cruzi*, IL-6 deficient mice had higher susceptibility to infection and presented higher parasitemia and mortality rates (Gao and Pereira, 2002). In our study, the increase in IL-6 serum levels observed in rats infected with *T. evansi* represents the host immune response to infection.

These results suggest a synergism between these cytokines contributing to the development of anemia and the regulation of the immune response against the parasite. Since anemia has also been associated to cytokine expression in other trypanosome models, we suggest variable pathogenic mechanism which is host and parasite dependent.

REFERENCES

- Assoku, R.K.G., 1975. Immunological studies of 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.
- Baral, T.N., De Baetselier, P., Brombacher, F., Magez, S., 2007. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 195, 1513-1520.
- Cançando, R.D., Chiattoni, C.S., 2002. Anemia de doença crônica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 24, 127-136.
- 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.
- Conrado, A.C., Lopes, S.T.A., Oliveira, L.S.S., Monteiro, S.G., Vargas, D.L.N., Bueno, A., 2005. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região Central do Estado do Rio Grande do Sul. *Cienc. Rural.* 35, 928-931.
- Costa, M.M., Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Zanette, R.A., França, R.T., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2010. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Prev. Vet. Med.* 95, 301-304.
- Da Silva, A.S., Doyle, R.L., Monteiro, S.G., 2006. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. *Fac. Zoot. Vet. Agron.* 13, 153-157.
- Da Silva, A.S., Costa, M.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2008. Alterações hematológicas em coelhos infectados pelo *Trypanosoma evansi*. *Cienc. Rural.* 38, 538-542.

- Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Gressler, L.T., Otto, M.A., Bess, F., Tavares, K.C.S., Zanette, R.A., Monteiro, S.G., 2009. Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com parasito em sangue *in natura* e criopreservado. *Cienc. Rural*. 39, 1842-1846.
- Daulouède S., Bouteille, B., Moynet, D., De Baetselier, P., Courtois, P., Lemesre, J.L., Buguet, A., Cespuglio, R., Vincendeau, P., 2001. Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)-alpha production induced by *Trypanosoma brucei gambiense* and the role of TNF-alpha in parasite control. *J. Infect. Dis.* 183, 988-991.
- D'Ávila, D.A., Guedes, P.M.M., Castro, A.M., Gontijo, E.D., Chiari, E., Galvão, L.M.C., 2009. Immunological imbalance between INF- γ and IL-10 levels in the será of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104, 100-105.
- Eckersall, P.D., Gow, J.W., McComb, C., Bradley, B., Rodgers, J., Murray, M., Kennedy, P.G.E., 2001. Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* in mice. *Parasitol. Int.* 50, 15-26.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Williams & Wilkins. 366–381
- Feldmann, M., 2008. Many cytokines are very useful therapeutical targets in disease. *JCI*. 118 3533–3536.
- Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Teixeira, M.M.G., Monteiro, S.G., Wolkmer, P., Garmatz, B.C., Paim, C.B., 2007. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS. *Cienc. Rural*. 37, 288-291.
- Gao, W., Pereira, M.A., 2002. Interleukin-6 is required for parasite specific for parasite response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasit.* 32, 167-170.
- Hertz, C.J., Filutowicz, H., Mansfield, J.M., 1998. Resistance to the African trypanosomoses is INF-gamma dependent. *J. Immunol.* 67, 6775-67783.

- Hoare, C.A., 1972. The Trypanosomes of mammals a zoological monograph. Oxford: Backwell Scientific Publications, 749p.
- Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, Schaub, G.A., Brombacher, F., 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Imm.* 66, 1208-1215.
- Jain, N.C., 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 415p.
- Jatkar, P.R., Purohit, M.S., 1971. Pathogenesis of anaemia in *T. evansi* infection. I. Hematology. *Indian Vet. J.* 48, 239-244.
- Mabbott, N.A., Coulson, P.S., Smythies, L.E., Wilson, R.A., Sternberg, J.M., 1998. African trypanosome infections in mice that lack the interferon- γ receptor gene: nitric oxide-dependent and independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. *Immunol.* 94, 476-480.
- Magez, S., Radwanska, M., Beschin, A., Sekikawa, K., De Baetselier, P., 1999. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect. Immu.* 67, 3128-3132.
- Magez, S., Radwanska, M., Drennan, M., Fick, L., Baral, T.N., Brombacher, F., De Baetselier, P., 2006. Interferon- γ and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during *Trypanosoma congolense* Tc13 infections. *J. Infect. Dis.* 193, 1575-1583.
- Magez, S., Radwanska, M., Drennan, M., Fick, L., Baral, T.N., Allie, N., Jacobs, M., Nedospasov, S., Brombacher, F., Ryffel, B., De Baetselier, P., 2007. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing. *J. Infect. Dis.* 196, 954-962.

Naessens, J.; Kitani, H.; Momotani, E.; Sekikama, K.; Nthale, J.M.; Iraqi, F., 2004. Susceptibility of TNF- α -deficient mice to *Trypanosoma congolense* is not due to a defective antibody response. Act. Trop. 92, 193-203.

Naessens, J.; Kitani, H.; Nakamura, Y.; Sekikawa, K.; Iraqi, F., 2005. TNF-alpha mediates the development of anaemia in a murine *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection, but not the anaemia associated with a murine *Trypanosoma congolense* infection. Clin. Exp. Immunol. 139, 405-410.

Naessens, J., 2009. Mechanisms controlling anemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. PLoS One 4, 5170e, 1-13.

Noyes, H.A., Alimohammadian, M.H., Agaba, M., Brass, A., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hulme, H., Iraqi, F., Kemp, S., Rathkolb, B., Wolf, E., de Angelis, M.H., Roshandel, D., Paulnock, D.M., Coller, S.P., 2001. Analysis of macrophage activation in African trypanosomosis. J. Leukoc. Biol. 69, 685-690.

Reed, S.G., Pihl, D.L., Grabstein, K.H., 1989. Immune deficiency chronic *Trypanosoma cruzi* infection recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. J. Immunol. 142, 2067-2071.

Robles, D.C., González, J.P.C., Quero, M.M.C., Méndez, O.P., Reyes, P.A., Alárcon, G.V., 2009. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphism and chagas disease development susceptibility. Immunol. Invest. 38, 231-239.

Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, M.T., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J., Barros, C.S.L., 2005. Surto de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e parasitológicos. Pesq. Vet. Bras. 25, 239-249.

- Shehu, S.A., Ibrahim, N.D.G., Esiebo, K.A.N., Mohammed, G., 2006. Neuroaminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. *J. Appl. Sci.* 6, 2779-2783.
- Sileghem, M.R., Darji, A., Hamers, R., De Baetselier, P., 1989. Modulation of IL-1 production and IL-1 release during experimental trypanosomose infections. *Immunol.* 68, 137-139.
- Silva, J.S., Vespa, G.N.R., Cardoso, M.A.G., Aliberti, J.C.S., Cunha, F.Q., 1995. Tumor necrosis factor mediate resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Imm.* 63, 4862-4867.
- Sternberg, J.M., Rodgers, J., Bradley, B., Maclean, L., Murray, M., Kennedy, P.G., 2005. Meningoencephalitic African trypanosomosis: brain IL-10 and IL-6 are associated with protection from neuro-inflammatory pathology. *J. Neurol.* 167, 81-89.
- Taniguchi, S., Dai, C.H., Price, J.O., Kranz, S.B., 1997. Interferon γ downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. *Blood* 90, 2244-2252.
- Taylor, K., Authié, E.M.L., 2004. Pathogenesis of animal trypanosomosis. In: Maudlin, I.; Holmes, P.H., Miles, M.A. *The Trypanosomiasis*. London: CABI publishing. 18, 331-354.
- Titus, R.G.; Sherry, B.; Cerami, A., 1991. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Parasitol. Today*. 7, 13-16.
- Tizard, I.R., 2002. Citocinas e sistema imune. In: Tizard, I.R. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 6ª ed. São Paulo: Roca, 12, 140-153 .
- Warner, T.; Harrus, S., 2000. Anemia of inflammatory disease. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1344p.

Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Cargnelutti, J.F., Costa, M.M., Traesel, C.K., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2007. Resposta eritropoiética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. *Cienc. Rural*. 36, 1682-1687.

Wolkmer, P., Da Silva, A.S., Traesel, C.K., Paim, F.C., Cargnelutti, J.F., Pagnoncelli, M., Picada, M.E., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 165, 41-46.

Vincendeau, P.; Bouteille, B., 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 645-665.

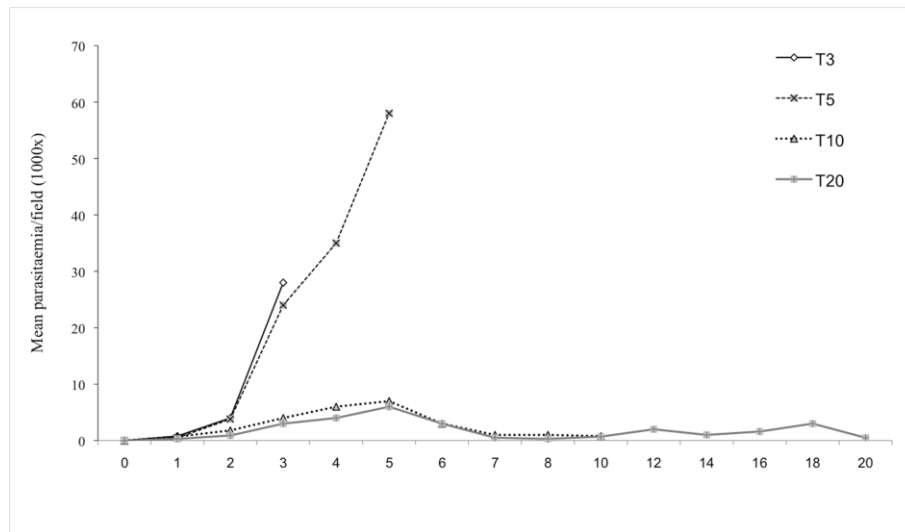


Fig. 1 – Parasitemia of peripheral blood. Mean parasitemia of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection.

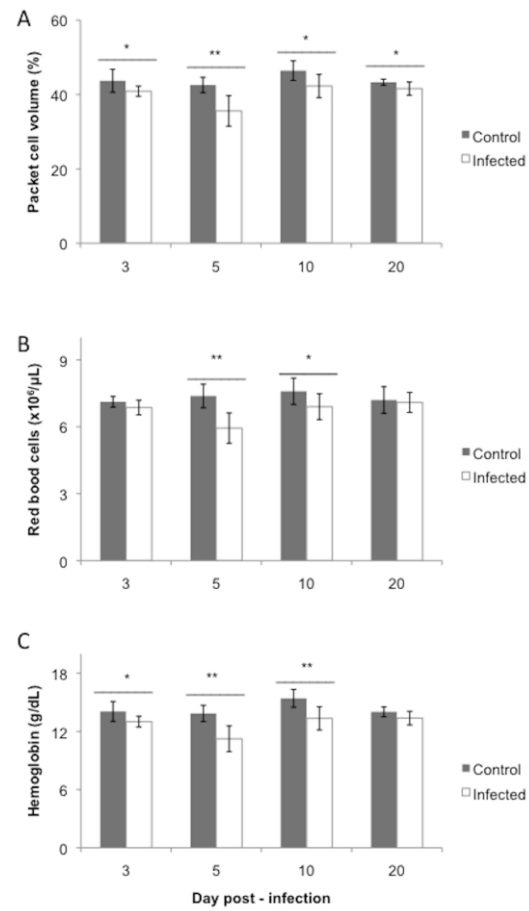


Fig. 2 – Red blood cells parameters of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) packed cell volume, (B) red blood cell count and (C) hemoglobin concentration.

* Represents statistical difference between infected and control group (* $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, $n=10$ infected group and $n=7$ controls).

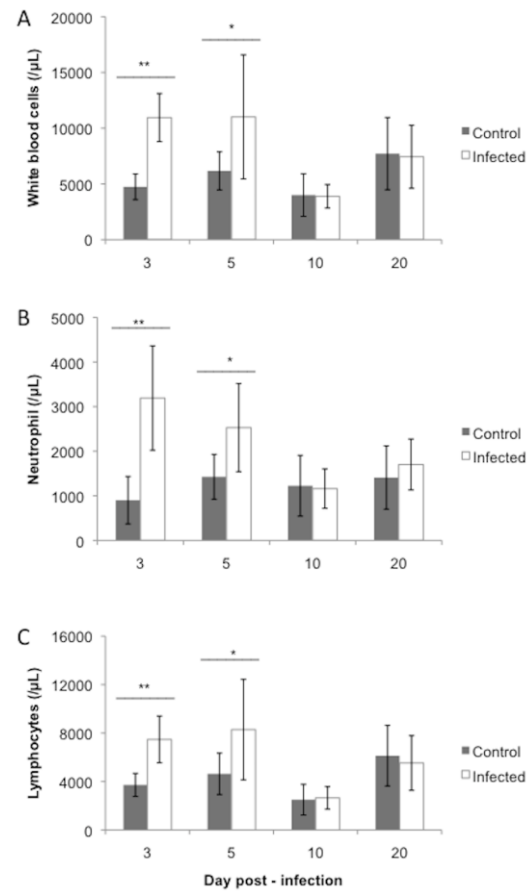


Fig. 3 – White blood cells parameters of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) Number of total leukocytes; (B) Number of total neutrophils; (C) Number of total lymphocytes.

* Represents statistical difference between infected and control group ($*P < 0.01$, $**P < 0.005$, $n=10$ infected group and $n=7$ controls)

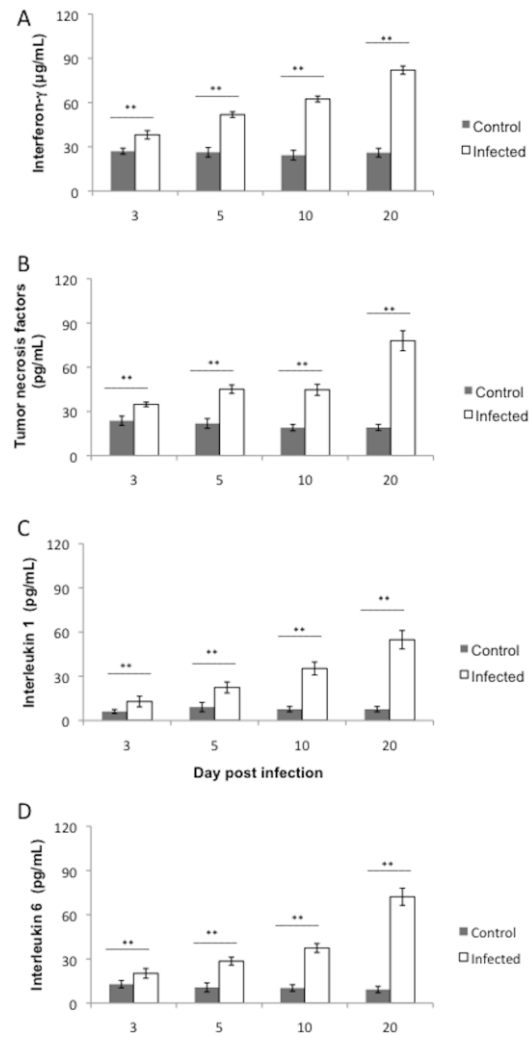


Fig. 4 – Serum levels of proinflammatory cytokines of *T. evansi*-infected in Wistar rats at day 3, 5, 10 and 20 post-infection compared with uninfected controls: (A) Interferon-gamma, (B) Tumor necrosis factor alpha, (C) Interleukin 1, (D) Interleukin 6.

* Represents statistical difference between infected and control group (** $P < 0.01$, $n = 10$ infected group and $n = 7$ controls).

Table 1 Hierarchical multiple linear regression (steps 1 and 2) and stepwise (step 3) to reduce the packed cell volume (dependent variable) in rats experimentally infected with *T. evansi*.

	<i>B</i>	SE <i>B</i>	β	R^2	<i>F</i>	<i>p</i>
Step 1						
Constant	43.91	1.01				
TNF- α	-0.057	0.02	-0.29	0.09	6.03	0.017
Step 2						
Constant	45.55	1.21				
TNF- α	-0.195	0.06	-0.99	0.16	5.99	0.004
IL-1	0.169	0.07	0.75			
Step 3						
Constant	48.60	1.64				
TNF- α	-0.089	0.07	-0.45	0.24	6.66	0.001
INF- γ	0.31	0.09	1.39			
IL-1	-0.23	0.09	-1.20			

Note: n=66. *B*: regression coefficient; SE *B*: standard error; β : standardized regression coefficient; R^2 : coefficient of determination, TNF- α : Tumor necrosis factor alpha, INF- γ : Interferon-gamma, IL-1: Interleukin 1, IL-6: Interleukin 6.

4 – CONCLUSÃO

Na infecção por *T.evansi* em ratos ocorre aumento dos níveis séricos de IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6. O aumento dessas citocinas pró-inflamatórias está correlacionado com a parasitemia e com desenvolvimento da anemia no pico da parasitemia. Estes resultados sugerem um sinergismo entre essas citocinas contribuindo para o desenvolvimento da anemia, leucocitose e regulação da resposta imune contra o parasito. Portanto, a anemia pode estar associada à expressão de citocinas, em um mecanismo patogênico variável dependente do hospedeiro e do parasito.

5 - REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 314p.

AQUINO, L.P.C.T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil, 2007. Disponível em:<http://www.fav.br/programasinst/Revistas/revistas2007/veterinaria/Importancia_da_infeccao.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.

ASSOKU, R.K.G. Immunological studies of mechanism of anaemia in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rats. **International Journal for Parasitology**, v5, p. 137-145, 1975.

ATARHOUCHE, T. et al. Camel trypanosomiasis in Morocco 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.

BARAL, T.N. et al. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, p. 1513-1520, 2007.

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.

CANÇANDO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, p. 127-136. 2002.

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 trypanosomiasis. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2 ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v.1, 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.

COSTA, M.M. et al. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p. 301-304, 2010.

COTRAN, R. S, KUMAR, V., COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

DA SILVA, A.S.; DOYLE, R.L.; MONTEIRO, S.G. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos em camundongos. **Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 13, p. 153-157, 2006.

DA SILVA, A.S. et al. Alterações hematológicas em coelhos infectados pelo *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 538-542, 2008.

DA SILVA, A.S. et al. Patogenicidade de um isolado de *Trypanosoma evansi* em ratos inoculados com parasito em sangue *in natura* e criopreservado. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1842-1846, 2009.

DAULOUÈDE, S. et al. Human macrophage tumor necrosis factor (TNF)-alpha production induced by *Trypanosoma brucei gambiense* and the role of TNF-alpha in parasite control. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.988-991, 2001.

D'ÁVILA, D.A. et al. Immunological imbalance between INF- γ and IL-10 levels in the será of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 100-105, 2009.

ECKERSALL, P.D. et al. Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* in mice. **Parasitology International**, v. 50, p. 15-26, 2001.

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia: PA Lippincott Williams & Wilkins, p. 366-381, 2000.

FELDMANN, M. Many cytokines are very useful therapeutical targets in disease. **JCI**, v. 118, p. 3533-3536, 2008.

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.

GAO, W.; PEREIRA, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific for parasite response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 167-170. 2002.

GAUNT, S.D. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, p. 154-162, 2000.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **The Biochemical Journal**, v. 265, p. 621-636, 1990.

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.

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

HERTZ, C.J. et al. Resistance to the African trypanosomoses is INF-gamma dependent. **The Journal of Immunology**, v. 67, p. 6775-67783, 1998.

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

HOLSCHER, C. et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*- infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1208-1215, 1998.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 415p

JATKAR, P.R.; PUROHIT, M.S. Pathogenesis of anaemia in *T. evansi* infection. I. Hematology. **Indian Veterinar. Journal**, v. 48, p. 239-244, 1971.

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.

KUBIAK, G. V. L.; MOLFI, A. Tripanosomíase equina (mal das cadeiras). Boletim n. 33. Curitiba: **Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná**. Tip. João Haupt & Cia. Ltda., 1954. 51p.

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

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, v.2b, p.2187-2265, 1992.

MABBOTT, N.A. et al. African trypanosomose infections in mice that lack the interferon- γ receptor gene: nitric oxide-dependent and independent suppression of T-cell proliferative responses and the development of anaemia. **Immunology**, v. 94, p. 476-480, 1998.

MAGEZ, S. et al. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. **Infection and Immunity**, v.67, p.3128-3132, 1999.

MAGEZ, S. et al. Interferon- γ and nitric oxide in combination with antibodies are key protective host immune factors during *Trypanosoma congolense* Tc13 infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1575-1583, 2006.

MAGEZ, S. et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 954-962, 2007.

MALVEZI, A.P. et al. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Federation of European Microbiological Societies**, v.41, p. 69-77, 2004.

MAUDLIN, I. et al. **The Trypanosomiases**. Wallingford: CABI Publishing, 2004. 640p.

MORAES, C.M. et al. Infecção por *Trypanosoma evansi* em equinos do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.159-163, 2007.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p. 28-40, 2004.

NAESSENS, J. et al. Susceptibility of TNF- α -deficient mice to *Trypanosoma congolense* is not due to a defective antibody response. **Acta Tropica**, v.92, p.193-203, 2004.

NAESSENS, J. et al. TNF- α mediates the development of anaemia in a murine *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection, but not the anaemia associated with a murine *Trypanosoma congolense* infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 139, p. 405-410, 2005.

NAESSENS, J. Mechanisms controlling anemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. **PLoS One**, v. 4, p. 1-13, 2009.

NOYES, H.A. et al. Mechanisms Controlling Anemia in *Trypanosoma congolense* Infected Mice. **PLoS One**, v. 4, p. 1-13. 2009.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n.1, p.125-129, 2007.

PAULNOCK, D.M.; COLLIER, S.P. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 685-690, 2001.

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 distinct 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.

REED, S.G., PIHL, D.L., GRABSTEIN, K.H. Immune deficiency chronic *Trypanosoma cruzi* infection recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. **J. Immunol**, v. 142, p. 2067-2071, 1989.

ROBLES, D.C. et al Association between IL-B and IL-1RN gene polymorphism and chagas disease development susceptibility. **Immunology Invest**, v. 38, p. 231-239, 2009.

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, 2005.

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.

SILEGHEM, M.R. et al. Modulation of IL-1 production and IL-1 release during experimental trypanosomose infections. **Immunology**, v. 68, p. 137-139, 1989.

SILVA, A. S. et al. Alterações bioquímicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n.1, p. 43-46, 2007.

SILVA, J.S. et al. Tumor necrosis factor mediate resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, p.4862-4867, 1995a.

SILVA, R. A. M. S. et al. 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**, 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.

STERNBERG, J.M. et al. Meningoencephalitic African trypanosomosis: brain IL-10 and IL-6 are associated with protection from neuro-inflammatory pathology. **Journal of Neuroimmunology**, v.167, p.81-89, 2005.

TAYLOR, K., AUTHIÉ, E.M.L. Pathogenesis of animal trypanosomosis. In: Maudlin, I.; Holmes, P.H., Miles, M.A. **The Trypanosomiases**, London: CABI pubhushing, v. 18, p. 331-354, 2004.

TANIGUCHI, S. et al. Interferon- γ downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. **Blood**, v. 90, p. 2244-2252, 1997.

TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. **Parasitology Today**, v. 7, p. 13-16, 1991.

TIZARD, I.R. Citocinas e sistema imune. In: Tizard, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, p.140-153, 2002.

URQUHART, G.M. et al. Veterinary protozoology. In: **Veterinary Parasitology**. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, p. 207-255, 1996.

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.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 645-665, 2006.

WARNER, T.; HARRUS, S. Anemia of inflammatory disease. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1344p.

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. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 41-46, 2009.

WOLKMER, P. et al Resposta eritropoiética de ratos em diferentes graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1682-1687, 2007.

ZWEYGARTH, E. et al. *Trypanosoma brucei*: Diskinetoplasia and loss infectivity after longterm in vitro cultivation. **Acta Tropica**, Japão, v. 48, n. 2, p. 95-99, fev. 1990.