

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

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi*
NO METABOLISMO DE FERRO EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cássia Bagolin da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* NO
METABOLISMO DE FERRO EM RATOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Cássia Bagolin da Silva

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

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* NO
METABOLISMO DE FERRO EM RATOS EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS**

elaborada por
Cássia Bagolin da Silva

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)

Mere Erika Saito, Dr^a. (UDESC)

Santa Maria, 29 de setembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes pela confiança depositada durante todo o mestrado, mais do que isso agradeço por todos os ensinamentos ao longo dos anos e principalmente, pelo carinho e amizade;

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

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, pela amizade e apoio durante o mestrado. Principalmente à Patrícia Wolkmer e Francine Chimelo Paim, com as quais aprendi muito, agradeço pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, pela amizade, carinho e paciência;

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

A CAPES, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional;

Agradeço especialmente a minha família, pelo apoio e amor incondicional. Principalmente aos meus pais, Irbene Zinelli Bagolin e Ademar da Silva. Pessoas simples que se dedicaram na formação dos filhos. Exemplos de humildade e amor. Que eu possa merecer o orgulho de meus pais.

RESUMO

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

INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* NO METABOLISMO DE FERRO EM RATOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

AUTORA: CÁSSIA BAGOLIN DA SILVA
ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, 29 de setembro de 2011

O *Trypanosoma evansi* é o agente etiológico da doença conhecida como Mal das Cadeiras ou Surra em equinos. Apresenta ampla distribuição geográfica e é comumente observado parasitando diversas espécies de animais domésticos e silvestres. A anemia é uma característica comum e talvez a mais importante nas infecções por *T. evansi*, porém, os mecanismos pelos quais ela se origina ainda não foram completamente elucidados. Considerando-se que deficiência de ferro pode desempenhar um papel crucial na anemia causada pela tripanossomose, devido ao seu envolvimento nos processos hematopoiéticos, o objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos Wistar sobre o *status* do ferro e de suas formas de armazenagem e carreamento e, ainda, estocagem em nível de medula óssea, estabelecendo uma correlação com os achados hematológicos. Para isso foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar, distribuídos em quatro grupos, sendo dois grupos controle (C5 e C30) compostos de seis animais não inoculados em cada grupo e dois grupos teste (T5 e T30), inoculados com *T. evansi*, com 10 animais em cada grupo. Amostras de sangue foram coletadas no dia 5 pós-inoculação (C5 e T5) e dia 30 pós-inoculação (C30 e T30). O *status* do ferro foi determinado em soro, utilizando-se kits comerciais de ferro cromazurol e ferrozine, ferritina, transferrina e capacidade de ligação do ferro. Os índices de saturação da transferrina foram calculados a partir dos resultados obtidos. A medula óssea também foi avaliada, quanto à presença de ferro, através da reação de *Pearls*. Foi observado que os níveis de ferro, ferro cromazurol e capacidade total e latente de fixação do ferro diminuíram significativamente ($P < 0,05$) aos 5 e 30 dias pi nos animais infectados em relação ao grupo controle. Já os níveis de transferrina e ferritina aumentaram ($P < 0,05$). O índice de saturação da transferrina aumentou aos 5 dias pi, observando-se declínio do índice aos 30 dias pi. Os animais infectados apresentaram tendência a um maior acúmulo de ferro na medula óssea. A infecção por *T. evansi* em ratos causou anemia e alterações no metabolismo do ferro, estando estas relacionadas aos picos de parasitemia. Estes resultados sugerem que as alterações no metabolismo do ferro podem estar relacionadas à resposta imune do organismo à infecção e ao estado anêmico dos animais parasitados.

Palavras-chave: Ferro. Anemia. Ratos. Tripanossomose.

ABSTRACT

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

INFLUENCE OF *Trypanosoma evansi* IN IRON METABOLISM IN RATS EXPERIMENTALLY INFECTED

AUTHOR: CÁSSIA BAGOLIN DA SILVA
ADVISER: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, september 29th 2011

Trypanosoma evansi is the causative agent of the disease known as *Mal das cadeiras* or *Surra* in horses. Has a wide geographical distribution and is commonly found parasitizing several species of domestic and wild animals. Anemia is a common feature and perhaps the most important in infections with *T. evansi*, however, the mechanisms by which it originates has not been fully elucidated. Considering that iron deficiency may play a crucial role in anemia caused by trypanosomiasis, due to their involvement in hematopoietic, the aim of this study was to evaluate the possible effects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in Wistar rats on the iron status and of its forms of storage and carting, and also storage in the bone marrow level, establishing a correlation with hematologic findings. To that end, 32 male Wistar rats were divided into four groups, two control groups (C5 and C30) composed by six non-inoculated animals and two test groups (T5 and T30) inoculated with *T. evansi*, with 10 animals in each group. Blood samples were collected at 5 days post-inoculation (C5 and T5) and 30 days post-inoculation (C30 and T30). Iron status was determined in serum using commercial kits of ferrozine and cromazurol iron, ferritin, transferrin and iron binding capacity. The transferrin saturation index was calculated from the results obtained. The bone marrow was also evaluated for the presence of iron, by the reaction of Pearls. It was observed that the levels of iron, cromazurol iron and total and latent iron binding capacity decreased significantly ($P < 0.05$) at 5 and 30 days pi in animals in the infected group when compared to the control group. Since the levels of transferrin and ferritin increased ($P < 0.05$). The transferrin saturation index increased to 5 days pi, observing the decline of the index at 30 days pi. Infected animals showed a greater tendency to accumulate iron in bone marrow. Infection with *T. evansi* in rats caused anemia and changes in iron metabolism, as those related to the peaks of parasitemia. These results suggest that changes in iron metabolism may be related to body's immune response to infection and anemic status of infected animals.

Keywords: Iron. Anemia. Rats. Trypanosomiasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados 13
- Figura 2 - O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferroredutase; DMT-1: transportador de metal divalente- 1; Heme transporter: proteína transportadora do heme-1; Citocromo b duodenal: Dcytb ou ferroredutase. 17
- Figura 3 - Papel das proteínas e macrófagos associados à reutilização do ferro. DMT1: transportador de metal divalente; FPT: ferroportina. 18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 <i>Trypanossoma evansi</i>	11
2.2 Metabolismo de ferro	15
3 CAPITULO I	22
4 CONCLUSÃO	23
5 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O *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).

Os humanos eram 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 e posteriormente uma investigação sorológica e parasitológica identificou 410 pessoas positivas para *T. evansi* em populações de vilarejos na Índia (SHEGOKAR et al., 2006). Em camelos, cães e roedores a infecção por *T. evansi* leva a alterações, como anemia, declínio acentuado do hematócrito e do teor de hemoglobina, leucopenia, neutropenia e hiperproteinemia, além de redução no número de linfócitos e basófilos (HOLWIL, 1965; JATKAR & PUROHIT, 1971; AQUINO et al., 2002).

A anemia é uma característica comum e talvez a mais importante nas infecções por *T. evansi* (LOSOS, 1972), porém, os mecanismos pelos quais ela se origina são ainda discutidos e multifatoriais (ANOSA & KANEKO 1983; JENKINS & FACER 1985; RUE et al., 2000; AQUINO et al., 2002). Entretanto, a hemólise, como resultado da eritrofagocitose imune mediada, e a depressão da eritropoiese por captura de ferro nos macrófagos podem estar envolvidas (SEED & HALL 1985; SILVA et al., 1995b, CONNOR & VAN DEN BOSSCHE 2004).

O ferro é um mineral vital para a síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. É essencial para a homeostase celular, o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. Também atua como um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio (WIJAYANTI & KATZ, 2004).

A deficiência de ferro é definida como a redução do ferro corpóreo total, com exaustão dos estoques e algum grau de deficiência tissular (WIJAYANTI & KATZ, 2004). Como a distribuição do ferro tem uma dinâmica própria, esse mineral pode ocupar diferentes compartimentos (estoque, transporte e funcional), que são interligados, mas que podem, didaticamente, ser avaliados separadamente. Estes compartimentos são afetados sequencialmente à medida que o déficit de ferro corpóreo progride. Inicialmente há uma

queda do ferro em estoque, seguida pela deficiência no transporte e, finalmente, redução no compartimento eritróide ou funcional (KRISHNAMURTHY, 2007; OATES, 2007). Portanto, quando se quer avaliar corretamente o status corporal de ferro, recorre-se a exames como: mensuração de ferro sérico, ferritina sérica, saturação da transferrina, transferrina e capacidade total de ligação do ferro à transferrina, protoporfirina eritrocitária, receptor solúvel da transferrina, índice receptor solúvel da transferrina/ferritina, dosagem do complexo ferro-ferritina e saturação da ferritina (FRAZER & ANDERSON, 2003; KNUTSON, 2003).

Na avaliação do metabolismo do ferro também se deve considerar que a presença de processo inflamatório pode induzir sequestro de ferro, condição na qual se observa hipoferremia, apesar do seu estoque estar adequado (SMITH et al., 1986a; BORGES et al., 2007). Esse fenômeno é denominado de pseudodeficiência de ferro e, nesses casos, a ferritina sérica apresenta-se normal (SMITH et al., 1986a).

A deficiência de ferro desempenha um papel crucial na anemia causada pela tripanossomose (SARROR, 1976), devido ao seu envolvimento nos processos hematopoiéticos (WOLKMER et al., 2007). Em estudos recente foi observado que a infecção por com *T. evansi* em ratos e gatos diminui os níveis séricos de ferro (DA SILVA et al., 2009), contudo, não se estabeleceu o mecanismo que leva à redução deste mineral. Uma das possíveis causas seria o sequestro de ferro por macrófagos como resposta à infecção na tentativa de controlá-la (DARGIE et al., 1979). O esgotamento de ferro no organismo do hospedeiro também pode ser atribuído ao parasita, que utiliza este mineral para o seu próprio crescimento e multiplicação (WEINBERG, 1999). Considerando que a anemia ocasionada pelo *T. evansi* no hospedeiro seja um agravante importante nesta infecção e que a deficiência de ferro possa estar envolvida tanto na resposta imune do organismo frente à infecção, quanto no desenvolvimento da anemia, tornou-se relevante o estudo deste mineral através da avaliação de sua disponibilidade sanguínea e de suas formas de armazenagem, carreamento e estocagem na de medula óssea, estabelecendo uma relação dos achados hematológicos e da avaliação do metabolismo do ferro com a patogênese da tripanossomose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma evansi*

As tripanossomoses 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 (VICKERMAN, 1976). A subordem Trypanosomatina contém uma única família, Trypanosomatidae que, por sua vez, contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*). 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 primeiro tripanossoma patogênico para mamíferos a ser descoberto foi o *Trypanosoma evansi*, tendo sido descrito pela primeira vez, em 1880, por Griffit Evans que o observou em sangue de cavalos e camelos na região de Punjab, na Índia (HOARE, 1972). A partir de então, doenças semelhantes, causadas por tripanossomos indistinguíveis de *T. evansi*, foram relatadas em várias partes do mundo e em vários hospedeiros mamíferos. Este protozoário teve sua origem no continente africano e foi introduzido nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus. Desde então tem causado numerosos surtos em equinos, resultando em morte e elevados prejuízos aos pecuaristas (SILVA et al., 2002). Surtos ou casos isolados de tripanossomose têm sido relatados há vários anos em diversas regiões brasileiras (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995a; HERRERA et al., 2004).

O *T. evansi* é um protozoário digenético, agente etiológico da doença conhecida como *Mal das Cadeiras* ou *Surra* em equinos devido à paralisia de membros pélvicos e incoordenação motora desenvolvida pelos animais infectados (SILVA et al., 2002; HERRERA et al., 2004). Comumente é observado parasitando diversas espécies de animais domésticos e silvestres (SILVA et al., 2002), principalmente no Pantanal Sul Mato-grossense, onde sua incidência assume um caráter endêmico e acomete principalmente os cavalos (SILVA et al., 1995a). 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. Já no Rio Grande do Sul, recentemente, foi identificado um surto de tripanossomose

em equinos (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; DA SILVA et al., 2010) e infecção natural em cães (COLPO et al., 2005; FRANCISCATO 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. Embora a capivara seja reportada como o principal reservatório de *T. evansi*, bovinos (SANTOS et al., 2009) e cães - respectivamente pela alta densidade e pelo amplo contato com equinos - devem ser também cuidadosamente considerados como potenciais hospedeiros em áreas enzoóticas (FRANKE et al., 1994).

Este protozoário já 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 empregados como modelos experimentais.

O *T. evansi* 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 resultado 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). Análises de cepas brasileiras de *T. evansi* isoladas em quatis, capivaras, ratos silvestres, cães e equinos, utilizando corantes para ácidos nucleicos, microscopia eletrônica de transmissão e métodos moleculares, constaram que todas eram desprovidas de cinetoplasto. (MASIGA & GIBSON, 1990; 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. Seu tamanho varia de 15 a 33 μm , com média de 24 μm (HOARE, 1972).

Tripomastigota é a forma dos tripanossomas presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados (Figura 1), que são disseminados por insetos hematófagos durante o repasto sanguíneo (SILVA et al., 2002), a transmissão ocorre de maneira mecânica pela inoculação dos tripanossomas através da saliva dos vetores e a sua divisão ocorre por fissão binária. Como a transmissão é mecânica, não há o desenvolvimento do hematozoário em nenhum

órgão do vetor, e quanto menor a diferença de tempo entre os repastos sanguíneos maiores são as possibilidades de passagem do parasita para um novo hospedeiro. A transmissão é atribuída principalmente aos tabanídeos (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp.) (HOARE, 1972). Insetos dos gêneros *Stomoxys* sp. e *Lyperosia* sp. também podem transmitir a doença (SILVA et al. 2002).

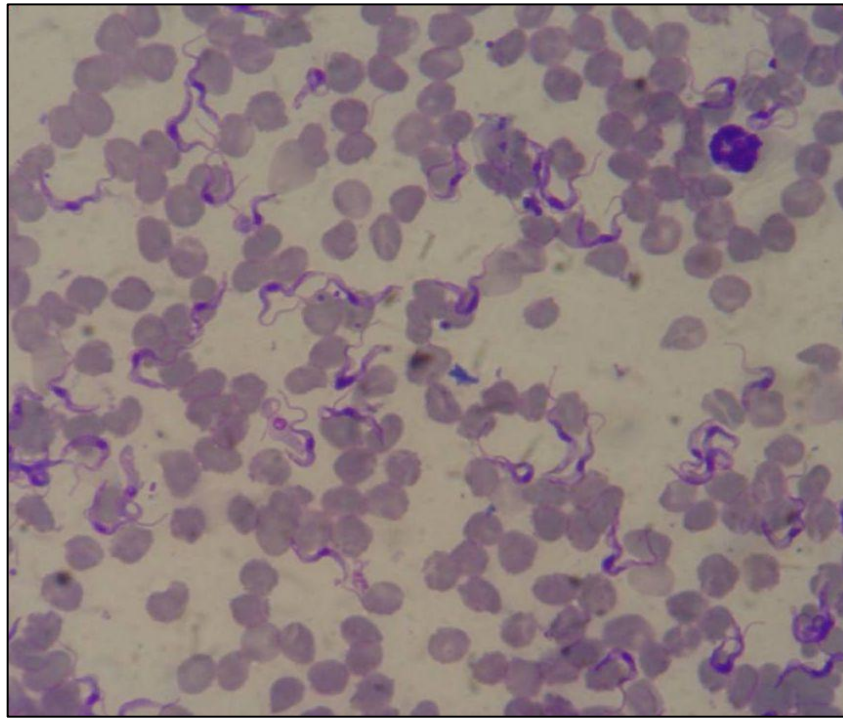


FIGURA 1 – Formas tripomastigotas de *T. evansi* em esfregaço sanguíneo de ratos experimentalmente infectados.

Além disso, a infecção 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*), em que 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 (RAMIREZ et al., 1979). Experimentalmente foi demonstrado que após a ingestão de sangue e de tecidos infectados os animais tornaram-se agentes transmissores (BAZOLLI et al., 2002; SILVA et al., 2007). A via oral pode ser importante na dispersão de infecção de *T. evansi* em cachorros, quatis e capivaras, que podem ser infectados em consequência das brigas

frequentes entre animais infectados e não infectados. Espécies gregárias como quatis (*Nasua nasua*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) têm um comportamento agressivo facilitando a transmissão do protozoário entre eles por via oral, mantendo a infecção no grupo social, já que a forma crônica da doença foi identificada nestas espécies (HERRERA et al., 2004).

O *T. evansi* pode ser observado intercelularmente em tecidos, no plasma sanguíneo e em fluidos das cavidades corporais dos animais infectados (SHARMA et al., 2000). A enfermidade ocasionada por este parasito é multifatorial e manifestada por elevação na temperatura corporal, a qual está diretamente associada com a parasitemia e o progressivo desenvolvimento da anemia, perda da condição física e fraqueza. Em infecções naturais e experimentais foi observado que a tripanossomose por *T. evansi* pode apresentar-se com um quadro clínico agudo e crônico. 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. No estágio final da doença são descritos sinais clínicos de distúrbio neurológico caracterizado por paresia gradual dos membros pélvicos, resultando em andar cambaleante, incoordenação, dismetria, andar em círculo, opistótono e convulsões (TUNTASUVAN et al., 1997; CADIOLI, 2001; RODRIGUES et al., 2006)

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 epizootiológicas 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. Estes parasitas possuem uma camada glicoprotéica que é antigênica e provoca a formação de anticorpos, os quais causam opsonização e lise dos tripanossomas. 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. Os tripanossomas com esta nova variante antigênica multiplicam-se e produzem uma segunda onda de parasitemia. Este processo de variação antigênica associada a ondas e remissões de parasitemia, frequentemente em intervalos semanais, pode prolongar-se por meses, em geral com resultado fatal (LUCAS, 1992).

A principal alteração hematológica identificada em animais com tripanossomose é anemia acentuada (CONNOR & VAN DEN BOSSCHE, 2004). A doença é marcada pela diminuição no hematócrito, na concentração de hemoglobina e no número de eritrócitos totais. As alterações eritrocitárias podem incluir a presença de microesferócitos, acantócitos, dacriócitos, micrócitos, vacuolização eritrocitária, policromasia, poiquilocitose, adesão eritrocitária dos tripanossomas aos eritrócitos circulantes e eritrofagocitose (ANOSA & KANEKO, 1983; SILVA et al., 1995b; CONRADO et al. 2005). 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). Outro mecanismo importante na produção de anemia é atribuído à atividade dos tripanossomas circulantes, por meio da produção de neuraminidase, que resulta na clivagem do ácido siálico da superfície do eritrócito, tornando-os mais propensos à fagocitose pelo sistema retículo 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 da produção de anemia na fase aguda da doença.

O diagnóstico da tripanossomose é realizado com base nos dados epidemiológicos, clínicos, hematológicos, parasitológicos, patológicos, sorológicos e moleculares. 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).

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente usado no controle da tripanossomose dos animais domésticos, pois apresenta maior índice terapêutico que as outras drogas na maioria das espécies domésticas. Tem atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos e apresenta baixa incidência de resistência (PEREGRINE & MAMMAM, 1993).

2.2 Metabolismo do ferro

O ferro caracteriza-se por ser um metal de transição e a extensão de sua utilização biológica está na capacidade de existir em diferentes estados de oxidação, formar muitos complexos, além de agir como um centro catalítico para diversas funções metabólicas.

Presente na hemoglobina, este mineral é de fundamental importância para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono, essenciais à respiração celular aeróbica, além de participar de componentes de numerosas enzimas celulares, importantes para o funcionamento do sistema imunológico, assim como dos citocromos que são indispensáveis para a produção de energia, de enzimas no ciclo do ácido cítrico, ribonucleotídeo redutase e NADPH redutase e, ainda, na síntese de dopamina, serotonina, catecolaminas e, possivelmente, do ácido gamaaminobutírico e na formação de mielina (CARPENTER & MAHONEY, 1992; WORWOOD, 1996).

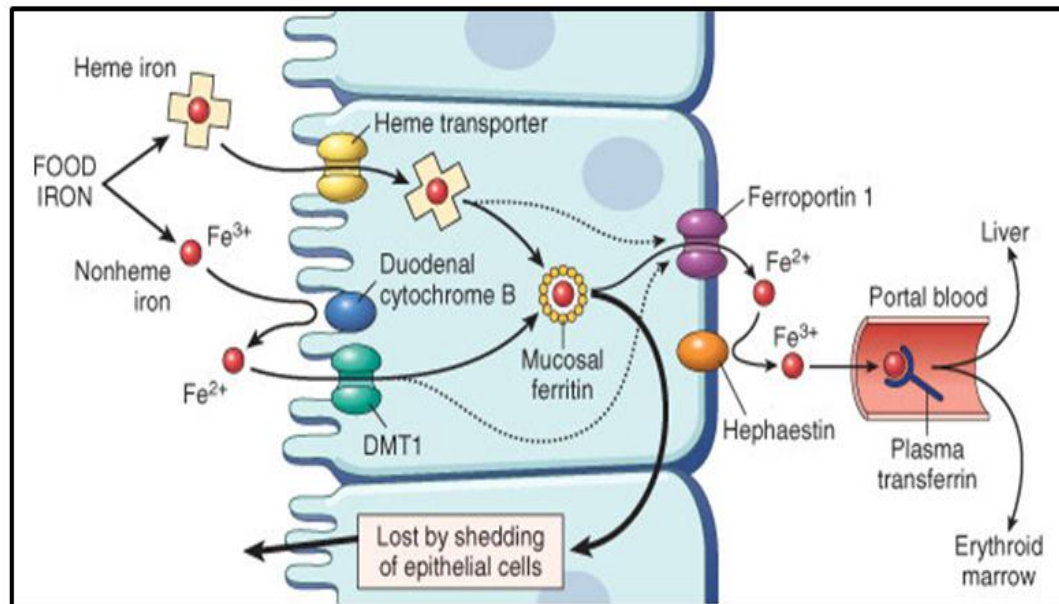
O metabolismo do ferro depende da sua disponibilidade na dieta, da digestão e absorção intestinal, do transporte plasmático, da captação pelas células-alvo e dos mecanismos de estoque, reciclagem e excreção (ALENCAR et al., 2002; ATANASIU et al., 2006; DUNN et al., 2007). Este metal existe em duas formas químicas: Fe^{3+} ou forma férrica e o Fe^{2+} ou forma ferrosa. Para ser absorvido, o Fe^{3+} precisa ser reduzido a Fe^{2+} . Isto ocorre na superfície apical dos enterócitos e é facilitada pela ação da enzima citocromo-b duodeno ferro redutase ou Dcytb (DUNN et al., 2007). O conteúdo de ferro corporal também influencia a sua absorção intestinal, a absorção aumenta quando ocorre perda de ferro e diminui quando há grandes estoques no organismo (ALENCAR et al., 2002).

O processo de absorção do ferro ocorre em várias etapas. Primeiro há a captação pela superfície apical dos enterócitos, o transporte para os enterócitos é feito pela proteína DMT1 (transportador de metais divalentes) seguida do seu transporte transcelular. A proteína de transporte do heme (HCP1) incorpora a fração heme no enterócito após digestão enzimática da hemoglobina e mioglobina. No enterócito, o heme é degradado pela heme oxigenase e libera Fe^{2+} . No final do processo o ferro pode ser armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para o sangue pela ferroportina 1 (FPT1). Como a transferrina sérica tem grande afinidade pelo ferro na forma férrica, o Fe^{2+} externalizado pela FPT1 deve ser oxidado para Fe^{3+} . A hefaestina, oxidase semelhante à ceruloplasmina sérica, é responsável por essa conversão (Figura 2) (ATANASIU et al., 2006).

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular. É essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (WIJAYANTI & KATZ, 2004).

Os precursores eritróides são as células que possuem maior exigência de ferro, para a síntese da hemoglobina. Em condições normais, o organismo consegue suprir a maior parte

dessa demanda por meio da reciclagem do ferro, proveniente da fagocitose de eritrócitos senescentes pelos macrófagos (SMITH, 1997; DUNN et al., 2007).



Fonte: Bio-quimica.blogspot.com

FIGURA 2 - O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente- 1; Heme transporter: proteína transportadora do heme-1; Citocromo b duodenal: Dcytb ou ferredutase.

Macrófagos do baço e da medula óssea e, em menor extensão, células de Kupffer no fígado reconhecem modificações bioquímicas na membrana da hemácia senescente. Essas alterações sinalizam para que o macrófago elimine essas células. Após a interação de receptores específicos nos macrófagos com as hemácias, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes da hemácia. A parte protéica da molécula de Hb, a cadeia globínica, terá seus aminoácidos também reciclados e aproveitados na síntese de novas proteínas. O Fe^{2+} , proveniente da degradação da hemácia, pode ser estocado no próprio macrófago na forma de ferritina ou ser exportado pela ferroportina (FPT). Após a exportação pela FPT, o Fe^{2+} será oxidado pela ceruloplasmina, sintetizada no fígado (Figura 3). O Fe^{3+} será transportado pela transferrina até os locais onde será reutilizado, predominantemente medula óssea, onde participará da hemoglobinizacão de novos eritrócitos (CHUNG & WESSLING-RESNICK, 2003; KNUTSON & WESSLING-RESNICK, 2003).

O transporte de O_2 nos eritrócitos é realizado pela hemoglobina e depende da presença do ferro nesta molécula. O ferro está presente em várias proteínas e enzimas, sendo essencial

para a síntese do ácido desoxirribonucleico, transporte de elétrons na respiração celular e várias outras reações metabólicas (ALENCAR et al., 2002; ALMEIDA et al., 2007; DUNN et al., 2007).

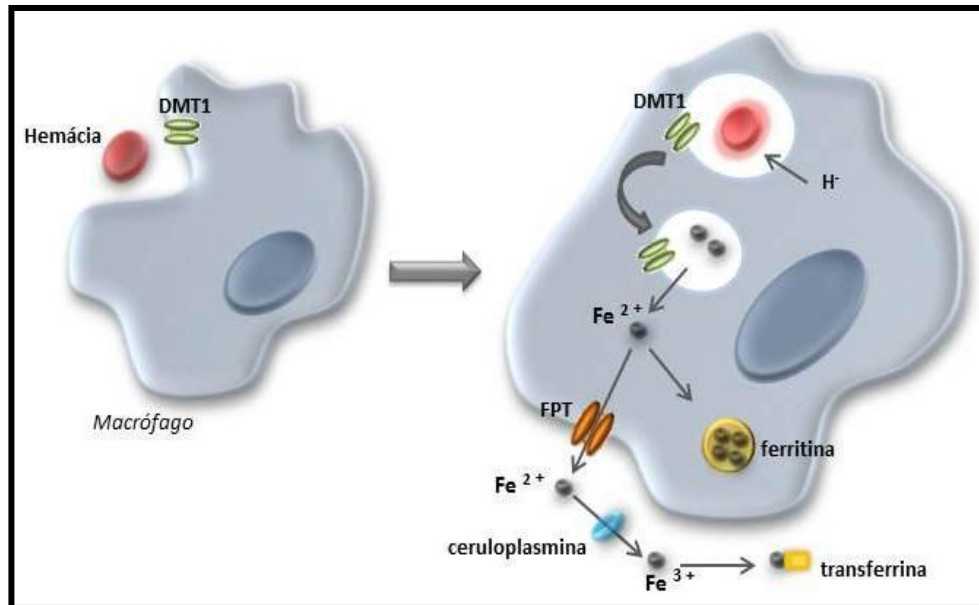


FIGURA 3 – Papel das proteínas e macrófagos associados à reutilização do ferro. DMT1: transportador de metal divalente; FPT: ferroportina.

O controle do equilíbrio do ferro requer uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque. Essa comunicação é feita pela hepcidina, um hormônio peptídico circulante composto por 25 aminoácidos, sintetizado no fígado, (GANZ, 2007; KEMNA et al., 2008) que tem papel regulatório fundamental na homeostase do ferro, coordenando o uso e o estoque do ferro com a sua aquisição. Além disso, age como um peptídeo antimicrobiano mediador da imunidade inata, principalmente nos vertebrados inferiores. A atividade antimicrobiana é conferida pela propriedade da hepcidina em romper as membranas microbiais e na restrição da disponibilidade de ferro ao desenvolvimento microbiano. Nos vertebrados superiores, a sua atividade está muito mais relacionada à homeostase do ferro (PARK et al., 2001; KRAUSE et al., 2000).

A hepcidina atua na inibição da absorção intestinal e na liberação do ferro por macrófagos e enterócitos (OHGAMI et al., 2005) sendo o mediador no ciclo da absorção do ferro entre o fígado e o intestino (DUNN et al., 2007). Este peptídeo possui a função de se ligar à ferroportina, regulando a exportação do ferro para o plasma. Quando as concentrações

de hepcidina estão baixas, as moléculas de ferroportina são expostas na membrana plasmática e exportam ferro. Quando as concentrações de hepcidina aumentam, esta se liga às moléculas de ferroportina induzindo sua internalização e degradação, e o ferro liberado diminui progressivamente (GANZ, 2007; NEMETH, 2008). Regulam a expressão da hepcidina o estado do ferro (a sobrecarga de ferro aumenta sua expressão, enquanto a anemia e hipoxemia reduzem-na) e o estado inflamatório, em que a IL-6 tem um papel fundamental (NEMETH et al., 2004).

O ferro é transportado no plasma pela transferrina (Tf), uma glicoproteína de 80 KDa sintetizada e secretada pelo fígado, que possui dois sítios homólogos com alta afinidade pelo Fe^{3+} . Além de solubilizar o ferro, a Tf atenua sua reatividade e facilita a sua liberação para as células. O ferro livre possui atividade oxido-redutora, podendo promover a formação de radicais livres pelas reações de Fenton e de Harber-Weiss, com grande potencial lesivo para os tecidos. A transferrina mantém o ferro em uma forma solúvel e não tóxica, evitando a formação de radicais livres (PEELING et al., 2008).

A entrada do ferro nas células também depende da transferrina, principalmente nos precursores eritróides da medula óssea, hepatócitos e monócitos (SMITH, 1997; PEELING et al., 2008). Nestes locais ele é estocado na forma de ferritina ou hemossiderina. A ferritina garante uma reserva solúvel, difusa e prontamente disponível, enquanto a hemossiderina possui maior teor de ferro, porém na forma de agregados insolúveis de baixa disponibilidade (SMITH, 1997).

As alterações do metabolismo do ferro podem ser avaliadas por várias provas laboratoriais, o hemograma, a determinação sérica do ferro ferrozine e cromazurol, a capacidade total da ligação do ferro (CTLF), o índice de saturação da transferrina (IST), a concentração de ferritina e a avaliação do conteúdo de ferro medular são as mais utilizadas (ALENCAR et al., 2002).

A mensuração de variáveis eritrocitárias, como o hematócrito e a concentração de hemoglobina são comumente utilizadas para avaliar o status de ferro. As alterações no tamanho e na cor das células vermelhas proporcionam uma informação útil em relação ao estado nutricional de ferro, e o uso de contadores eletrônicos tem melhorado a confiabilidade do diagnóstico. Apesar de serem comumente utilizados para avaliar a deficiência de ferro, os índices de células vermelhas (hematimétricos) são mais úteis em diagnosticar a carência de ferro após a manifestação da anemia, uma vez que células hipocrômicas e microcíticas aparecem em maior quantidade no sangue após um decréscimo na concentração de hemoglobina (COOK, 1990; HASTKA et al., 1992). Anemia não é sinônimo de deficiência

de ferro e a diminuição da síntese de hemoglobina ocorre apenas nas deficiências severas (SMITH et al., 1986). Os parâmetros eritrocitários estão geralmente normais durante os estágios iniciais da deficiência de ferro, enquanto a deficiência crônica é caracterizada por anemia microcítica hipocrômica (HARVEY, 2000).

Os índices hematimétricos também auxiliam na investigação das anemias. Na anemia por deficiência de ferro é comum a microcitose (diminuição do volume corpuscular médio - VCM), bem como a hipocromia (redução da hemoglobina corpuscular média - HCM). Como a avaliação do tamanho das hemácias é uma chave para o diagnóstico de anemia, o VCM é o mais importante dos índices hematimétricos. VCM baixo parece ser um indicador confiável da redução de síntese de hemoglobina. Outro índice obtido é a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) que mais tardiamente se torna anormal na deficiência de ferro (COOK et al., 1992).

O ferro é transportado no plasma pela transferrina. Para determinar a concentração do ferro circulante, este deve ser dissociado da proteína transportadora pela adição de um ácido que vai precipitar a proteína. O ferro liberado será então quantificado pela adição de um cromógeno, resultando numa reação de cor (DALE et al., 2002).

O compartimento de transporte pode ser avaliado pela concentração sérica de ferro e por índices que avaliam indiretamente a transferrina. Quando a transferrina é saturada com uma concentração conhecida de ferro, a quantidade total deste mineral ligado a ela representa a CTLF. Como a transferrina sérica normalmente não se encontra saturada, a CTLF é maior do que a concentração de ferro sérica, sendo a diferença entre eles denominada capacidade latente de ligação do ferro (CLLF). O índice de saturação da transferrina (IST) é obtido pela divisão da concentração de ferro pela CTLF (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002).

A capacidade total de ligação do ferro (CTLF), que também é utilizada para avaliar o ferro circulante, aumenta na deficiência de ferro, mas diminui na inflamação, fornecendo assim evidência para diferenciação das duas situações. Porém, deve ser avaliada criteriosamente, uma vez que pode se encontrar dentro da faixa de normalidade quando ambas, inflamação e deficiência, coexistem. A CTLF pode aumentar antes mesmo das reservas de ferro estarem completamente exauridas, refletindo depleção das reservas (COOK et al., 1992).

A concentração sérica de ferro não reflete os estoques do organismo (HARVEY et al., 1987). O ferro fica estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea, nas formas de ferritina e hemossiderina, podendo também ser estocado nessas formas nos macrófagos. Um bom parâmetro para a avaliação do ferro estocado é a dosagem da ferritina

sérica, que possui forte correlação com o conteúdo de ferro hepático e esplênico (SMITH et al., 1984; HYYPPA et al., 2002). A diminuição da ferritina é um indicativo confiável de deficiência de ferro, porém resultados normais e elevados devem ser avaliados com cautela. A ferritina é uma proteína de fase aguda, aumentando em resposta à inflamação, infecções, hepatopatias, neoplasias e exercício físico (SCHUMACHER et al., 2002).

A hemossiderina corresponde à forma degradada da ferritina, em que a concha protéica foi parcialmente desintegrada, permitindo que o ferro forme agregados. Pode ser visualizada à microscopia óptica após a coloração com azul da Prússia ou reação de Pearls, em que a hemossiderina cora com ferrocianeto de potássio na presença de ácido clorídrico (FAIRBANKS & BEUTLER, 2001).

O ferro tecidual pode ser avaliado por biópsia ou punção aspirativa de fígado ou medula óssea. A avaliação do ferro medular, por método histoquímico com corante azul-da-Prússia, tem bom valor diagnóstico para a deficiência e para a diferenciação entre deficiência e pseudodeficiência de ferro. Na deficiência ocorre depleção dos estoques medulares, enquanto que na pseudodeficiência o ferro medular apresenta-se de normal a aumentado. É considerado o teste mais preciso para o diagnóstico da deficiência de ferro, mas, devido ao seu caráter invasivo e por ser desconfortável ao paciente, na prática só é realizado em casos mais complexos e não diagnosticados pelos métodos usuais (SMITH, 1997; ALENCAR et al., 2002).

3 CAPÍTULO I

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:

Iron metabolism and its relationship to anemia and immune system in *Trypanosoma evansi* infected rats

Autores: Cássia Bagolin da Silva; Patrícia Wolkmer; Francine Chimelo Paim; Aleksandro Schaefer da Silva; Raqueli Teresinha França; Verônica Castro; Camila Lopes de Souza; Guilherme Lopes Dornelles; Silvia Gonzalez Monteiro; Cinthia Melazzo Mazzanti; Sonia Teresinha dos Anjos Lopes.

De acordo com normas para publicação em: International Journal for Parasitology

4 CONCLUSÃO

Na infecção por *T. evansi* em ratos ocorrem alterações no metabolismo do ferro, com diminuição dos níveis séricos de ferro, da capacidade de fixação do ferro e aumento da ferritina e transferrina. Estas alterações estão correlacionadas com a parasitemia e com desenvolvimento da anemia no pico da parasitemia, assim como com a resposta imune do organismo à infecção. Estes resultados sugerem que o metabolismo do ferro se altera para diminuir a disponibilidade deste mineral ao parasito regulando a resposta imune, o que contribui para o desenvolvimento da anemia uma vez que os processos hematopoiéticos são dependentes de ferro. Portanto, a anemia pode estar associada à resposta imune na tripanossomose, em um mecanismo patogênico variável dependente do hospedeiro e do parasito.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista Educação Continuada CRMV/SP**, v.5, p.192-205, 2002.

ALMEIDA, R.F. et al. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. **Ciência Rural**, v.37, p.1097-1103, 2007.

ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): light and electron microscopic studies on erythrocyte pathologic changes and phagocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.44(4), p.645-651, 1983.

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, p.8-18, 2002.

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: 04 jul. 2011.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Hpcidin – central regulador of iron metabolism. **European Journal of Haematology**, v.78, p.1-10, 2006.

ATARHOUCHE, T. et al. Camel trypanosomosis in Morocco 1: results of a first epidemiological survey. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.4, p.277–286, 2003.

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.

CADIOLI, F.A. **Infecção experimental em jumento (*Equus asinus*) com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae)**. 2001. 135f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2001.

CARPENTER, C.E.; MAHONEY, A. Contributions of heme and non-heme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, p.333-367, 1992.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.40, n.2, p.151-182, 2003.

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, c.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.

COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, v.5, p.189-202, 1992.

COOK, J.D. Adaptation in iron metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.301-308, 1990.

DA SILVA, A.S. et al. *Trypanosoma evansi*: Levels of copper, iron and zinc in the bloodstream of infected cats. **Experimental Parasitology**, v.123, p.35-38, 2009.

DA SILVA, A.S. et al. Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.2, p.113-120, 2010.

DALE, J.C.; BURRITT, M.F.; ZINSMEISTER, A.R. Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation, and ferritin levels. **American Journal of Clinical Pathology**, v.117, n.5, p.802-808, 2002.

DARGIE, J.D. et al. The red cell kinetic of N'dama and zebu cattle infected with *T. congolense*. **Parasitology**, v.78, p.271-286, 1979.

DUNN, L.L.; RAHMANTO, Y.S.; RICHARDSON, D.R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v.17, p.93-100, 2007.

FAIRBANKS, V.G.; BEUTLER, E. Iron metabolism. In: BEUTLER, E. et al. (Eds). **Williams- Hematology**. 6th ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001. p.295-304.

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. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v.58, p.159-69, 1994.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.30, n.3, p.288-97, 2003.

GANZ, T. Molecular control of iron transport. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.18, p.394-400, 2007.

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 Williams & Wilkins, 2000. p.154-162.

HARVEY, J.W. Erythrocyte metabolism. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.125-128.

HARVEY, J.W. et al. Serum ferritin, serum iron, and erythrocyte value in foals. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.1348-1352, 1987.

HASTKA, J. et al. Washing erythrocytes to remove interferents in measurements of zinc protoporphyrin by front-face hematofluorometry. **Clinical Chemistry**, v.38, p.2184-2189, 1992.

HERRERA, H.M. et al. Enzoootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.125, n 3-4, 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.

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

HOLWIL, M.G. Deformation of erythrocytes by trypanosomes. **Experimental Cellular Research**, v.37, p.306-311, 1965.

HYYPPA, S. et al. Effect of exercise on plasma ferritin concentrations: implication for the measurement of iron status. **Equine Veterinary Journal**, supl.34, p.186-190, 2002.

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.

JENKINS, G.C.; FACER, C.A. Hematology of African Trypanosomiasis. In: **Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis.** Boca Raton: CRC Press, 1985. p.13-44.

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.

KEMNA, E.H. et al. Hcpidin: from discovery to differential diagnosis. **Haematologica**, v.93, p.90-97, 2008.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.1, p.61-88, 2003.

KRAUSE, A. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v.480, n.2-3, p.147-150, 2000.

KRISHNAMURTHY, P. et al. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v.114, n.3, p.345-58, 2007.

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

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

LOSOS, G.J.; IKEDE B.D. Review of pathology of disease of domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma*. **Veterinary Pathology**, v.9, p.1-71, 1972.

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.2, p.2187-2265.

MASIGA, D.K.; GIBSON, W.C. Specific DNA probes for *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.40, p.279-284, 1990.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, n.9, p.1271-1276, 2004.

NEMETH, E. Iron regulation and erythropoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v.15, p.169-175, 2008.

OATES, P.S. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. **Histology and Histopathology**, v.22, n.7, p.791-804, 2007.

OHGAMI, R.S. et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nature Genetics**, v.37, n.11, p.1264-1269, 2005.

PARK, C.H. et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.11, p.7806-7810, 2001.

PEELING, P. et al. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. **European Journal of Applied Physiology**, v.103, p.381-391, 2008.

PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Dimenazene: A Review. **Acta Tropica**, v.54, n.2, p.185-203, 1993.

PIETRANGELO, A. The ferroportin disease. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.32, n.1, p.131-138, 2004.

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.

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

RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.239-249, 2005.

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.

SANTOS, C.E.P. et al. Isolamento de *Trypanosoma evansi* em *Bos taurus indicus* no Pantanal Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, supl.1, p.625-630, 2009.

SARROR, D.I. Plasma copper levels in bovine trypanosomosis. **Veterinary Record**, v.98, 1976.

SCHUMACHER, Y.O. et al. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. **British Journal of Sports Medicine**, v.36, p.195-200, 2002.

SEED J.R.; HALL J.E. Pathophysiology of African Trypanosomiasis. In: TIZARD, I.R. (ed.). **Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis**. Boca Raton: CRC Press, 1985.

SHARMA, D.K. et al. Haematological changes in experimental trypanosomiasis in Barbari goats. **Small Ruminant Research**, v.38, n.2, p.145-149, 2000.

SHEGOKAR, V.R. et al. Short report: human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.5, p.869– 870, 2006.

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.

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

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, 1995a.

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, 1995b.

SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. c.97, p.223-239.

SMITH, J.E.; CIPRIANO, J.E.; DEBOWES, R.M.; MOORE, K. Iron deficiency and pseudo-iron deficiency in hospitalized horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.188, p.285- 287, 1986.

SMITH, J.E.; MOORE, K.; CIPRIANO, J.E.; MORRIS, P.G. Serum ferritin as a measure of stored iron in horses. **Journal of Nutrition**, v.114, p.677-681, 1984.

TUNTASUVAN, D. et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. *Veterinary Parasitology*, v.73, n.3, p.357-363, 1997.

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

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.

WEINBERG, E.D. The Role of Iron in Protozoan and Fungal Infectious Diseases. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, n.3, p.231-238, 1999.

WIJAYANTI, N.; KATZ N. Biology of heme in health and disease. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.8, p.981-986, 2004.

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 eritropoética de ratos em diferentes de graus de parasitemia por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v.37, p.1682–1687, 2007.

WORWOOD M. Regulação do metabolismo do ferro. **Anais Nestlé**, v.52, p.1-10, 1996.

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